UNIVERSITE SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH
ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET SANTE
ET
UNIVERSITE DE POITIERS
ECOLE DOCTORALE SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

DISCIPLINE : DOCTORAT EN SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES (USJ)
ET DOCTORAT EN NEUROSCIENCES (UP)
SPÉCIALITÉ : PHARMACOLOGIE (USJ) ET NEUROSCIENCES (UP)

Sujet de la thèse :

Modification de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cérébral du cholestérol par l'exposition à l'alcool et à la cocaïne.

Présentée par :
ALSEBAALY Josette

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH
ET DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Soutenue le 29 Mars 2019
Devant le jury composé de :

Pr. Sandrine BETUING	Rapporteur
Pr. Vincent VAN WAES	Rapporteur
Pr. Nassim FARES	Examinateur
Dr. Marcello SOLINAS	Directeur de thèse
Pr. Lydia KHABBAZ	Co-directeur de thèse
Dr. Nathalie THIRIET	Co-directeur de thèse

LNEC, Université de Poitiers, France
LPCQM, PTS, FACULTE DE PHARMACIE, USJ, LIBAN

Remerciements

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il! Alors j'y ai cédé il y a 3 ans et maintenant, le moment est venu pour dire, en grand, merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens en premier lieu à remercier sincèrement le Professeur Sandrine Betuing et le Professeur Vincent Van Waes d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Mes remerciements vont aussi au Professeur Nassim Fares d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur.

Je remercie le Professeur Mohamed Jaber de m'avoir accueillie au sein du LNEC. Je vous remercie pour votre soutien et pour le temps précieux que vous m'avez consacré quand j'avais besoin d'aide. C'est toujours agréable d'avoir un Libanais comme GRAND CHEF.

Mes remerciements vont également au Professeur Lydia Khabbaz. Merci de m'avoir accueillie depuis ma 4ème année de Pharmacie au sein du laboratoire. Je vous remercie pour toutes les ondes positives que vous me donniez à chaque fois que je rentrais dans votre bureau. C'est grâce à vous que j'ai continué cette thèse. Je vous suis reconnaissante pour votre suivi, vos conseils et remarques qui m'étaient précieux tout au long de ces années pénibles.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Docteur Marcello Solinas qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Votre compétence, votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup appris. Elles ont été et resteront le moteur de mon travail de chercheur.

Je vous remercie grandement, Docteur Nathalie Thiriet, pour toute votre aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car, outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. C'est grâce à vous que j'ai pu concilier avec bonheur, recherche théorique et recherche appliquée. Je suis vraiment reconnaissante pour votre encadrement compréhensif tout le long de ce chemin.

Je remercie également l'équipe du LNEC, chercheurs, enseignants chercheurs, ingénieurs, techniciens, personnel administratif, post-doctorants et doctorants. Merci pour toute l'aide technique et professionnelle que vous m'avez procurée. Merci à toutes et à tous pour les bons moments qu'on a passés ensemble. Je ne les oublierai jamais !!

Je voudrais également remercier Virginie pour avoir pris soin de mes rats et pour son aide technique dans la réalisation de mes travaux de recherche.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Pauline Belujon pour son aide, sa gentillesse et ses conseils judicieux. Votre bienveillance m'était d'un grand secours.

Je ne peux surtout pas oublier Emilie !! Merci pour l'aide technique que tu m'as procurée pendant ces 3 ans de thèse. Merci de m'avoir appris à devenir méticuleuse dans le travail de recherche, à savoir anticiper mes expériences et à les organiser. Merci d'avoir été mon support moral durant ces dernières années et pour tous les conseils personnels, surtout durant la « pause banane » dans ton bureau. Merci Juju pour tes petits messages vocaux que tu m'envoyais pour me dire 'coucou' durant mon séjour au Liban.

*Mejda, la « fashionista » de l'équipe, je te remercie fortement pour avoir rendu l'ambiance au bureau plus agréable. Merci pour toutes nos discussions constructives durant les pauses post-rédaction. Tu m'as vraiment manqué cette année ! Le bureau est vide sans toi, bien que j'aie mis A**** sur mes genoux comme tu me l'as conseillé !! Merci pour tous les mojitos et les soirées « Wallabys » que je n'oublierai jamais !!*

Je tiens également à remercier mes amis arabes et libanais à Poitiers : Sami, Samir, Aya, Maya, Ameni, Amira et Hend. En particulier, je remercie Sarah. Tu n'étais pas une simple collègue ou voisine, mais plutôt une sœur sensible et bienveillante.

Je remercie vivement l'équipe du LPCQM, en particulier Fabienne, merci pour ton aide précieuse durant mon travail pratique au laboratoire.

Un merci spécial pour Aline! ALLOUN, merci d'avoir cru en moi pour arriver là où je suis maintenant et d'être toujours la personne qui m'inspire pour faire ressortir le meilleur de moi-même. Merci pour les soins que tu as apportés lors de la correction du manuscrit.

Merci pour mes amis au Liban : Samer et Charbel. Je suis navrée d'avoir été la fille boudeuse durant ces 3 ans. Je vous promets que, désormais, il n'y aura plus de plaintes à propos de manips et de thèse.

Stéphanie, merci pour cette formidable amitié qui m'a consolée énormément durant mon séjour à Poitiers. C'était des moments doux malgré toutes les difficultés de la routine quotidienne. Je te remercie d'être toujours à mes côtés et de me soutenir, même quand je suis intolérable ! Merci de même pour toutes les aventures qu'on a vécues ensemble.

Isabelle, un trésor d'amie, une maman et une « boss » incomparable, merci d'être la personne qui réunit toutes ces qualités. Merci pour ton écoute attentive même quand des milliers de kilomètres nous séparaient. Prépare-toi, je reviens au travail dès lundi !!

Grand merci à la famille Khoury : Georges, Martha, Gracia et Elissa pour les bons moments qu'on a passés ensemble au Liban. Merci pour tout le support que vous me communiquiez même quand j'étais si loin.

Amer, je remercie Dieu de m'avoir donné un frère comme toi, une idole que j'admire énormément. C'est grâce à ta motivation et ton encouragement que j'étais persuadée qu'il fallait aller plus loin. Merci de m'avoir soutenue durant ma première année de thèse, au cours de laquelle tu m'as fait visiter Paris pour la première fois en 36 heures !! Je tiens également à remercier, ton autre moitié, Mariana, pour sa douceur et son affection. Chère Mariana, tu es un amour de belle-sœur !

Mes parents, trouver les mots pour vous remercier m'était presque impossible. Vous étiez cette chandelle qui se consumait pour éclairer mon chemin. Votre amour est le souffle qui m'incite à évoluer et à devenir cette fille digne de vos attentes.

Papa, merci de veiller toujours sur moi en me procurant affection et attention. Je resterai toujours ta petite fille qui ne grandira jamais et qui cherchera toujours tes bras paternels.

Maman, le « tourisme » des 3 ans est fini !! C'est le bout du chemin ! Je rentre avec un nouveau diplôme ; tu en as assez, non ? Je rentre cette fois, mais pour de bon, dans ton havre de paix. Merci, maman, pour tous tes sacrifices, tes larmes et ta patiente tendresse. Tu avais le souffle long quand même!! Tous les mots de remerciements ne suffiront pas pour exprimer mon amour et mon admiration pour la « superwoman » que tu es.

Mon Liban, pays que j'adore, je n'ai pu goûter au bonheur de vous appartenir que lorsque je vous ai quitté, même temporairement. Je vous dédie tout ce travail parce que vous êtes cette terre sainte qui m'est chère et que j'aime honorer.

Table des matières

INTRODUCTION 19

CHAPITRE 1 : ADDICTION ET MODELES D'ETUDES 20

I. Addiction 20

1. Définition et caractéristiques 20
2. Données épidémiologiques 20
3. Addiction : un problème d'économie 20
4. Diagnostic 21

II. Modèles comportementaux d'étude de l'addiction utilisés pendant la thèse 23

1. Modèles utilisés dans le projet « cocaïne » 23
   a. Traitement chronique et sensibilisation comportementale 23
      i. Définition et caractéristiques de la sensibilisation comportementale 23
      ii. Phénomène de « sensibilisation croisée » 23
      iii. Phases de la sensibilisation comportementale 23
   b. Protocole d'auto administration 25
2. Modèle utilisé dans le projet « Alcool » : Prise intermittente d'alcool 26

CHAPITRE 2 : MECANISMES IMPLIQUES DANS L'ADDICTION 28

I. Mécanismes d'action des drogues 28

1. Cocaïne 28
   a. Présentation 28
   b. Toxicité à court et long terme 28
   c. Cibles moléculaires de la cocaïne 29
      i. Effets de la fixation de la cocaïne sur le transporteur dopaminergique 29
      ii. Conséquence de la libération de la dopamine au niveau de la synapse : activation des récepteurs dopaminergiques 30
2. Alcool : Cibles moléculaires 31
   a. Effet de l'alcool sur le système gabaergique 31
      i. Présentation du système GABA 31
      ii. Conséquences de l'exposition aiguë à l'alcool sur le système GABA 32
      iii. Conséquences de l'exposition chronique à l'alcool sur le système GABA 32
   b. Effet de l'alcool sur le système glutamatergique 33
      i. Présentation du système glutamatergique 33

ii. Conséquences de l'exposition aiguë à l'alcool sur le système glutamatergique 34
iii. Conséquences de l'exposition chronique à l'alcool sur le système glutamatergique 34
II. Structures cérébrales ciblées par les drogues d'abus 35
1. Anatomie du système système mésocorticolimbique 35
2. Principales structures constituant le système de mésocorticolimbique 36
a. L'aire tegmentale ventrale (ATV) 36
i. Présentation 36
ii. Projections 36
i. Rôle dans l'addiction 37
b. Le noyau accumbens (NAc) 39
i. Présentation 39
ii. Projections 39
iii. Rôle dans l'addiction 39
c. L'amygdale 41
i. Présentation 41
ii. Projections 41
iii. Rôle dans l'addiction 42
d. L'hippocampe 42
i. Présentation 42
ii. Projections 43
iii. Rôle dans l'addiction 44
e. Le cortex préfrontal (CPF) 44
i. Présentation 44
ii. Projections 45
iii. Rôle dans l'addiction 45
III. Plasticité neuronale induite par les drogues d'abus 46
1. Plasticité morphologique induite par les drogues 46
a. Plasticité morphologique induite par la cocaïne 46
b. Plasticité morphologique induite par l'alcool 47
2. Plasticité synaptique induite par les drogues d'abus 48
a. Plasticité synaptique induite par la cocaïne 49
i. Plasticité synaptique induite par une exposition aiguë à la cocaïne 49

ii. Plasticité synaptique induite par des expositions chroniques à la cocaïne.. 50
b. Plasticité synaptique induite par l'alcool 53
i. Plasticité synaptique induite par une exposition aiguë à l'alcool 53
ii. Plasticité synaptique induite par des expositions chroniques à l'alcool 53
CHAPITRE 3 : LE CHOLESTEROL CEREBRAL 55
I. Généralités sur le cholestérol 55
II. Le cholestérol cérébral 56
1. Spécificités du cholestérol cérébral 56
a. Echange de cholestérol entre le cerveau et la circulation générale..... 56
b. Les cellules responsables de la synthèse du cholestérol 56
2. Métabolisme du cholestérol cérébral 57
a. La voie de synthèse du cholestérol 57
b. Les mécanismes de régulation de la synthèse du cholestérol..... 58
i. Régulation de la synthèse du cholestérol par les protéines SREBP et SCAP..... 59
ii. Régulation de la synthèse du cholestérol par les récepteurs LXR..... 60
iii. Régulation post-traductionnelle de l'HMGCoA réductase 61
c. Transport du cholestérol des astrocytes aux neurones..... 62
d. Internalisation du cholestérol..... 64
e. Adressage et stockage du cholestérol..... 65
f. Elimination du cholestérol en excès 66
i. Conversion du cholestérol en 24S-hydroxycholesterol..... 66
ii. Elimination du cholestérol par des transporteurs..... 67
III. Rôles du cholestérol dans le fonctionnement cérébral 68
1. Cholestérol : le constituant principal de la myéline..... 68
2. Modulation de la fluidité et de la rigidité membranaire par le cholestérol. 68
3. Rôle du cholestérol dans la communication neuronale..... 69
a. Localisation dans les radeaux lipidiques..... 69
b. Action du cholestérol dans les radeaux lipidiques. 70
i. Rôle pré-synaptique du cholestérol et régulation de la libération des neurotransmetteurs..... 70
ii. Rôle du cholestérol au niveau post-synaptique 71
iii. Rôle du cholestérol dans la plasticité synaptique 72
4. Synthèse d'autres molécules actives grâce à la voie du mévalonate..... 72

a. Neurostéroïdes 72
b. Isoprénoïdes 75
IV. Implication du métabolisme du cholestérol dans le comportement, la mémoire et l'apprentissage 76
V. Implication du métabolisme du cholestérol cérébral dans des neuropathologies .. 78
1. La maladie d'Alzheimer (MA) 78
2. La maladie de Huntington (MH) 79
3. L'addiction 80
OBJECTIFS DE LA THESE 82
RESULTATS 84
ARTICLE 1: PERSISTENT NEUROADAPTATIONS IN THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN CHOLESTEROL HOMEOSTASIS INDUCED BY CHRONIC, VOLUNTARY ALCOHOL INTAKE IN RATS 86
ARTICLE 2: IMPACT OF ACUTE AND REPEATED COCAINE ADMINISTRATIONS ON THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN CHOLESTEROL HOMEOSTASIS IN THE RAT BRAIN. 100
SUPPLEMENTARY RESULTS: EFFECT OF THE MODULATION OF THE ENZYME CYP46A1 IN THE PREFRONTAL CORTEX ON RELAPSE TO COCAINE. 135
DISCUSSION GENERALE 145
I. Modulation du métabolisme du cholestérol par les drogues d'abus dans le CPF et implication possible dans l'addiction 147
1. Régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol par la cocaïne et l'alcool dans le CPF 147
2. Rôle potentiel du cholestérol dans les neuroadaptations observées dans le CPF 148
3. Effet potentiel de l'altération du métabolisme du cholestérol au niveau du CPF sur l'addiction à la cocaïne et à l'alcool 149
a. Est-ce qu'une surexpression de la CYP46A1 avant l'exposition à l'alcool pourrait altérer la prise d'alcool ? 150
b. Est-ce qu'une surexpression de la CYP46A1 durant la période d'abstinence pourrait altérer la recherche de la drogue dans un protocole d'AA ? 150
II. Modulation du métabolisme du cholestérol par les drogues dans le NAc et implication possible dans l'addiction 150

1. Régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol par la cocaïne et l'alcool dans le NAc 150
2. Rôle potentiel du cholestérol dans les neuroadaptations observées dans le NAc 151
3. Effet de l'altération du métabolisme du cholestérol au niveau du NAc sur l'addiction à la cocaïne et à l'alcool 153
III. Modulation du métabolisme du cholestérol dans d'autres structures et implication possible dans l'addiction 153
1. L'amygdale 153
2. L'hippocampe 154
3. L'aire tegmentale ventrale 155
CONCLUSION GENERALE 158
BIBLIOGRAPHIE 161

Résumé

L'addiction aux drogues est une maladie comportementale récidivante caractérisée par une recherche et une prise compulsive de drogues, une perte de contrôle sur la prise malgré les conséquences négatives et l'émergence d'un état émotionnel négatif lors de l'absence de la drogue. L'addiction impliquerait des neuroadaptations cérébrales persistantes. Des études récentes montrent que le cholestérol joue un rôle crucial dans le fonctionnement cérébral en participant à divers processus cellulaires et, en particulier, dans le contrôle de la neurotransmission. L'objectif de ce travail de thèse consistait à étudier l'implication potentielle du métabolisme du cholestérol dans l'addiction et en particulier si ce métabolisme était affecté par les drogues d'abus. Dans ce travail, nous avons étudié l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol cérébral après une consommation volontaire chronique d'alcool par des rats et après des injections aiguës ou chroniques de cocaïne. Nous avons analysé l'expression de ces gènes dans des structures cérébrales impliquées dans l'addiction, notamment le cortex préfrontal, le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe. Nous avons trouvé que l'exposition à l'alcool et à la cocaïne modifient l'expression des protéines impliquées dans la synthèse, le transport et la dégradation du cholestérol de façon spécifique de la drogue, du traitement (aigu/chronique) et de la région cérébrale étudiée. Dans une deuxième partie de la thèse, nous avons utilisé une approche virale permettant de surexprimer la CYP46A1, l'enzyme de dégradation du cholestérol cérébral dans le cortex préfrontal afin d'évaluer l'impact de cette surexpression sur la recherche de cocaïne dans un modèle de rechute. La surexpression de la CYP46A1dans cette structure n'a eu aucun impact sur la recherche de cocaïne. Des études futures seront nécessaires pour déterminer si l'altération de l'expression de cette enzyme dans d'autres structures, comme par exemple le noyau accumbens, pourrait avoir des effets bénéfiques sur la rechute. L'ensemble de ces travaux montre que l'exposition aux drogues d'abus modulerait le métabolisme cérébral du cholestérol dans certaines structures cérébrales. Ce projet de thèse ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle du métabolisme du cholestérol cérébral dans l'addiction, et il pourrait en résulter de nouvelles thérapeutiques dans le traitement de cette maladie psychiatrique coûteuse.

Mots clés : addiction, alcool, cocaïne, métabolisme du cholestérol cérébral, transcription, neuroadaptations.

Abstract

Drug addiction is a chronic brain disease characterized by drug-seeking and compulsive drug taking, a loss of control over drug taking despite the negative consequences and the emergence of a negative emotional state in the absence of the drug. Addiction involves persistent neuroadaptations at the cerebral level. Recent evidences show that cholesterol plays a crucial role in brain function by participating in various cellular processes in particular in the control of neurotransmission. The aim of this thesis was to investigate the potential role of cholesterol in addiction and in particular a potential dysregulation of cholesterol metabolism in response to drugs of abuse. In this work, we investigated the expression of genes encoding proteins involved in the metabolism of cerebral cholesterol after a chronic voluntary consumption of alcohol from the rats and after acute or chronic exposure to cocaine. We analyzed gene expression in brain structures involved in addiction such as the prefrontal cortex, the nucleus accumbens, the amygdala and the hippocampus. We found that exposure to alcohol and cocaine modifies the expression of proteins involved in the synthesis, the transport and the degradation of cholesterol in drug-specific, treatment- specific (acute / chronic) and region-specific manners. In the second part of the thesis, we used a viral approach to overexpress CYP46A1, the cerebral cholesterol degradation enzyme in the prefrontal cortex, in order to evaluate the impact of this overexpression on cocaine-seeking in a model of relapse. The overexpression of CYP in this structure has no effect on drug-seeking for cocaine. Future studies are needed to determine whether altering cholesterol metabolism in other structures, for example the nucleus accumbens, may have beneficial effects on relapse. Altogether these studies show that exposure to drugs of abuse might modulate cerebral metabolism of cholesterol. This thesis project opens new perspectives on the role of cholesterol cerebral metabolism in addiction which may ultimately result in new therapeutic avenues for the treatment of this costly psychiatric disorder.

Keywords: addiction, alcohol, cocaine, cholesterol metabolism, gene expression, neuroadaptations.

Liste des abréviations

24OHC : 24S-hydroxycholesterol

3α-HSOR : 3α-hydroxystéroïde oxydoréductase

AA : Auto-administration

AAIV : AA en intraveineuse

ABC : ATP-binding cassette

AC : Adénylate cyclase

ACAT : Acétyl-CoA acétyltransférase

ACC : Cortex cingulaire antérieur

AlloP : Alloprégnanolone

AMPA : α-amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionique acide

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APA : Association américaine de psychiatrie

ApoD : Apolipoprotéine D

ApoE : Apolipoprotéine E

ApoER2 : Apolipoprotein E receptor 2

ApoJ : Apolipoprotéine J

APOL2 : Apolipoprotein L2

APP : Protéine précurseur d'amyloïde

Arc : Activity-regulated cytoskeletal-associated protein

ATV : Aire tegmentale ventrale

Aβ : Peptide bêta-amyloïde extracellulaire

BHE : Barrière hémato – encéphalique

BLA : Amygdale basolatérale

BNST : Noyau du lit de la strie terminale, Bed Nucleus of the Stria Terminalis

CA 3 : Zone 3 de la corne d'Ammon

CA 1 : Zone 1 de la corne d'Ammon

CeMA : Amygdale centromédiale

CLU : Clusterine

CO : Amygdale corticale

COPII : Coat protein complex II

CPF : Cortex préfrontal

CPFdl : Cortex préfrontal dorsolatéral

CPFm : Cortex préfrontal médian

CRF : Facteur de libération de la corticotropine

CYP46A1 : Cytochrome P450 Family 46 Subfamily A Member 1

DA : Dopamine

DAT : Transporteur de la dopamine

DG : Gyrus denté

DHCR24 : 24-Dehydrocholesterol Reductase

DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

FDFT1 : Farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1

FDPS : Farnesyl diphosphate farnesyl synthase

FPP : Farnesyl pyrophosphate

FTase : Farnesyl transférase

GABA : Acide γ-amino-butyrique

GGPP : Géranylgéranyl pyrophosphate

GGTase : Géranylgéranyl transférase

HDL : High density lipoprotein

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co enzyme A

Htt : Protéine huntingtine

IL : Cortex infralimbique

INSIG : Insulin Induced Gene

IPSCs : Courants inhibiteurs post-synaptiques

KO : Knock-out

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDLr : Low density lipoprotein receptors

LRP1 : LDR related protein type 1

LTD : Long term depression

LTP : Long term potentiation

LXR : Liver X Receptor

MA : Maladie d'Alzheimer

MH : Maladie de Huntington

MSN : Medium Spiny Neurons

NAc : Noyau accumbens

NET : Transporteur de la norépinephrine

NIHAA : Institut national sur l'abus d'alcool et l'alcoolisme

NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique

NPC1/NPC2 : Protéines de type niemman pick 1 et 2

OATP2 : Organic anion transporting polypeptide 2

OFC : Cortex orbitofrontal

OFDT : Observatoire français des drogues et des toxicomanies

P450scc : Cholesterol side-chain cleavage enzyme

PKA : Protéine kinase A

PREG : Prégnénolone

PrL : Cortex prélimbique

RE : Reticulum endoplasmique

RXR : Récepteurs rétinoïdes

SCAP : SREBP Cleavage Activating Protein

SERT : Transporteur de la sérotonine

sGTPases : Petites protéines G

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

Souris APP23 : Modèle murin de la MA

Souris HT : Modèle murin de la MH

Souris THY-Tau22 : Modèle murin de la MA

SRE : Sterol Regulatory Element

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SUD : Substance use disorder

THC : Tétrahydrocannabinol

THDOC : Tetrahydrodeoxycorticosterone

VLDLr : Vey low density lipoprotein receptor

Liste des figures

Figure 1 : Réponse motrice et sensibilisation comportementale induites par des injections répétées de cocaïne. 24
Figure 2 : Schématisation simplifiée montrant la cage d'AA. 25
Figure 3 : Feuille d'Erythroxylum coca. 28
Figure 4 : Schéma représentant une synapse en absence de cocaïne (à gauche) et en présence de cocaïne (à droite). 29
Figure 5 : Mécanisme d'action de l'alcool. 32
Figure 6 : Schéma représentant les différentes structures du système mésocorticolimbique et leurs projections. 36
Figure 7 : Projections et afférences de l'ATV. 38
Figure 8 : Afférences et efférences du NAc. 40
Figure 9 : Représentation des projections dopaminergiques de l'ATV et de la connectivité de l'hippocampe. 43
Figure 10 : Exemples de plasticité synaptique : LTP et LTD. 49
Figure 11 : Structure du cholestérol. 55
Figure 12 : La voie de synthèse du cholestérol. 58
Figure 13 : Régulation de la synthèse de cholestérol via le SREBP et le SCAP. 60
Figure 14 : Mécanisme de la régulation transcriptionnelle induite par les LXRs. 61
Figure 15 : Dégradation de la HMGCoA réductase mediée par l'INSIG. 62
Figure 16 : Transport du cholestérol des astrocytes aux neurones par l'APOE. 63
Figure 17 : Internalisation du cholestérol au niveau des neurones. 64
Figure 18 : NPC1 et NPC2 facilite l'export du cholestérol vers les endosomes tardifs et/ou les lysosomes. 65
Figure 19 : Conversion enzymatique du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol. 66
Figure 20 : Les différents types de radeaux lipidiques. 70
Figure 21 : Structure et synthèse des neurostéroïdes 73
Figure 22 : Les neurostéroïdes: modulateurs de la transmission GABA. 74
Figure 23 : Timeline of the experiment. 138
Figure 24 : Injection of AAVrh10-CYP46A1-HA in the Ant Cing cortex during the withdrawal period does not affect cocaine-seeking behavior. 140
Figure 25:Representative examples of immunostaining obtained at the level of the anterior cingulate cortex of rats injected with the virus AAVrh10-CYP46A1-HA. 142

Figure 26 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau du CPF..... 149
Figure 27 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau du NAc. 151
Figure 28 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'amygdale. 154
Figure 29 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'hippocampe. 155
Figure 30 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'ATV. 156

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de diagnostic de l'addiction selon la DSM-5. 22
Tableau 2 : Tableau regroupant différentes études montrant l'effet des expositions chroniques à la cocaïne sur la plasticité synaptique. 51

Josette ALSEBAALY

Poitiers-France **Date of Birth:** 1st March 1991

Email: josette.alsebaaly@univ-poitiers.com

Mobile: +33 6 59 46 44 56

+961 3 894650

EDUCATION:

2015-2018: Poitiers UNIVERSITY (France) - Saint Joseph University (Lebanon)

PhD in Neuroscience under the supervision of Dr Marcello Solinas, LNEC INSERM 1084 (France) and Prof Lydia Rabbaa Khabbaz, LPCQM (Lebanon).

''Modification de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cérébral du cholestérol par l'exposition à l'alcool et à la cocaïne.''

2014-2015: Saint-Joseph University (Lebanon)

Masters in Experimental and clinical pharmacology. Master 2 research project: supervised by Professeur Lydia Rabbaa Khabbaz and Dr Aline Hajj.

'**Etude de l'expression génique des transporteurs au niveau de la barrière hémato-placentaire**'

2013-2014: Saint-Joseph University: Diploma in Clinical Pharmacy (Lebanon)

2008- 2013: Saint-Joseph University: Pharmacy Doctorate Degree (Pharm D) (Lebanon)

WORK EXPERIENCE:

2017-2018: Teaching in the Clinical pharmacy diploma in Saint-Joseph University (Faculty of Pharmacy)

2017: Part-time assistant professor in Poitiers University (Faculty of sciences)

2009- 2016: Pharmacy based experience, hospital Training and Company Training in Lebanon

SKILLS:

Personal: strong organization, methodical, team spirit, fast learner, self-motivated.

Experimental Behavioral tests: behavioral sensitization, self-administration.

Surgeries: stereotaxic surgery, perfusion, brain extraction

Software: MedAssociates, GraphPad Prism, StatView, Excel, Graphic State, Office.

Languages Arabic (mother tongue)

English (spoken and written) Georges Town University degree

French (spoken and written)

Spanish (Level 1 in the Official Spanish institute of Lebanon)

PUBLICATIONS:

- Josette Alsebaaly, Emilie Dugast, Laure Favot , Lydia Rabbaa Khabbaz , Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. **'Persistent Neuroadaptations in the Expression of Genes Involved in Cholesterol Homeostasis Induced by Chronic, Voluntary Alcohol Intake in Rats'**. Published in Frontiers in Molecular Neurosciences (Front. Mol. Neurosci. 11:457. doi: 10.3389/fnmol.2018.00457)

POSTER PRESENTATION:

- Josette Alsebaaly, Lydia Rabbaa Khabbaz, Emilie Dugast, Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. '**Impact of repeated administration of cocaine on the expression of genes involved in cholesterol metabolism in the rat brain'**. Posted in NeuroFrance, Société des Neurosciences, **Bordeaux,** 2017.
- Josette Alsebaaly, Lydia Rabbaa Khabbaz, Emilie Dugast, Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. '**Impact of repeated administration of cocaine on the expression of genes involved in cholesterol metabolism in the rat brain'.** Posted in Journées scientifique de la SFR Tours Poitiers, **Poitiers**, 2017.
- Josette Alsebaaly, Lydia Rabbaa Khabbaz, Emilie Dugast, Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. '**Impact of repeated administration of cocaine on the expression of genes involved in cholesterol metabolism in the rat brain'.** Posted in the 29th ECNP congress, **Paris**, 2017.
- Josette Alsebaaly, Lydia Rabbaa Khabbaz, Emilie Dugast, Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. '**Impact de l'administration répétée de cocaïne sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le cerveau du rat.**' Posted in the Encéphale**, Paris,** 2018**.**
- Josette Alsebaaly, Lydia Rabbaa Khabbaz, Emilie Dugast, Marcello Solinas, Nathalie Thiriet. '**Impact of acute and repeated administration of cocaine on the expression of genes involved in cholesterol metabolism in the brain'**. Posted in 30th ECNP congress, **Barcelona**, 2018.

OTHER ACTIVITIES:

Member of the « Société Française des Neurosciences ».

Contributing to the « Semaine du Cerveau ».

Contributing to the «Progamme Apprentis Chercheurs MAAD». Supervising of trainees (Master and Licence degrees)

Introduction

Chapitre 1 : Addiction et modèles d'études

I. Addiction

1. Définition et caractéristiques

L'addiction est considérée comme une maladie cérébrale chronique ou récidivante caractérisée par une recherche, une prise compulsive de drogues, une perte de contrôle sur la prise malgré les conséquences négatives et l'émergence d'un état émotionnel négatif (par exemple, dysphorie, anxiété, irritabilité) lors de l'absence de la drogue (Koob and Le Moal, 1997). Elle est aussi caractérisée par un taux élevé de rechute, même après une longue période d'abstinence, alors que les effets aigus du sevrage ont disparu (Kreek et al., 2002).

2. Données épidémiologiques

Les drogues licites, alcool et tabac, restent les produits les plus consommés : 14 millions d'européens âgés entre 11 et 75 ans consomment du tabac chaque jour et 9 millions d'européens consomment de l'alcool plus que 10 fois par mois (OFDT, Observatoire français des drogues et des toxicomanies 2017). Le taux de consommation d'alcool est globalement en baisse en Europe, mais de nouveaux comportements d'alcoolisation ponctuelle importante apparaissent chez les jeunes comme le « binge drinking » (consommation excessive d'alcool sur un temps court) (OFDT 2017).

L'usage de substances illicites a augmenté ces dernières années en Europe. Par exemple, l'OFDT montre en 2017 une augmentation de l'usage de drogues illicites telles que la cocaïne et le cannabis. Pour les drogues illicites, la cocaïne est classée comme étant la seconde substance la plus consommée après le cannabis (1.4 millions de consommateurs réguliers en Europe). Une forte augmentation de sa consommation chez les individus de 15 et 64 ans a été enregistrée en France entre 2010 et 2017. Cette augmentation est liée à l'accès facile à cette drogue et la diminution de son prix (OFDT, www.ofdt.fr).

3. Addiction : un problème d'économie

Le coût externe comprend des coûts touchant les personnes impliquées dans le marché des drogues (valeur des vies humaines perdues, perte de qualité de vie) et ceux touchant indirectement des personnes en dehors du marché des drogues (pertes de production des entreprises et des administrations). Il représente 95,1% du coût social engendré pour l'alcool, contre 85,2% pour le tabac et 67,26% pour les drogues illicites.

Le **coût pour les finances publiques** incluant les dépenses de prévention, les répressions et soins, les économies de retraites non versées, et les recettes des taxes prélevées sur l'alcool et le tabac. Ce coût s'est élevé en 2015 à 22 milliards d'euros, dont près de 5 milliards pour l'alcool, près de 15 milliards pour le tabac et plus de 2,3 milliards pour les drogues illicites, soit 5,8% des dépenses publiques.

Le **coût social** qui englobe le **coût externe** et le **coût des finances publiques** de l'addiction est estimé par le rapport de l'OFTD à 120 milliards d'euros par an pour l'alcool, ainsi que pour le tabac, et 8.8 milliards d'euros pour les drogues illicites.

4. Diagnostic

Pour harmoniser le diagnostic de l'addiction, plusieurs associations ont essayé de mettre en place des classifications des critères ou symptômes qui caractérisent l'addiction. L'Association Américaine de Psychiatrie (APA) a publié en 1952 la première version du Manuel de diagnostic et de statistique des troubles mentaux (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM). Depuis, les critères de diagnostic ont évolué et le DSM a été modifié plusieurs fois, la dernière version étant celle de 2013 et est communément appelée DSM-5.

Le DSM-5 a subi des modifications majeures par rapport à la version précédente (DSM-4):

- Intégration d'un nouveau critère : le '*craving*' défini comme un besoin impérieux de consommer la drogue entrainant l'usage continu de la drogue même si la personne dépendante souhaite s'abstenir.
- Evolution des critères d'inclusion dans la maladie de l'addiction :
    - Dans le DSM-4, les états d'abus et de dépendance sont discernés par deux diagnostics différents. Dans le DSM-5, ces deux termes sont rassemblés par un seul : troubles liés à l'usage de substance ('*Substance use disorder*' ou SUD).
    - 11 critères de diagnostic **(Tableau 1)** permettent de classer l'addiction selon son degré de sévérité : si 2 à 3 critères sont trouvés, la maladie est jugée peu sévère ; si 4 à 5 critères sont trouvés alors un état d'addiction modéré est diagnostiqué. La présence de 6 critères ou plus définit un usage sévère et compulsif.
- Ajout du 'jeu pathologique' comme trouble addictif sans drogue (American Psychiatric Association, 2013; Hasin et al., 2013; O'Brien, 2011). Ce trouble partage plusieurs critères avec les troubles liés à l'usage de substance tels qu'une préoccupation excessive pour le jeu et un besoin de jouer des sommes d'argent croissantes pour atteindre l'état d'excitation désiré (tolérance) (Bosc et al., 2012).

Tableau 1 : Critères de diagnostic de l'addiction selon la DSM-5.

L'addiction aux drogues se caractérise par un mode d'utilisation inadapté d'un produit conduisant à une altération du fonctionnement ou à une souffrance, cliniquement significative, caractérisée par **la présence de deux (ou plus) des manifestations suivantes**, à un moment quelconque d'une **période continue de douze mois** :

1. **Le produit est souvent pris en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu**
2. **Il existe un désir persistant ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation du produit**
3. **Beaucoup de temps consacré à des activités nécessaires pour obtenir le produit, utiliser le produit ou récupérer son effet**
4. ***Craving* ou une envie intense de consommer le produit**
5. **Utilisation répétée du produit conduisant à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison**
6. **Utilisation du produit malgré les problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets du produit**
7. **Des activités sociales, occupationnelles ou récréatives importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation du produit**
8. **Utilisation répétée du produit dans des situations où cela peut être physiquement dangereux**
9. **L'utilisation du produit est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par cette substance**
10. **Tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :**
    1. **Besoin de quantités notablement plus fortes du produit pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré**
    2. **Effet notablement diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité du produit**
11. **Sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :**
    1. **Syndrome de sevrage du produit caractérisé (cf diagnostic du syndrome de sevrage du produit).**
    2. **Le produit (ou une substance proche) sont pris pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.**

II. Modèles comportementaux d'étude de l'addiction utilisés pendant la thèse

1. Modèles utilisés dans le projet « cocaïne »

a. Traitement chronique et sensibilisation comportementale

i. Définition et caractéristiques de la sensibilisation comportementale

La sensibilisation comportementale est définie comme une augmentation progressive de l'activité locomotrice d'un animal suite à plusieurs injections d'une même dose de drogue. Ce phénomène est persistant même après de longues périodes sans drogue (Paulson et al., 1991). Ce phénomène serait la conséquence de neuroadaptations induites par la drogue au sein des structures cérébrales, notamment au niveau des connexions dopaminergiques et glutamatergiques entre l'aire tegmentale ventrale (ATV), le noyau accumbens (NAc), le cortex préfrontal (CPF) et l'amygdale (Pierce and Kalivas, 1997). Une sensibilisation comportementale a été observé en réponse à plusieurs drogues telles que l'alcool (Cunningham and Noble, 1992), la nicotine (Booze et al., 1999), l'amphétamine (Robinson, 1984), la cocaïne (Robinson, 1984), l'héroïne et le Δ9-tetrahydrocannabinol (Cadoni et al., 2001). Le phénomène de sensibilisation peut alors servir comme outil simple pour élucider les mécanismes par lesquels les drogues d'abus induisent des altérations neuronales durables.

ii. Phénomène de « sensibilisation croisée »

Dans certaines études, un phénomène de sensibilisation croisée (ou cross-sensibilisation) a été décrit. Ainsi, un animal ayant reçu des injections répétées d'une drogue donnée montre une activité locomotrice augmentée en réponse à une autre drogue. Des animaux déjà sensibilisés à la cocaïne ou la morphine montrent une activité locomotrice accrue en réponse à une injection d'amphétamine 4 jours plus tard (Lanteri et al., 2008). Ceci suggère que des mécanismes impliqués dans ce phénomène pourraient être commun à toutes les drogues d'abus même si elles agissent de manière différente dans le cerveau.

iii. Phases de la sensibilisation comportementale

La sensibilisation comportementale comporte 2 phases (Steketee and Kalivas, 2011) : l'induction et l'expression

- Induction (ou développement) de la sensibilisation comportementale

Cette phase correspond à l'augmentation progressive de la réponse motrice **(Figure 1)** jusqu'à l'obtention d'un plateau. Les injections de drogues induiraient une activation neuronale qui serait

responsable du développement de la sensibilisation. Après chaque injection de drogue, des adaptations neuronales se mettent en place conduisant à une réactivité des neurones augmentée lors des injections ultérieures. Ces changements d'activation neuronale auraient pour conséquence la réponse motrice augmentée.

- Expression de la sensibilisation comportementale

L'expression de la sensibilisation comportementale consiste à tester la réactivité aux drogues après une période d'abstinence plus ou moins longue. Ainsi, lorsque l'animal reçoit une nouvelle dose de drogue, ils présentent une activité locomotrice plus élevée que celle obtenue après la première injection (Steketee and Kalivas, 2011).

Dans le cas de la cocaïne, cette sensibilisation est observée après plusieurs injections (Kalivas et al., 1988; Mayfield et al., 1992) et pour différentes doses de cocaïne (10 mg/kg, 15 mg/kg , 20 et 30 mg/kg) **(Figure 1)**. La réponse locomotrice apparaît la plus importante pour une dose de 15 mg/kg (Smith et al., 2016) **(Figure 1)**.

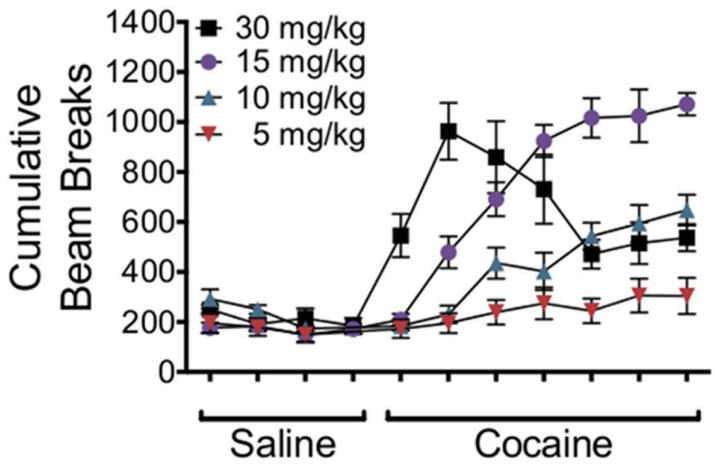


Figure 1 : Réponse motrice et sensibilisation comportementale induites par des injections répétées de cocaïne.

3 jours d'injection de solution saline suivie de 7 jours d'injection de cocaïne à différentes doses (Smith et al., 2016).

La sensibilisation comportementale a été également décrite après une seule injection de drogue. Plusieurs études ont montré qu'une seule injection de cocaïne peut engendrer des neuroadaptations pouvant persister pour une courte période de 1 jour (Jackson and Nutt, 1993) ou une longue période (Valjent et al., 2010). En effet, Valjent et al. ont montré que l' injection d'une seule dose de cocaïne de 20mg/kg induisait une augmentation de l'activité locomotrice observée après l'injection d'une deuxième dose de cocaïne 1 jour et même 3 mois plus tard (Valjent et al., 2010). Ceci suggère que des

neuroadaptations sont aussi induites après une première injection de cocaïne et peuvent persister pendant une longue période.

b. Protocole d'auto administration

L'auto-administration (AA) de drogue est considérée comme le modèle reproduisant au mieux le comportement observé chez l'Homme (O'Connor et al., 2011). Ce modèle requiert un comportement opérant de la part de l'animal, car il apprend à appuyer sur un levier (à faire rentrer son museau dans un trou = 'nosepokes') pour obtenir la drogue et permet ainsi d'évaluer la prise volontaire de drogue chez l'animal (van Ree et al., 1978). L'AA se fait généralement par voie orale ou par voie intraveineuse. Le protocole d'AA en intraveineuse (AAIV) était mis en place au début des années 60 chez les rats (Weeks, 1962) et chez les singes (Thompson and Schuster, 1964).

• Déroulement du protocole d'AAIV

Dans ce modèle, l'animal subit au préalable une chirurgie pour insérer un cathéter dans la veine jugulaire. Dans la cage d'AA, ce cathéter est connecté à une pompe automatique pouvant délivrer la drogue. Durant la session d'AA, l'animal a accès à 2 leviers [ou nosepokes (Chauvet et al., 2012)] : l'un activant la pompe conduisant à une injection de la drogue lors de l'appui (levier actif), et l'autre qui n'est pas actif (levier inactif) **(Figure 2)**. Lors de l'appui sur le levier actif, une dose de la drogue est délivrée à l'animal et une lumière située au-dessus du levier se déclenche (stimulus lumineux). Ce stimulus sera associé aux effets de la drogue.

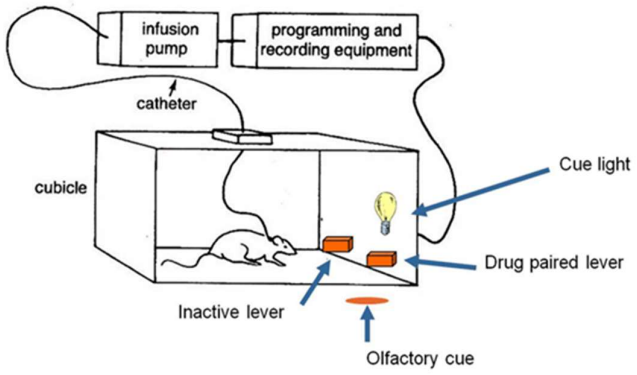


Figure 2 : Schématisation simplifiée montrant la cage d'AA.

En plus de son effet renforçant direct, la drogue produit des effets conditionnés. Elle peut donner des propriétés motivationnelles aux stimuli environnementaux qui lui sont associés (stimulus lumineux ou sonore présent dans la cage d'AA). Ces stimuli, initialement sans effet, acquièrent après l'apprentissage, une valeur motivationnelle qui sera associée à la drogue. Ainsi le fait de placer

l'animal dans le même contexte environnemental en présence de ces stimuli déclenche un comportement de recherche et de prise de drogue.

En plus de tester la prise de drogues, le modèle d'AA permet aussi d'évaluer la rechute chez les animaux. La rechute est mise en évidence par la ré-apparition d'un comportement de recherche après extinction. Plus précisément dans ce modèle, après une certaine période d'abstinence (ou non), l'animal est remis dans les mêmes conditions de l'AA en absence de la drogue (extinction) et un test de rechute est exécuté. La rechute est ainsi mesurée par le nombre d'appui (ou de nose pokes) sur le levier initialement actif pendant une session. Cette procédure, nommée extinction-réinstallation, présente le modèle de rechute le plus utilisé (Bossert et al., 2013).
Trois facteurs ont été décrits comme précipitant la rechute : le stress, les indices environnementaux et l'exposition à de la drogue elle-même (de Wit and Stewart, 1981; Epstein et al., 2006). Dans le modèle d'AAIV, ces 3 facteurs peuvent être modélisés par un choc électrique ou une injection de yohimbine (stress), une apparition des stimuli conditionnés (environnement) ou une injection de la drogue nommée aussi priming (exposition à la drogue elle-même).

2. Modèle utilisé dans le projet « Alcool » : Prise intermittente d'alcool

L'addiction à l'alcool se caractérise par une escalade progressive caractérisé par un passage d'une consommation modérée d'alcool à une consommation excessive et par des cycles répétés d'intoxication, abstinence, envie et rechute (Koob, 2003; Koob and Volkow, 2010; Vengeliene et al., 2008). Par conséquent, les modèles animaux pouvant engendrer une escalade de consommation excessive d'éthanol via des cycles répétés d'accès libre à l'éthanol et d'abstinence sont particulièrement utiles pour étudier ces aspects de l'abus d'alcool. L'addiction à l'alcool peut être modélisée chez les animaux suite à une exposition à l'alcool grâce à des injections répétées intrapéritonéales d'éthanol ou des inhalations forcées d'éthanol ou suite à une exposition volontaire lors de l'auto-administration opérante de l'éthanol et de prises orales d'alcool (Ripley and Stephens, 2011). La consommation volontaire d'alcool chez des rats de laboratoire a été traditionnellement obtenue par des procédures d'initiation, telles que le 'sucrose fading' (où l'éthanol est mélangé avec des solutions sucrées pour masquer le goût aversif de l'éthanol) (Samson, 1986) ou la privation d'eau / de nourriture (Meisch and Thompson, 1972). Cependant, la prise d'éthanol diminue souvent lors de la suppression des facteurs d'initiation (Simms et al., 2008). La procédure d'accès intermittent à l'éthanol consistant à présenter de 2 bouteilles, a été décrit pour la première fois au début des années 1970 (Wayner and Greenberg, 1972; Wise, 1973). Ces études ont montré que des cycles répétés de consommation d'éthanol et d'abstinence, conduisent à une augmentation progressive de la consommation d'éthanol et de la

préférence pour l'alcool, atteignant ainsi un niveau stable après plusieurs semaines. Comparée à des protocoles utilisant un accès continu à l'éthanol, cette procédure donne des niveaux considérablement plus élevés de consommation d'éthanol (allant jusqu'à 9g/kg/24h) (Wayner and Greenberg, 1972; Wise, 1973). Ce paradigme a été ré-utilisé de plus en plus dans la dernière décennie en raison de sa simplicité et de sa grande validité (Carnicella et al., 2008, 2009; Simms et al., 2008).

- ### Détails du protocole utilisé

Dans le modèle de prise intermittente d'alcool, les rats sont hébergés individuellement afin d'évaluer leur consommation individuelle. Un jour sur deux, les rats 'alcool' ont accès pendant 24 heures à deux bouteilles, l'une contenant la solution d'éthanol à 20% et l'autre contenant de l'eau du robinet, permettant une consommation volontaire d'alcool. Lors de chaque exposition, l'emplacement de la bouteille d'éthanol est modifié pour éviter les préférences latérales. La consommation d'éthanol et d'eau est mesurée 24 h après le début de la séance. Au début de cette procédure, les rats consomment des quantités relativement faibles d'éthanol (<2,5 g/kg/24 h) (Simms et al., 2008). Cependant, au bout de 3 à 4 semaines d'entraînement, la consommation augmentent progressivement pour arriver à des consommations beaucoup plus élevées, 5-6 g/kg/24 h, avec une préférence de 50% d'éthanol (Carnicella et al., 2008, 2009; Simms et al., 2008). Cette escalade graduelle et le passage d'une consommation modérée à une consommation excessive d'alcool pourrait mimer la transition de la consommation modérée "sociale" à la consommation excessive d'alcool chez l'homme (Ahmadiantehrani et al., 2014). De plus, Carnicella et ses collègues ont montré qu'environ un tiers de la quantité totale d'éthanol consommée tout au long de la session de 24 heures est consommé dans les 30 premières minutes, générant une concentration d'éthanol sanguine supérieure à 80 mg/dl (Carnicella et al., 2009). Ces observations miment les critères de l'Institut National sur l'Abus d'Acool et l'Alcoolisme (NIAAA) pour la consommation excessive d'alcool chez l'homme.

Chapitre 2 : Mécanismes impliqués dans l'addiction

I. Mécanismes d'action des drogues

1. Cocaïne

a. Présentation

La cocaïne (ou benzoylméthylecgonine) est une des drogues illicites largement utilisée. Cette drogue est un alcaloïde de tropane dérivé des feuilles d'Erythroxylum coca **(Figure 3)**. C'est une drogue stimulante ayant des effets de suppression d'appétit et pouvant entraîner une anesthésie lors de son administration à faibles doses (Dawson and Moffatt, 2012).



Figure 3 : Feuille d'Erythroxylum coca.

Elle se présente généralement sous forme de poudre blanche utilisée en inhalation, mais peut être trouvée aussi sous forme de cristaux solides appelés «crack». Le "Crack" est la forme de cocaïne, qui est transformée pour former un cristal (aussi appelé «cocaïne freebase») qui peut être fumé. Les cristaux sont chauffés pour produire une vapeur qui est absorbée dans le flux sanguin à travers les poumons (Estroff, 2001). C'est la forme la plus addictive de la cocaïne. Les consommateurs de cocaïne recherchent les effets euphorisants de la cocaïne (sentiment de bien-être), ainsi qu'une augmentation de la confiance en soi et de la vigilance (Isenschmid, 2002).

b. Toxicité à court et long terme

La consommation de cocaïne peut causer des effets toxiques indésirables. Les premiers signes cliniques de toxicité de la cocaïne sont généralement des palpitations, l'épistaxis, la transpiration, les maux de tête, les tremblements, les spasmes musculaires et l'hyperventilation (Nnadi et al., 2005). La consommation de cocaïne peut mener à des crises d'épilepsie, à des neuropathies optiques, à des hémorragies intracérébrales, à des ischémies cérébrales multifocales, à une atrophie cérébrale ainsi

qu'à des infarctus du myocarde pouvant déclencher une ischémie cérébrale globale et un œdème (Pereira et al., 2015).

c. Cibles moléculaires de la cocaïne

Le mécanisme d'action principal de la cocaïne consiste en sa fixation aux transporteurs des monoamines qu'elle inhibe (Han and Gu, 2006). Ces transporteurs des monoamines, la dopamine (DAT), la norépinephrine (NET) et la sérotonine (SERT), sont des protéines transmembranaires, qui en conditions physiologiques, captent les monoamines au niveau de la fente synaptique vers le compartiment pré-synaptique (pour revue : (Aggarwal and Mortensen, 2017)). Cette recapture est responsable de la terminaison de la neurotransmission. Après recapture, les monoamines sont dégradées ou stockées à nouveau dans des vésicules de stockage. Par conséquent, en présence de cocaïne, les monoamines, s'accumulent dans l'espace extracellulaire et les neurotransmissions sont actives de façon plus intense et plus prolongée **(Figure 4)**. Bien que la cocaïne inhibe aussi les transporteurs de la norépinephrine et la sérotonine, ses actions au sein du système dopaminergique semblent principalement impliquées dans les effets renforçants et psychomoteurs de cette drogue (Hall et al., 2004).

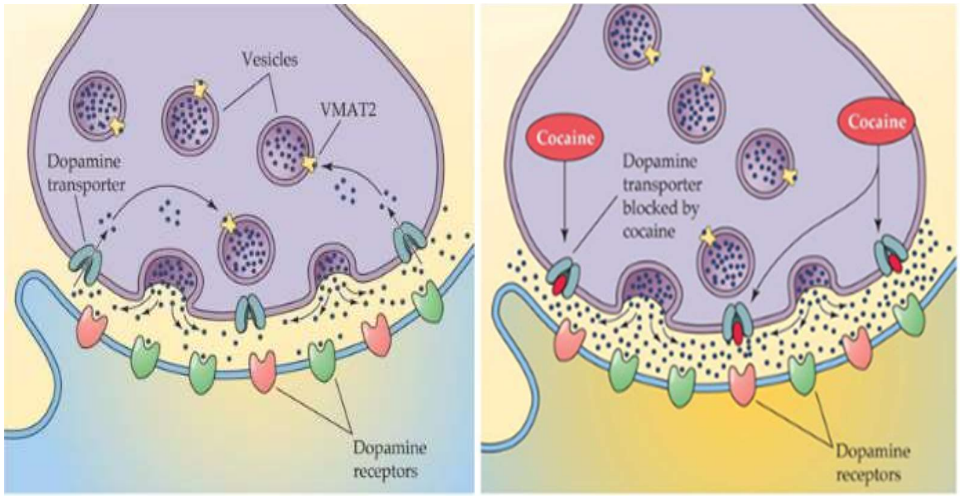


Figure 4 : Schéma représentant une synapse en absence de cocaïne (à gauche) et en présence de cocaïne (à droite).

La cocaïne se fixe sur le transporteur de la dopamine bloquant ainsi sa recapture. Ce blocage engendre alors une augmentation de la dopamine au niveau synaptique, qui sera par la suite responsable de la potentialisation de la neurotransmission dopaminergique (McFarland and Kalivas, 2001).

i. Effets de la fixation de la cocaïne sur le transporteur dopaminergique

Des études de microdialyse *in vivo* ont montré une augmentation de la concentration de dopamine (DA) au niveau des synapses du NAc et du striatum dorsal suite à l'administration de cocaïne aiguë

(Di Chiara and Imperato, 1988). Cette augmentation a également été décrite dans l'ATV (Reith et al., 1997) et dans le CPF (Maisonneuve et al., 1990). De plus, suite à une administration intrapéritonéale de cocaïne, une augmentation de l'activité locomotrice a été observée (Yeh and Haertzen, 1991). De façon intéressante, des souris n'exprimant pas le DAT (knock out), recevant des injections répétées de cocaïne ne présentent pas d'augmentation d'activité locomotrice comme celle décrite chez les souris sauvages (Chen et al., 2006; Giros et al., 1996; Rocha, 2003). Toutefois, ces souris ont une activité basale plus élevée, ce qui a amené les chercheurs à conclure que l'activité locomotrice accrue observée lors de l'administration de cocaïne (aiguë ou répétée) serait médiée par son action sur le DAT. De façon surprenante, dans un protocole d'AA de cocaïne, ces souris acquièrent et maintiennent quand même le comportement d'AA. Ceci suggère que la cocaïne interagit avec d'autres cibles que la DAT, comme par exemple le NET ou le SERT , qui pourrait participer à la mise en place et au maintien d'une auto-administration de cocaïne chez ces souris DAT -/- (Rocha, 2003).

ii. Conséquence de la libération de la dopamine au niveau de la synapse : activation des récepteurs dopaminergiques

Suite à son accumulation dans la fente synaptique, la DA se fixe à des récepteurs ce qui active des voies de transduction spécifiques. Les récepteurs dopaminergiques, qui sont des récepteurs couplés aux protéines G, sont codés par 5 gènes différents. Ils sont divisés en deux sous- familles suivant la nature de la protéine G à laquelle ils sont couplés:

- la famille des récepteurs de type D1, comprenant les sous-types D1 et D5 couplés à la protéine Gs qui augmente l'activité de l'adénylate cyclase.
- la famille des récepteurs de type D2 comprenant les sous types D2, D3, D4 couplés à la protéine Gi qui diminue l'activité de l'adénylate cyclase et autres effecteurs tels que les canaux calciques de type L (Pour revue Jaber et al., 1996).

Les récepteurs de type D1 se trouvent strictement au niveau post synaptique. Quand les récepteurs D1 sont activés par la fixation d'un agoniste, ils induisent la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) suite à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) par la protéine Gs. La formation de l'AMPc va activer plusieurs cibles dont la protéine kinase A (PKA) (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994). Les réactions qui s'ensuivent déclencheront une dépolarisation causant alors une augmentation de la fréquence d'émission des potentiels d'action au niveau post-synaptique (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

Les récepteurs de type D2 se trouvent au niveau présynaptique et au niveau post synaptique. Au niveau présynaptique, ils jouent un rôle d'auto-régulateur de la synapse en contrôlant la synthèse et la libération des neurotransmetteurs (Wolf and Roth, 1990). Ceci permet un rétrocontrôle négatif et

aboutit à une diminution de la libération de neuromédiateur au niveau présynaptique en inhibant son exocytose. Au niveau post-synaptique, lorsque les récepteurs dopaminergiques de type D2 lient la DA, la protéine Gi induit une diminution du taux d'AMPc en inhibant l'AC et induisant une diminution de l'activité de la PKA. Cette diminution engendre une hyperpolarisation au niveau postsynaptique (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Jaber et al., 1996).

2. Alcool : Cibles moléculaires

L'éthanol interagit principalement avec deux récepteurs membranaires: des récepteurs de type ionotropique qui lient l'acide γ-amino-butyrique (GABA) et l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (pour revue Erdozain and Callado, 2014). La conséquence de l'action de l'alcool sur ces cibles moléculaires est une modulation d'autres systèmes tels que le système dopaminergiques et opioïdes (Erdozain and Callado, 2014). En outre, les systèmes sérotoninergique, noradrénergique, le système libérant la corticotropine ainsi que le système cannabinoïde semblent jouer un rôle important dans la neurobiologie de l'alcoolisme (Erdozain and Callado, 2014; Gilpin and Koob, 2008) **(figure 5)**. Dans le paragraphe suivant, nous nous focaliserons sur l'action de l'alcool sur le système glutamatergique et gabaergique.

a. Effet de l'alcool sur le système gabaergique

i. Présentation du système GABA

Le GABA ou acide γ-amino-butyrique est le principal neurotransmetteur ayant un effet inhibiteur dans le cerveau (Barnard et al., 1998; Gilpin and Koob, 2008; Obata, 2013). Les récepteurs gabaergiques sont classifiés en deux sous-types : GABAA et GABAB (Chebib and Johnston, 1999). Le complexe protéique du récepteur GABAA est composé de cinq sous-unités, assemblées pour former un canal dans la membrane plasmique permettant le passage des ions chlorure. L'activation du récepteur mène à l'ouverture du canal, permettant l'entrée d'ions chlorure, produisant une hyperpolarisation de la membrane et une diminution de l'excitabilité neuronale (Baur et al., 2006). Le récepteur GABAB est un récepteur métabotropique couplés à une protéine Go/Gi inhibitrices (Chebib and Johnston, 1999). Au niveau présynaptique, l'activation de ces récepteurs inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et des canaux calciques voltages dépendants bloquant ainsi la libération des neurotransmetteurs. Au niveau post-synaptique, leur activation entraîne une inhibition des canaux cationiques, entraînant une hyperpolarisation de la membrane et une diminution de l'excitabilité neuronale (Bowery et al., 2002). Le système GABAergique joue un rôle important dans les effets comportementaux de l'éthanol. En effet, l'éthanol active les récepteurs GABAA (Chebib and Johnston, 1999). Ils se lient aux différentes

parties du récepteur, soit dans la région extracellulaire ou au niveau du domaine du canal, modulant donc l'activité du canal anionique.

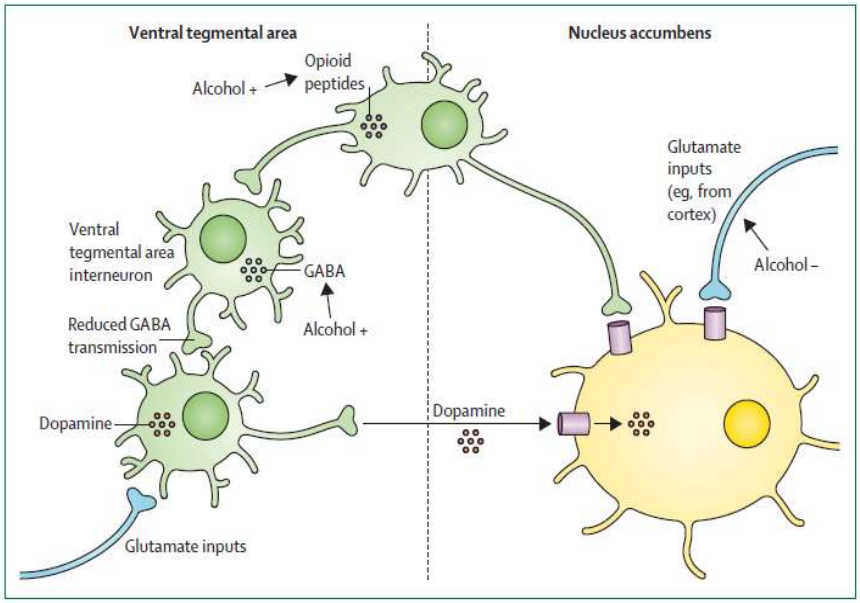


Figure 5 : Mécanisme d'action de l'alcool.

L'alcool stimule la libération des opioïdes endogènes et l'activité des récepteurs GABA (marquée par «Alcohol +») dans l'ATV, et inhibe la libération du glutamate au niveau des terminaisons nerveuses projetant vers les neurones dopaminergiques au niveau du NAc (marqué par "Alcool–"). Ces actions favorisent la transmission dopaminergique (Connor et al., 2016).

ii. Conséquences de l'exposition aiguë à l'alcool sur le système GABA

L'exposition aiguë à l'éthanol engendre une potentialisation de l'activité des récepteurs GABAergiques. L'alcool se fixe directement aux récepteurs GABAA engendrant ainsi les effets comportementaux tels que les effets sédatifs, anxiolytiques et moteurs par une amplification des inhibitions GABAergiques (Lobo and Harris, 2008). Une exposition des coupes hippocampique de rat à l'éthanol augmente la fréquence spontanée et l'amplitude des courants inhibiteurs post-synaptiques (IPSCs) cela suggère que l'exposition aiguë l'éthanol active les récepteurs GABA et stimule la libération de GABA (Carta, 2004; Sanna, 2004). L'augmentation de la transmission gabaergique est observée dans l'hippocampe (Carta et al., 2003), dans le NAc (Crowder et al., 2006; Nie et al., 2000), et dans l'amygdale (Roberto et al., 2003). Cette augmentation de l'effet inhibiteur de GABA sera responsable de l'effet sédatif de l'exposition aiguë à l'alcool.

iii. Conséquences de l'exposition chronique à l'alcool sur le système GABA

L'exposition chronique à l'alcool désensibilise les récepteurs GABA en parallèle à une augmentation de la neurotransmission glutamatergique (détaillée dans le paragraphe suivant). L'administration

chronique d'éthanol induit une altération de l'expression des sous-unités des récepteurs GABA dans différentes structures du cerveau. Une exposition chronique à l'éthanol cause une augmentation de la sous unité α4 du récepteur GABA au niveau du cortex cérébral et de l'hypothalamus (Devaud et al., 2002). En effet, Kumar et al. ont montré une diminution de l'expression de la sous-unité α 1 du récepteur GABAA dans des cellules corticales en culture en réponse à un traitement par l'éthanol (Kumar et al., 2010). Ces récepteurs contenant plus de sous unité α 4 et moins de α 1 seront moins sensibles à l'alcool. Ceci peut être responsable du développement de la tolérance à l'éthanol (Liang et al., 2006).

De plus, Cagetti et al ont montré que l'exposition chronique à l'éthanol engendre des changements dans la fonction du récepteur GABAA au niveau de l'hippocampe chez les rats ayant subi une exposition intermittente à l'alcool suivie par 2 jours d'abstinence (Cagetti, 2003), tels qu'une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs (mIPSCs). Cette diminution correspond à une augmentation de l'excitabilité neuronale (Kumar et al., 2010) .

b. Effet de l'alcool sur le système glutamatergique

i. Présentation du système glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central et est aussi impliqué dans les effets pharmacologiques de l'éthanol. Les récepteurs au glutamate sont répartis en deux groupes. Le 1er groupe correspond à des récepteurs **ionotropiques** et comprend les récepteurs NMDA, AMPA ou α-amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionique acide et kainate (Traynelis et al., 2010). Le récepteur NMDA est composé de quatre sous-unités formant un canal cationique. L'activation du récepteur conduit à une augmentation de la perméabilité du canal pour les cations Na^+, K^+, et principalement pour Ca^{2+}, entraînant une dépolarisation de la membrane neuronale (Traynelis et al., 2010). Le récepteur AMPA est également un récepteur tétramérique, constitué de deux paires de sous-unités (Glur1 à GluAr4). Il est principalement perméable aux ions Na^+ et K^+. Dans les conditions basale, les récepteurs AMPA sont souvent constitués de sous-unités Glur2 associé à Glur1 ou Glur3 (Dingledine, 1999), ces récepteurs ne sont pas perméables aux Ca^{2+}. Quand les récepteurs AMPA sont dépourvus de Glur2, ils sont plus perméables au Ca^{2+} et ont une plus grande conductance (Isaac et al., 2007; Washburn and Dingledine, 1996).

Le deuxième groupe correspond à des récepteurs **métabotropiques** classés en trois sous-groupes en fonction de la séquence de leur gène plus ou moins homologue, de leur pharmacologie et de la voie de transduction à laquelle ils sont couplés. Le groupe 1 comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5, qui sont couplés positivement à une protéine Gq, le groupe 2 comprend les récepteurs mGluR2 et mGluR3

et le groupe 3 comprenant les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Tous les mGluRs du groupe 2 et 3 sont couplés à une protéine Gi/Go (Niswender and Conn, 2010).

Une exposition aiguë à l'alcool réduit les niveaux de glutamate extracellulaire dans le striatum (Carboni et al., 1993) et diminue la transmission glutamatergique dans le noyau central de l'amygdale (Roberto, 2004). L'action de l'éthanol au sein du système glutamatergique repose principalement sur ses effets sur les récepteurs de type ionotropes particulièrement sur les récepteurs NMDA car ces derniers sont les plus sensibles aux effets de l'éthanol, même si les récepteurs AMPA et kainate sont également modulés par cette drogue (Dodd et al., 2000).

ii. Conséquences de l'exposition aiguë à l'alcool sur le système glutamatergique

Une exposition aiguë à l'éthanol inhibe le courant médié par les récepteurs NMDA sur des neurones en culture (i.e. *in vitro*) (Lovinger et al., 1989). Une diminution de la concentration en glutamate extracellulaire est observée suite à une injection aigüe d'alcool (2g/kg) dans une étude de microdialyse *in vivo* dans le noyau accumbens chez le rat (Carboni et al., 1993). Les récepteurs NMDA sont les plus sensibles aux effets de l'alcool (Hoffman et al., 1989) et sont impliqués dans la plasticité synaptique induite par l'éthanol. L'éthanol en aigu inhibe le phénomène de potentialisation à long terme, qui est important dans l'apprentissage et dans la mémoire observé dans le cadre de l'addiction à l'alcool (De Ferron et al., 2016; Morrisett and Swartzwelder, 1993), via les récepteurs NMDA (Givens and McMahon, 1995).

iii. Conséquences de l'exposition chronique à l'alcool sur le système glutamatergique

L'exposition chronique à l'alcool favorise une augmentation de la densité en récepteurs au glutamate. Ce ci engendre une amplification de la transmission glutamatergique dépendantes de la NMDA causant une hyperglutamatergie observée lors de l'exposition chronique à l'éthanol. Cette hyperglutamatergie NMDA-dépendante est associée à une favorisation de la mémoire et de l'apprentissage associés aux drogues (Bernier et al., 2011).

Une consommation chronique d'éthanol produit une augmentation du nombre des récepteurs glutamatergiques ainsi qu'une augmentation de l'affinité du récepteur pour ses ligands (Hoffman and Tabakoff, 1994). L'expression des sous unités du récepteur NMDA est aussi altérée. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression des gènes ainsi que les protéines des sous unités des récepteurs NMDA suite à l'exposition chronique à l'éthanol chez les rongeurs (Snell et al., 1996; Trevisan et al., 2008). Une augmentation de l'expression de la sous unité GluN2B et une diminution de GluN2A sont observés après une prise chronique d'alcool (Meinhardt et al., 2013). Après l'arrêt de la consommation de l'éthanol une augmentation de la libération de glutamate au niveau du NAc

(Dahchour et al., 1998), du striatum (Rossetti and Carboni, 1995) et de l'hippocampe (Dahchour and De Witte, 1999) est observée. Cette augmentation apparait directement 24 h après l'arrêt de l'exposition à l'éthanol (Melendez et al., 2005).

De plus, suite à une courte période d'abstinence, une augmentation du taux de glutamate au niveau synaptique était observée au niveau du NAc suite à un protocole d'exposition chronique par inhalation de vapeurs d'éthanol (Dahchour and De Witte, 2003). Cette augmentation était également observé suite à une abstinence plus prolongée (7 jours) (Griffin et al., 2014). Cette augmentation du glutamate était observée chez des sujets alcoolo-dépendant au niveau du cortex préfrontal dorsomédian (mesurée par spectroscopie du proton par résonance magnétique), et est accompagnée par des niveaux de craving élevés (Frye et al., 2016). L'activation glutamatergique se produisant à court terme, joue un rôle important dans le syndrome de sevrage alcoolique, y compris le delirium tremens ainsi que les crises épileptiques observées lors de l'arrêt de cette drogue (Hughes, 2009).

II. Structures cérébrales ciblées par les drogues d'abus

Les drogues d'abus, quel que soit leur mode d'action cellulaire, vont entrainer une stimulation de la neurotransmission dopaminergiques, qui constituent le système mésocorticolimbique. Les changements au sein de ce circuit seraient en partie responsables de l'addiction. L'action des de la cocaïne et de l'alcool au sein de ce système sera présentée dans ce qui suit.

1. Anatomie du système système mésocorticolimbique

Le système mésocorticolimbique est un circuit neuronal divisé principalement en deux voies : la voie mésolimbique et la voie mésocorticale. La voie mésolimbique est constituée des neurones dopaminergiques provenant de l'ATV et projetant vers le NAc, l'amygdale et l'hippocampe, et la voie mésocorticale est constituée des neurones de l'ATV projetant vers le CPF, le cortex cingulaire antérieur (ACC) ainsi que le cortex orbitofrontal (OFC) **(Figure 6)**. Le système mésocorticolimbique associe une sensation de plaisir/récompense aux activités promouvant la survie de l'espèce telles que la prise de nourriture, la reproduction, les interactions sociales (Volkow, 2010). En parallèle, ces activités conduisent aussi à l'activation des centres de la mémoire comme l'hippocampe afin de mémoriser et reproduire ces activités, et y associer l'environnement dans lequel la récompense a été obtenue pour que le comportement soit reproduit (Miendlarzewska et al., 2016). La récompense est principalement médiée par la DA. Lorsque la transmission dopaminergique est stimulée, elle produit une sensation agréable.

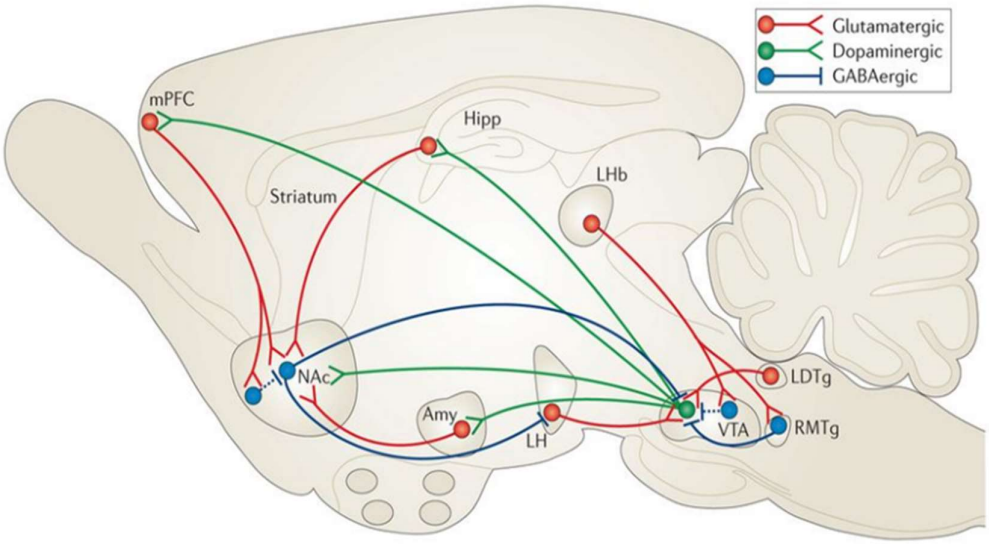


Figure 6 : Schéma représentant les différentes structures du système mésocorticolimbique et leurs projections.

Les projections dopaminergiques (en vert) provenant de l'ATV et projetant vers le NAc et le CPF libèrent de la dopamine en réponse à des stimuli liés à la récompense. Ils sont contrôlés par les neurones glutamatergiques (en rouge) ayant un pouvoir excitateur, et les neurones gabaergiques ayant un pouvoir inhibiteur. Les neurones glutamatergiques provenant du CPF, de l'amygdale (AMY) et de l'hippocampe (HIPP) projettent principalement en direction du NAc. Les neurones GABAergiques provenant du NAc projettent principalement en direction de l'ATV. Abbréviations : NAc: noyau accumbens, VTA : aire tegmentale ventrale, PFC : cortex préfrontal, AMY : amygdale, LH: hypothalamus latéral, HIPP : Hippocampe(Russo and Nestler, 2013).

2. Principales structures constituant le système de mésocorticolimbique

a. L'aire tegmentale ventrale (ATV)

i. Présentation

L'ATV est une région cérébrale hétérogène composée en grande partie de neurones dopaminergiques (60-65%), des neurones GABAergiques (~ 30-35%), qui régulent l'activité des neurones dopaminergiques (Nair-Roberts et al., 2008), et une plus faible proportion des neurones glutamatergiques (2-3%) (Nair-Roberts et al., 2008; Swanson, 1982).

ii. Projections

Grâce aux études fonctionnelles, une hétérogénéité a pu être démontrée parmi les neurones dopaminergiques de l'ATV. En effet, deux sous-types ont été caractérisés en fonction de leurs projections : un sous type projette vers le Nac, l'amygdale et l'hippocampe (mésolimbiques) et l'autre projette vers le CPF (mésocorticaux) **(Figure 7)**. Ces sous-types de neurones se distinguent par ailleurs

par leurs propriétés électrophysiologiques distinctes (Lammel et al., 2008, 2014). Par exemple, un stimulus récompensant (cocaïne) module sélectivement les neurones dopaminergiques qui projettent vers le NAc, contrairement à un stimulus aversif (injection de formol dans la patte arrière) qui module plutôt les neurones dopaminergiques projettant vers le cortex préfrontal médian (CPFm) (Lammel et al., 2011). Des différences peuvent être aussi observées au niveau des conséquences comportementales induites : l'activation des neurones glutamatergiques dans le tegmentum dorsolatéral qui stimulent les neurones dopaminergiques de l'ATV projetant vers le NAc induit une récompense, tandis que l'activation des neurones glutamatergiques de l'habenula latérale qui innervent les neurones dopaminergiques de l'ATV projetant vers le CPFm induit une aversion (Lammel et al., 2012).
Les neurones GABAergiques modulent l'activité des neurones dopaminergiques (Tan et al., 2012; Van Zessen et al., 2012) et projettent vers le pallidum ventral, l'hypothalamus latéral, et à une proportion mineure vers l'amygdale, le CPF et le NAc (Brown et al., 2012; Carr and Sesack, 2000; Smith et al., 2016). Ces neurones sont régulés par des afférences ayant un pouvoir inhibiteur provenant du NAc et par des afférences ayant un pouvoir excitateur provenant du CPF (Stuber et al., 2012).

i. Rôle dans l'addiction

La stimulation des neurones dopaminergiques de l'ATV et la libération de DA au niveau des sites de projection, notamment le NAc, produit des effets récompensants. Les études ont montré l'implication de l'ATV de manière critique dans les effets induits par les drogues d'abus. En effet, l'ATV est requise pour la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (Vanderschuren and Kalivas, 2000). Par exemple, des injections répétées de cocaïne dans le cadre d'une sensibilisation comportementale engendre une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine au niveau de cette structure ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice de façon dose-dépendante (Kalivas and Duffy, 1993).

De plus, elle joue également un rôle dans la réinstallation du comportement d'auto-administration suite à un stress, un stimulus environnementale (cues) ou à une injection de drogues chez les rats entrainés à l'auto-administration de cocaïne (Kalivas et al., 2005; Kalivas and McFarland, 2003; Mahler et al., 2014; McFarland and Kalivas, 2001). Par exemple, dans une étude de Kalivas et al., l'inactivation de l'ATV en utilisant des agonistes gabaergiques (baclofène et muscimol) prévient la recherche de drogues suite à une injection de cocaïne (priming) dans un modèle de rechute chez le rat (Kalivas et al., 2005).
Cette structure joue également un rôle dans l'addiction à l'alcool. L'ATV est impliquée dans la sensibilisation comportementale induite par l'alcool (Didone et al., 2016). Des microinjections

d'agonistes dopaminergiques D2 au niveau de cette structure (l'ATV antérieure), inhibant l'activité dopaminergique chez des rats préférant de l'alcool (P), diminue les réponses opérantes pour l'éthanol (Nowak et al., 2000). De plus, les rats préférant l'alcool (P) s'auto-administrent l'éthanol directement dans cette structure (Gatto et al., 1994).

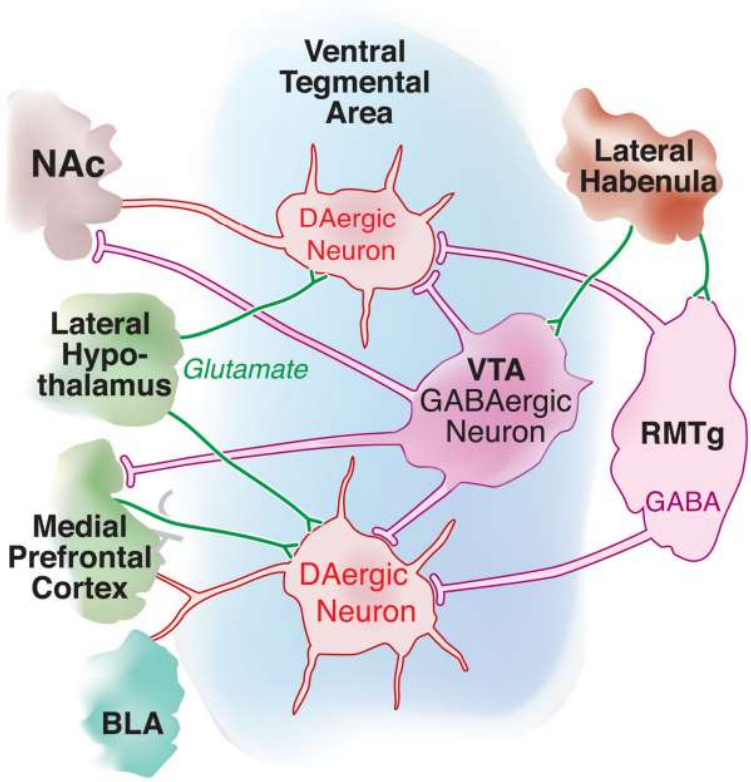


Figure 7 : Projections et afférences de l'ATV.

Les neurones dopaminergiques de l'ATV projettent vers la BLA, le CPFm et le NAc. Ces neurones reçoivent des afférences excitatrices provenant de l'hypothalamus latéral, du CPFm, et des afférences inhibitrices provenant de l'amygdale. Les neurones gabaergiques de l'ATV projettent vers les neurones dopaminergiques voisins ainsi que vers le CPFm et le NAc. Ces neurones reçoivent également des afférences excitatrices provenant de l'habenula latérale et des afférences inhibitrices du NAc (Stuber et al., 2012).

Les comportements dépendant de l'ATV sont souvent médiés par les neurones dopaminergiques, mais des preuves de plus en plus nombreuses montrent l'implication de neurones non dopaminergiques de l'ATV dans la régulation du comportement addictif. Des études utilisant des techniques d'optogénétiques ont montré que l'activation des neurones GABA de l'ATV produit une aversion en temps réel par inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques et une inhibition de ces neurones produit une préférence pour la drogue (Tan et al., 2012; Van Zessen et al., 2012).

Pour conclure, l'activation dopaminergique au niveau de cette structure, sera à la base des renforcements des connexions avec les autres structures du système mésocorticolimbique. Ceci va être responsable des neuroadaptations responsable de l'installation de l'addiction.

b. Le noyau accumbens (NAc)

i. Présentation

Le NAc est une structure située dans la partie ventrale du striatum et qui est constituée de deux sous-régions différentes du point de vue morphologique et fonctionnel : le core et le shell (Di Chiara, 2002; Záborszky et al., 1985). Cette structure est indispensable pour le traitement et l'intégration des informations capable d'associer une valeur renforçante et récompensante à un stimulus (Di Chiara, 2002).

ii. Projections

Dans cette structure, la dopamine exerce ses effets via l'activation des récepteurs dopaminergiques situés sur les neurones de projection épineux de taille moyenne ou « MSN » (*Medium Spiny Neurons*), qui forment 95% des cellules du NAc. Les MSN sont des neurones de projection GABAergiques **(Figure 8)**. Ils sont séparées en 2 classes suivant le type de récepteurs dopaminergiques exprimés à leur surface (MSN de type D1 et D2) et les neuropeptides qu'ils libèrent (dynorphine ou enképhaline) (Matamales et al., 2009), ainsi que leurs sites de projections (voie directe et indirecte). Les MSN exprimant les récepteurs de type D1 constituent la voie directe et projettent directement vers l'ATV et les MSN de type D2 forment la voie indirecte et projettent vers l'ATV avec un relai vers le pallidum ventral. Cette division stricte entre les deux types de MSNs est cependant controversée dans le NAc (Bertran-Gonzalez et al., 2010; Matamales et al., 2009). Les MSN du NAc reçoivent des projections glutamatergiques provenant de plusieurs régions limbiques et corticales, tels que le CPF, l'hippocampe ventral (vHIPP), et l'amygdale basolatérale (BLA) et des afférences dopaminergiques de l'ATV (Floresco, 2015; Sesack and Grace, 2010). Ces afférences donnent à cette structure un rôle de centre d'intégration de l'information qui sera ensuite envoyée vers la substance noire, l'ATV et le pallidum ventral.

iii. Rôle dans l'addiction

- Cocaïne

Le rôle du NAc dans l'addiction était le sujet de nombreuses études utilisant des approches d'optogénétiques (Lenz and Lobo, 2013). Les études d'optogénétiques ont montré qu'une

hyperexcitation spécifique des MSN exprimant le récepteur D1 engendre une augmentation significative de la sensibilité à la cocaïne chez la souris (Lobo et al., 2010) dans un protocole de préférence de place et l'inhibition de ces même neurones est responsable du blocage de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Ferguson et al., 2011). Alors qu'après une stimulation des MSN exprimant le récepteur D2 par optogénétique, on observe une diminution de la sensibilité aux effets récompensant de la cocaïne et une inhibition du comportement de recherche de drogue (Bock et al., 2013).

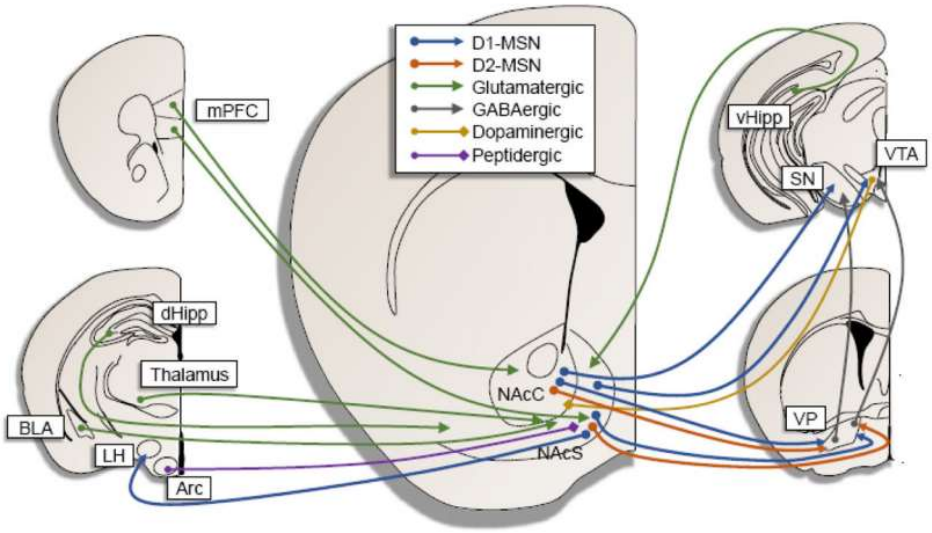


Figure 8 : Afférences et efférences du NAc.

Le noyau accumbens est divisé en deux sous-regions le core (NacC) et le shell (NAcS). Cette structure reçoit des projections glutamatergiques (en vert) provenant de l'amygdale, du CPF, de l'hippocampe et des projections dopaminergiques provenant de l'ATV. Le NAc envoie également des projections entre autre vers l'ATV (en bleu, la voie directe D1) et vers le pallidum ventral (en orange, la voie indirecte D2).

Abréviations : mPFC : Cortex préfrontal médian; VTA : aire tegmentale ventrale ; SN : Substance noire ; D1 : Récepteur dopaminergique D1 ; D2 : Récepteur dopaminergique D2 (Francis and Lobo, 2017).

Plusieurs études montrent que la transmission glutamatergique au niveau de cette structure est impliquée dans la sensibilisation comportementale à la cocaïne. Des injections répétées de cocaïne chez les rats engendrent une diminution de Glur1 au niveau du NAc des rats qui ont sensibilisés à la drogue (Churchill et al., 1999).

De plus, l'activité glutamatergique au sein du NAc joue un rôle important dans la recherche de drogues. En effet, l'injection d'un agoniste des récepteurs AMPA au niveau du NAc engendre la réinstallation du comportement de recherche de cocaïne, tandis que la micro injection d'un antagoniste des récepteurs AMPA dans cette même structure empêche la réinstallation de ce comportement (Cornish et al., 1999; Ping et al., 2008).

- Alcool

Une augmentation de la libération de DA était observée au niveau du NAc en réponse à une injection intrapéritonéale d'éthanol chez le rat (Imperato and Di Chiara, 1986). Chez les rats ayant subi des lésions dopaminergiques au niveau du NAc par la 6-OHDA, une diminution de la consommation d'éthanol chez les rats est observée (Kiianmaa, 1980) ainsi qu'une diminution de l'AA de l'éthanol (Rassnick et al., 1993). L'augmentation de la libération de la DA au niveau de cette structure était aussi observée après l'ingestion d'éthanol chez l'homme, par diminution de la capacité de la fixation du raclopride au niveau du Nac, indiquant ainsi une augmentation de la dopamine extracellulaire (Boileau et al., 2003).

L'activité glutamatergique au sein du NAc joue un rôle important dans l'expression de la sensibilisation comportementale à l'éthanol et pas dans l'induction (Nona and Nobrega, 2018). En effet, une injection d'antagoniste des récepteurs NMDA avec l'éthanol bloque l'expression de la sensibilisation sans bloquer le développement de cette sensibilisation (Nona and Nobrega, 2018).

Au niveau de cette structure, une diminution de la concentration extracellulaire de DA est décrite durant une courte période de sevrage pour l'alcool et pour la cocaïne (Rossetti et al., 1992).

c. L'amygdale

i. Présentation

L'amygdale est une région composée majoritairement de neurones pyramidaux glutamatergiques (70 à 75 %) et d'interneurones GABAergiques (Millhouse and DeOlmos, 1983). Cette structure, appartenant au système limbique, permet l'association de réponses conditionnées à un stimulus (Murray and Baxter, 2002). Elle joue un rôle crucial dans la cognition et les émotions, ainsi que dans l'apprentissage et la prise de décision (Pour revue,(Benarroch, 2015)). L'amygdale est formée par trois sous–régions : l'amygdale basolatérale (BLA), l'amygdale centromédiale (CeMA) et l'amygdale corticale (CO) (Pour revue, Benarroch, 2015; Knapska et al., 2007).

ii. Projections

L'amygdale reçoit majoritairement des afférences glutamatergiques provenant du cortex et du thalamus et des afférences dopaminergiques provenant de l'ATV et de la substance noire (Pour revue, Alheid, 2006; Knapska et al., 2007; Wassum and Izquierdo, 2015). Elle envoie principalement des projections vers le CPF, le Nac et le noyau du lit de la strie terminale (BNST : Bed Nucleus of the Stria Terminalis).

iii. Rôle dans l'addiction

Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle de l'amygdale dans l'addiction. En effet, une administration d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA dans cette structure bloque la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne chez des souris (Kalivas and Alesdatter, 1993). La BLA participe à l'apprentissage lié à la récompense et à la prise de décision (Wassum and Izquierdo, 2015). Par exemple, dans un protocole d'AA de cocaïne, un stimulus conditionné associé à la drogue déclenche l'augmentation de dopamine extracellulaire au niveau de cette structure (Weiss et al., 2000). Pelloux et al. ont trouvé que les rats ayant subi des lésions au niveau de la BLA augmentaient leurs réponses à la recherche de cocaïne malgré la punition (Pelloux et al., 2013). Ceci montre une évaluation des risques aberrante chez ces rats suite à l'exposition à la cocaïne. D'où suite à l'exposition à la cocaïne, les rats présentent une sensibilité réduite au coût et une sensibilité accrue à la récompense, ces effets peuvent être en partie médiés par la BLA.

La CeMA joue un rôle dans l'anxiété qui apparait durant l'abstinence suite à l'exposition chronique aux drogues. Par exemple, le facteur de libération de la corticotropine (CRF) est un neuropeptide synthétisé dans les neurones de la CeMA (Cassell et al., 1986). Ce neuropeptide est libéré localement dans cette structure et dans les sites de projection tels que le BNST. Il joue un rôle dans la régulation de l'état affectif négatif associé à l'abstinence (Koob, 2010). Une augmentation du CRF extracellulaire était observée durant l'abstinence suite à un protocole d'AA de cocaïne (Richter and Weiss, 1999), et suite à une exposition à l'éthanol (Menzaghi et al., 1994). De plus, l'injection d'un antagoniste du récepteur de CRF dans cette structure diminue le comportement anxieux associé à l'abstinence à l'éthanol (Rassnick et al., 1993).

d. L'hippocampe

i. Présentation

L'hippocampe est une structure limbique composée de neurones glutamatergiques constituant 90 % de la population cellulaire et d'interneurones GABAergiques inhibiteurs constituant environ 10% de la population cellulaire de l'hippocampe (Vizi and Kiss, 1998). L'hippocampe est subdivisé dans les zones 1 et 3 de la corne d'Ammon (CA1 et CA3) et le gyrus denté (DG) (Castilla-Ortega et al., 2016). L'hippocampe est formé de deux sous régions : une ventrale et une dorsale. La région dorsale est connue pour son rôle dans la cognition et la région ventrale est connue pour son rôle dans les émotions (Fanselow and Dong, 2010).

L'hippocampe joue un rôle clé dans la «mémoire déclarative» qui englobe la mémoire des connaissances, des faits et des concepts (mémoire sémantique), la mémoire de nos expériences de vie

(mémoire épisodique) et la mémoire des stimuli contextuels (mémoire spatiale) (Squire, 1992; Tulving and Markowitsch, 1998). L'hippocampe favorise également l'expression de l'anxiété et de la peur et régule la réponse neuroendocrinienne au stress sur laquelle elle exerce un rétrocontrôle inhibiteur (Bannerman et al., 2004; Levone et al., 2015).

ii. Projections

L'hippocampe établit des connexions glutamatergiques réciproques avec le CPF et la BLA. Il envoie des projections glutamatergiques vers le NAc (provenant de l'hippocampe ventral) et le septum (provenant de l'hippocampe dorsal) (Castilla-Ortega et al., 2016), et reçoit des projections dopaminergiques de l'ATV **(Figure 9)**.

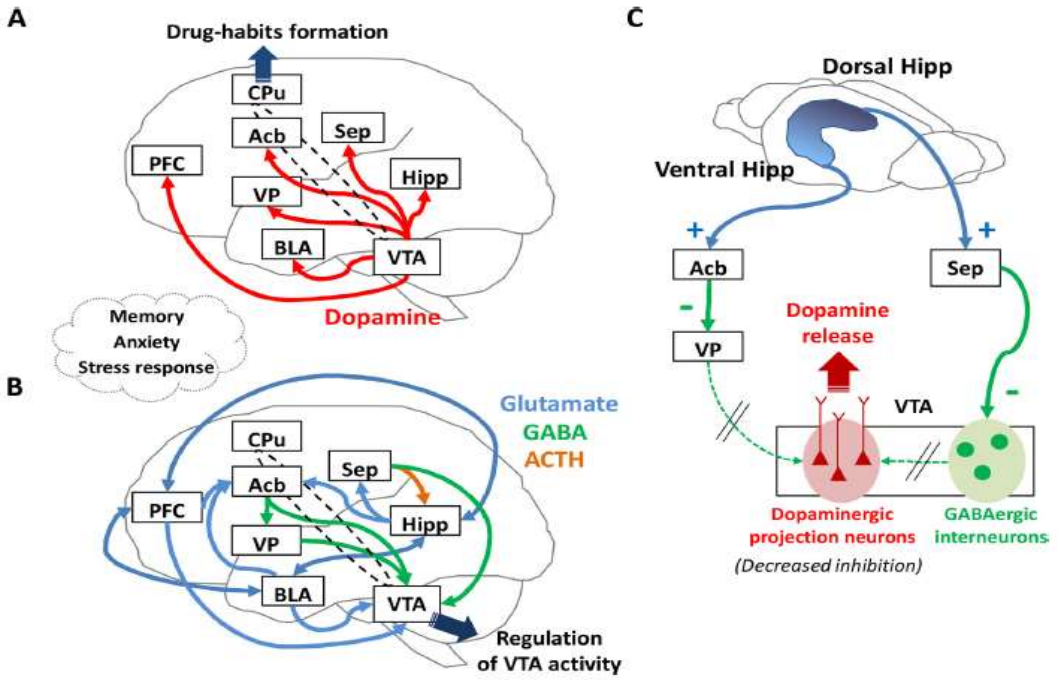


Figure 9 : Représentation des projections dopaminergiques de l'ATV et de la connectivité de l'hippocampe.

(A) L'ATV est fortement activée en réponse aux drogues d'abus, tels que la cocaïne, qui libère la dopamine au niveau des structures striatales et limbiques, y compris l'hippocampe. (B) L'hippocampe et les autres zones modulées par les neurones dopaminergiques sont largement interconnectées et modulent l'activité de l'ATV. L'ATV peut être stimulée ou inhibée selon les afférences qu'elle reçoit : les projections glutamatergiques sont excitatrices (en bleu) et les projections GABAergiques sont inhibitrices (en vert). (C) Une représentation détaillée des deux circuits dans le cerveau du rat, permettant à l'hippocampe dorsal et ventral de moduler l'activité dopaminergique de la VTA. En utilisant l'une ou l'autre de ces voies, les projections excitatrices de l'hippocampe stimuleraient les zones inhibitrices qui, à leur tour, inhibent les zones fournissant des projections GABAergique aux neurones dopaminergiques de l'ATV, ce qui stimule la libération de dopamine(Castilla-Ortega et al., 2016).

iii. Rôle dans l'addiction

L'hippocampe semble être impliqué dans l'addiction de par ses connections avec les autres structures du système mésocorticolimbique (Castilla-Ortega et al., 2016). D'une part, les projections dopaminergiques de l'ATV régulent la plasticité et la fonction de l'hippocampe (Ghanbarian and Motamedi, 2013; Rossato et al., 2009). D'autre part, l'hippocampe potentialise l'activité de l'ATV par ses projections vers le NAc qui projettent vers l'ATV (Floresco and Jentsch, 2011; Luo et al., 2011). Des lésions au niveau hippocampiques engendrent une diminution du comportement de prise ainsi que le comportement de recherche chez les rats dans un protocole d'AA (Caine et al., 2001).

Il est impliqué également dans l'extinction du comportement de recherche de cocaïne lorsque la cocaïne n'est plus disponible (Szalay et al., 2011, 2013), et enfin, il est nécessaire dans la réinstallation du comportement de recherche déclenché par le contexte (Fuchs et al., 2007; Lasseter et al., 2010b; Luo et al., 2011), ou par une nouvelle dose de cocaïne (Fuchs et al., 2005; Miller and Cohen, 2001).

e. Le cortex préfrontal (CPF)

i. Présentation

Le CPF est une région corticale qui se situe antérieurement aux régions motrices et prémotrices. Elle est constituée de deux types des neurones : une majorité de neurones glutamatergiques (85%) ayant un effet excitateur et une minorité d'interneurones GABAergiques ayant un effet inhibiteurs (Seamans et al., 2001), modulant des différentes structures corticales et sous corticales (Fuster, 2001). En interagissant avec ces autres structures, le cortex préfrontal joue un rôle dans l'intégration des informations conduisant à la réalisation des processus exécutifs et la prise de décision.

Deux sous-régions constituent le cortex préfrontal chez le rongeur : le cortex orbito-frontal (COF) et le CPF médian (CPFm) (équivaut au cortex préfrontal dorsolatéral (CPFdl) chez l'Homme) (Granon and Poucet, 2000; Uylings et al., 2003). Ce dernier est composé lui aussi de trois sous régions : le cortex prélimbique (PrL) et le cortex infralimbique (IL) ainsi que l'ACC (Granon and Poucet, 2000)). Chaque région du CPF joue un rôle différent d'un point de vue physiologique. L'ACC est impliqué dans l'apprentissage attentionnel sélectif capable d'évaluer l'importance de l'action. Elle joue un rôle important dans l'association d'une valeur à une action donnée (Camille et al., 2011; Rushworth et al., 2011). Le PrL, est impliqué dans la formation d'une stratégie pour obtenir un but et l'IL est responsable de la sélection de la stratégie la plus convenable pour l'obtention de ce but (Oualian and Gisquet-Verrier, 2010; Rich and Shapiro, 2009). Ces deux régions constituent un lieu d'intégration d'informations liées à l'espace et à la mémoire ainsi qu'au processus d'attention (Camille et al., 2011; Delatour and Gisquet-Verrier, 2001; Granon and Poucet, 1995; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010).

ii. Projections

Le CPF projette vers l'hypothalamus et les structures limbiques comme l'ATV, le NAc et l'amygdale via des neurones glutamatergiques ayant un effet excitateur. Il projette aussi vers le cortex entorhinal. Egalement, il reçoit des afférences dopaminergiques de l'ATV et glutamatergiques provenant de l'amygdale et de l'hippocampe (Goldstein and Volkow, 2011; Perry et al., 2011).

iii. Rôle dans l'addiction

Le CPF est impliqué dans l'induction de la sensibilisation aux drogues. Des lésions au niveau du CPFm (englobant à la fois les régions prélimbiques et infralimbiques) perturbent l'induction de la sensibilisation à la cocaïne et à l'amphétamine (Li et al., 1999; Wolf et al., 1995). De plus, des lésions spécifiques de la région pré-limbique ont également bloqué l'induction d'une sensibilisation induite par la cocaïne (Tzschentke, 2000; Tzschentke and Schmidt, 1998). De nombreuses études utilisant des protocoles de réinstallation (reinstatement) de l'auto-administration ont suggéré que l'activité du cortex prélimbique favorise la recherche de cocaïne (par exemple, (Di Pietro et al., 2006; McLaughlin and See, 2003)). McFarland et Kalivas ont utilisé une série de manipulations pharmacologiques pour examiner le rôle de la partie dorsale du cortex (PrL) dans la réinstallation (reinstatement) de la cocaïne induite par la drogue après extinction (McFarland and Kalivas, 2001). L'inactivation du PrL par des injections bilatérales d'agonistes GABA-A et GABA-B (respectivement muscimol et baclofène) avant le test de réinstallation (reinstatement) conduit au blocage du comportement de recherche de la drogue (McFarland and Kalivas, 2001). En outre, la même inactivation pharmacologique du IL n'a aucun effet sur la réinstallation du comportement de recherche de la cocaïne, suggérant que les effets sont spécifiques du cortex prélimbique (McFarland and Kalivas, 2001).

Par ailleurs, d'autres études de réinstallation du comportement de recherche de cocaïne montrent aussi une implication du cortex IL dans la régulation du comportement de recherche de cocaïne (par exemple Peters et al., 2008a, 2008b). Ainsi, l'inactivation du cortex IL avec des agonistes du GABA par administration locale après l'extinction rétablit la recherche de cocaïne en réponse à une injection de cette drogue (10 mg/kg) (Peters et al., 2008a) et en réponse aux stimuli environnementales (Peters et al., 2008b), alors que l'activation de cette région avec l'agoniste du glutamate (AMPA) après l'extinction supprime la réinstallation induite par la drogue (cocaïne induced reinstatement) (Peters et al., 2008a). En effet, ces études ont aussi montré que le cortex IL inhibe le comportement de recherche de drogue après extinction en inhibant le cortex PrL, ce qui modulerait indirectement l'activité de régions spécifiques de l'amygdale et le NAc. Ceci suggère que le PrL favorise la recherche de cocaïne, tandis que le IL inhibe la recherche de cocaïne, suite à l'extinction de l'auto-administration de cocaïne (Peters et al., 2009).

III. Plasticité neuronale induite par les drogues d'abus

Le terme de plasticité neuronale, au sens large, fait référence à des changements structuraux et fonctionnels pouvant expliquer diverses formes de modifications comportementales, par exemple l'adaptation à un nouvel environnement, l'apprentissage spécifique et non spécifique, et aussi des ajustements compensatoires liés à des pertes fonctionnelles induites par le vieillissement ou par des lésions cérébrales (Berlucchi and Buchtel, 2009). L'addiction pourrait être considérée comme une maladie reposant sur des processus de plasticité morphologique et synaptique aberrantes (Hyman and Malenka, 2001; Kalivas and O'Brien, 2008). En altérant les circuits cérébraux, les drogues d'abus entravent le développement de stratégies comportementales à l'égard des stimuli biologiques en faveur d'une orientation progressive des comportements vers les stratégies de recherche de drogues (Kalivas et al., 2005). La neuroplasticité induite par la drogue engendre une orientation inadaptée se manifestant par une capacité réduite à réguler la tendance à obtenir et à utiliser la drogue, ainsi qu'une diminution de la motivation à obtenir des récompenses naturelles (Kalivas and O'Brien, 2008). Les drogues d'abus induiraient une addiction par des changements durables impliquant des processus de plasticité, permettant des altérations des systèmes de neurotransmission, notamment des altérations de la force synaptique, ainsi que des altérations de la morphologie des neurones.

1. Plasticité morphologique induite par les drogues

La plasticité morphologique représente les changements de la morphologie des neurones que ce soit au niveau des terminaisons des axones ou des dendrites. Elle correspond à la formation ou à la suppression de boutons synaptiques ou d'épines dendritiques (Robinson and Kolb, 2004). En général, les neurones interagissent avec plusieurs neurones post-synaptique et libèrent de petites quantités de neurotransmetteurs vers ces neurones. Ces signaux sont intégrés au niveau des dendrites des neurones post-synaptiques et plus précisément des épines dendritiques. Ces épines sont très dynamiques et ont la capacité de changer de propriétés (forme, longueur) très rapidement (en minutes) en réponse à des altérations de l'activité (Bosch et al., 2014; Bosch and Hayashi, 2012; Matsuzaki et al., 2004). Cette plasticité structurale peut apparaitre sous forme de changement de la longueur ou du volume des épines, de la densité en épines ou encore de la complexité de l'arbre dendritique.

a. Plasticité morphologique induite par la cocaïne

Une exposition aiguë à la cocaïne (1 seule injection) peut avoir des conséquences morphologiques au sein de différentes structures du système mésocorticolimbique. Il a été montré qu'une seule injection de cocaïne engendre la formation d'épines dans le CPF, le NAc et l'ATV (Dos Santos et al., 2017; Muñoz-Cuevas et al., 2013; Sarti et al., 2007; Shen et al., 2009). Dans l'ATV, cette formation se

produit 2h après l'injection de cocaïne (Sarti et al., 2007), après une heure dans le NAc (Dos Santos et al., 2017) et après 6 heures dans le CPF (Muñoz-Cuevas et al., 2013). Tout comme une exposition aiguë, plusieurs études ont montré que l'exposition chronique de rats à la cocaïne, augmente la densité des épines dendritiques dans le NAc et dans le CPF. En effet, des injections répétées de cocaïne induisent une formation d'épines dendritiques dans les MSN du Shell du Nac (5 injections suivies de 24 heures de sevrage) (MacAskill et al., 2014), et dans le CPF (Muñoz-Cuevas et al., 2013). Dans un protocole d'auto-administration de cocaïne chez le rat, une augmentation de la densité des épines est aussi observée dans le NAc et dans le CPF (Robinson et al., 2001).

L'abstinence pourrait aussi avoir des conséquences sur cette forme de plasticité. Une étude de Dumitriu et al. a montré que à différents temps (4h, 24h et 28 jours après la dernière injection de cocaïne, 7 injections, 1 injection par jour) , une diminution du nombre d'épines dans le Core 24 h après la dernière injection de cocaïne et une augmentation dans le Shell étaient observée (Dumitriu et al., 2012). Cette augmentation dans le Shell disparait 28 jours après la dernière injection de cocaïne alors que dans le Core la diminution persistait encore (Dumitriu et al., 2012). Cela pourrait laisser suggérer que la plasticité induite par la cocaïne dure plus dans le Core que dans le Shell du NAc.

Il a été montré que la présentation de signaux associés à la cocaïne (indices) en absence de la drogue elle-même entraînait une augmentation rapide de la taille des épines dendritiques dans le NAc core des rats ayant subi un protocole d'auto-administration de cocaïne (Gipson et al., 2013). Cette augmentation était déjà présente 15 min après la présentation des indices et l'augmentation du diamètre de la tête des épines était en corrélation positive avec l'intensité de la recherche de drogue (Gipson et al., 2013). Ces résultats ont été également retrouvé dans le cadre d'un protocole de réinstallation induite par le contexte (Stankeviciute et al., 2014). Ceci suggère que le craving induit par les indices ou le contexte pourrait être lié à une potentialisation de certaines synapses qui pourra provoquer les phénomènes de rechute (Gipson et al., 2013; Stankeviciute et al., 2014).

b. Plasticité morphologique induite par l'alcool

Comme pour la cocaïne, l'exposition à l'alcool a des conséquences sur la morphologie des épines dendritiques. Les premières études faites dans ce domaines étaient celles de Kunz et ses collaborateurs qui ont montré que l'exposition chronique à l'alcool augmente la densité des épines dendritiques au niveau des neurones de l'hippocampe en réponse à l'alcool (Kunz et al., 1976). L'administration aiguë d'alcool est associée à une augmentation des épines dendritiques dans la CeMA et dans le noyau médian de l'amygdale (MeA) chez le rat (Pandey et al., 2008). Ces effets structuraux ont été associés à l'effet anxiolytique induit par l'alcool aigu et à une augmentation de l'expression du BDNF (brain derived neurotrophic factor) et de l'Arc (activity-regulated cytoskeletal-associated protein), qui sont

proposé comme des acteurs de la plasticité synaptique (Pandey et al., 2008). L'exposition intermittente des souris à l'alcool (vapeur) induit une augmentation de la densité des épines dendritiques des MSN du NAc core (Uys et al., 2016). Cette augmentation disparait 72 heures après l'exposition à l'éthanol. Dans des études en post mortem chez des alcooliques, une diminution de la densité des épines dendritiques dans les neurones pyramidaux corticaux a été décrite (Ferrer et al., 1986).

Le sevrage suite à l'exposition chronique à l'alcool diminue les épines dendritiques et l'expression de l'Arc et du BDNF dans ces mêmes structures, conduisant à une augmentation de l'anxiété chez le rat (You et al., 2014). De plus, des sevrages répétés diminuent également l'arborisation dendritique dans le NAc (Zhou et al., 2007). Cette diminution était aussi observée chez les rats ayant reçu de l'éthanol en chronique dans leur diet (chronic liquid diet) après 24 heures de sevrage (Melis et al., 2005).

2. Plasticité synaptique induite par les drogues d'abus

La plasticité synaptique réfère aux modifications biochimiques et neurochimiques entraînant des modifications durables de l'efficacité synaptique et en conséquence du comportement (Citri and Malenka, 2008). Il existe différentes formes de plasticité en fonction de la durée pendant lequel elle est exprimée ; on parle ainsi de plasticité à court terme (couvrant des millisecondes à des dizaines de minutes) ou de plasticité à long terme (durant des heures, des jours ou plus). La plasticité synaptique peut correspondre à une augmentation de l'efficacité synaptique (potentialisation à long terme (LTP)) ou une diminution (dépression à long terme (LTD)) **(Figure 10)**. Ces phénomènes de plasticité sont permis par des modulations de la libération de neurotransmetteurs ou par des changements au niveau postsynpatiques (quantité ou composition de récepteurs). Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques, les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA, ont particulièrement été étudiés dans le cadre de la plasticité des neurotransmissions glutamatergiques. Dans le cadre de l'addiction, des phénomènes de plasticité synaptique glutamatergique ont été décrits dans l'ATV et seraient le déclencheur de plasticités synaptiques dans d'autres structures du système mésocorticolimbique. Ainsi, une organisation hiérarchique de la plasticité synaptique, partant de l'ATV, suivie par la plasticité synaptique glutamatergique dans les zones telles que le NAc et le CPF, serait responsable des changements comportementaux observés dans le cadre de l'addiction (Mameli et al., 2009).

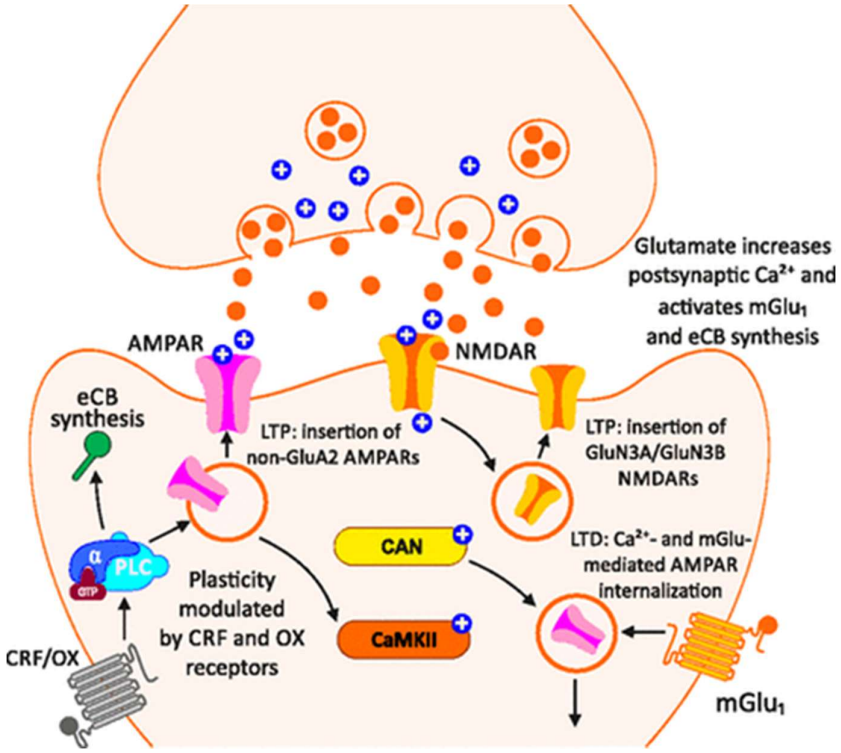


Figure 10 : Exemples de plasticité synaptique : LTP et LTD.

L'induction de la LTP au niveau postsynaptique survient suite à l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} au niveau de la membrane postsynaptique. La LTD est due à l'internalisation des récepteurs AMPA exprimés sur la membrane en réponse à des taux élevés de Ca^{2+} ou à l'activation de récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu) (Korpi et al., 2015).

a. Plasticité synaptique induite par la cocaïne

i. Plasticité synaptique induite par une exposition aiguë à la cocaïne

Des changements dans la transmission synaptique ont été décrits après une exposition aiguë à la cocaïne. Par exemple, une injection de cocaïne augmente le rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans les neurones dopaminergiques de l'ATV reflétant une plasticité synaptique de type LTP au niveau des synapses entre les afférences excitatrices et les neurones dopaminergiques de l'ATV (Argilli et al., 2008; Liu et al., 2005; Luu and Malenka, 2008; Ungless et al., 2001). Cette augmentation peut refléter une augmentation des courants AMPA ou une diminution des courants NMDA ou une combinaison des deux. En condition de base, les récepteurs AMPA tétramériques sont souvent constitués de sous-unités de type Glur2 associés à des sous-unités Glur1 ou Glur3 (Dingledine, 1999), et des changements de cette composition peuvent être observés et participer à des phénomènes de plasticité synaptique. Les premiers travaux de Fitzgerald et al. (1996) avaient montré que la plasticité induite par les drogues dans les synapses glutamatergiques des neurones dopaminergiques de l'ATV impliquait une transition

vers des récepteurs AMPA dépourvus de Glur2. En effet, l'expression des sous-unités Glur1, mais pas des sous-unités Glur2, a été augmentée dans les neurones dopaminergiques de l'ATV après exposition chronique à la cocaïne (Fitzgerald et al., 1996). Cette transition vers des récepteurs AMPA dépourvus de Glur2 potentialise la transmission AMPA (Mameli et al., 2007), car les récepteurs AMPA dépourvus de Glur2 sont plus perméables au Ca^{2+} et ont une plus grande conductance (Isaac et al., 2007). Notons que la plasticité synaptique au niveau de l'ATV se produit rapidement (3 heures) après administration aiguë de cocaïne (Argilli et al., 2008). Cette plasticité synaptique induite par la cocaïne est transitoire puisque la potentialisation synaptique reste observable après 5 jours, mais pas après 10 jours (Ungless et al., 2001).

En plus des afférences glutamatergiques, les neurones dopaminergiques de l'ATV reçoivent des projections provenant d'interneurones GABA locaux et des neurones GABA provenant du NAc et du pallidum ventral (Kalivas et al., 1993; Steffensen et al., 1998) et aussi de la queue de la VTA (Brown et al., 2012). Une injection de la cocaïne diminue l'expression de la LTP au niveau des synapses GABAergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Niehaus et al., 2010).

Ainsi, l'augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA au niveau des synapses glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV et la perte de la LTP des synapses GABAergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV sont susceptibles d'augmenter l'excitabilité des neurones dopaminergiques de l'ATV.

ii. Plasticité synaptique induite par des expositions chroniques à la cocaïne

Après des administrations répétées de cocaïne (1 injection par jour pendant 7 jours), l'augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA au niveau des synpases glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, observée 24 heures après la dernière injection de cocaïne, est transitoire. Elle est observée cinq jours après l'arrêt de la cocaïne mais pas après dix jours (Borgland, 2004). Suite à un protocole d'auto-administration de cocaïne chez le rat, la potentialisation synaptique induite par la cocaïne était toujours présente dans les neurones dopaminergiques de l'ATV même après une longue période d'abstinence (3 mois) (Chen et al., 2008). La persistance de cette potentialisation synaptique après auto-administration de cocaïne suggère que ce phénomène pourrait être un facteur fondamental dans le développement d'un comportement addictif. De plus, l'activité des efférences GABAergiques des interneurones de l'ATV est réduite après une exposition répétée à la cocaïne, désinhibant ainsi les neurones dopaminergiques (Bocklisch et al., 2013).

Après une exposition chronique à la cocaïne, des modifications de l'efficacité synaptique ont aussi été observées au niveau des synapses glutamatergiques entre les afférences de CPF sur les MSNs du shell du NAc. Une diminution du rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans le shell du NAc est observée

24 heures après la dernière exposition à la cocaïne (Kourrich et al., 2007). Cette diminution est remplacée par une augmentation après un sevrage prolongé (10-14 jours) (Kourrich et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec les observations de Boudreau et Wolf (Boudreau and Wolf, 2005), qui indiquent une expression accrue du récepteur AMPA à la surface cellulaire dans le NAc des rats après 21 jours d'abstinence. L'augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA est diminuée après une nouvelle injection de cocaïne (challenge) (Thomas et al., 2001) . Tous ces résultats sont résumés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Tableau regroupant différentes études montrant l'effet des expositions chroniques à la cocaïne sur la plasticité synaptique.

Protocole	Abstinence	Challenge	Résultats	Références
Injections quotidiennes pendant 7 jours	24 heures après la dernière injection et 5 jours	Non	Augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA au niveau des synpases glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV	Borgland, 2004
Injections quotidiennes pendant 5 jours	24 heures	Non	Réduction de l'activité des efférences GABAergiques des interneurones de l'ATV désinhibant les neurones dopaminergiques	Bocklisch et al., 2013
Auto-administration de cocaïne	3 mois	Non	Potentialisation synaptique induite par la cocaïne toujours présente dans les neurones dopaminergiques de l'ATV	Chen et al., 2008
Injections quotidiennes pendant 5 jours	24 heures	Non	Diminution du rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans le shell du NAc	Kourrich et al., 2007
	10-14 jours	Non	Augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans le shell du NAc	
Injections quotidiennes pendant 5 jours	10-14jours	Oui	Diminution du rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans le shell du NAc.	Thomas et al., 2001
Injections quotidiennes pendant 7 jours	21 jours	Non	Expression accrue des récepteurs AMPA à la surface cellulaire dans le NAc des rats	Boudreau, 2005

Après une auto-administration de cocaïne, une dépression synaptique de la transmission excitatrice a été retrouvée dans le NAc shell (Schramm-Sapyta et al., 2006). Il a été suggéré que la dépression synaptique induite par la drogue pourrait rendre les neurones du NAc shell moins sensibles aux stimuli naturels, ce qui pourrait entraîner des sentiments d' anhédonie et de dysphorie (Van Den Oever et al., 2012) qui serait responsable de l'apparition du besoin à la drogue (craving).

Cette diminution est suivie d'une augmentation de la transmission des récepteurs AMPA après une longue période d'abstinence, qui serait due à l'insertion synaptique des récepteurs AMPA dépourvus de Glur2 (Conrad et al., 2008). La potentialisation progressive de la transmission des récepteurs AMPA pendant une longue période d'abstinence (Conrad et al., 2008) pourrait être un facteur d'incubation du craving (incubation of drug craving), phénomène qui fait que le 'craving' induit par les indices contextuels (cue induced craving) augmente et engendre une recherche de drogue progressivement plus forte au cours des premiers mois qui suivent l'arrêt de la consommation (Grimm et al., 2001). La potentialisation de la transmission des récepteurs AMPA augmenterait la réactivité des MSN du NAc aux signaux associés aux drogues, ce qui conduit à un besoin accru de se procurer la drogue ainsi qu'une augmentation de la recherche de drogue (Conrad et al., 2008). La recherche de cocaïne induite par un cue/contexte (cue induced cocaine seeking) après un longue période d'abstinence suite à un protocole d'auto-administration de cocaïne a été réduite en injectant au niveau du NAc un bloqueur sélectif des récepteurs AMPA dépourvus de Glur2 (Conrad et al., 2008). Au niveau du CPFm, Pascoli et al. ont constaté que le rétablissement de la transmission synaptique (préalablement induite par la cocaïne chronique) par des techniques d'optogénétiques dans les synapses au niveau des MSN projetant du CPFm ou de l'hippocampe ventrale vers le shell du NAc abolit le comportement de recherche dans un protocole de réinstallation induite par les indices environnementaux (cues) (Pascoli et al., 2014).

La plasticité synaptique glutamatergique ne se produit pas seulement lors de l'exposition à la drogue et l'abstinence mais aussi lors de l'exposition à des indices environnementaux. En effet, la présentation de signaux associés à la cocaïne en absence de la drogue elle-même entraînait une augmentation rapide du rapport des récepteurs AMPA/NMDA dans le NAc core des rats ayant subi un protocole d'auto-administration de cocaïne (Gipson et al., 2013). Ces augmentations étaient déjà présentes 15 min après la présentation du signal associé à la cocaïne et l'augmentation du rapport des récepteurs AMPA/NMDA était en corrélation positive avec l'intensité de la recherche de drogue, mesurée par le nombre d'appui sur le levier actif délivrant la cocaïne (Gipson et al., 2013). Ceci suggère que la potentialisation synaptique rapide induite par les cues/contexte dans les MSN centraux du NAc pourrait être un mécanisme déclenchant la rechute (Gipson et al., 2013).

b. Plasticité synaptique induite par l'alcool

i. Plasticité synaptique induite par une exposition aiguë à l'alcool

Comme pour la cocaïne, l'exposition aiguë à l'éthanol induit une potentialisation de la transmission glutamatergique sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (24 h après l'exposition à l'éthanol) (Saal et al., 2003). Au niveau de cette structure, Guan and He ont montré que l'exposition aiguë à l'éthanol (1 injection en IP) bloque la LTP dépendante de GABA au niveau des neurones dopaminergiqes de l'ATV (Guan and Ye, 2010).

L'exposition aiguë à l'éthanol *in vitro* réduit l'induction de la LTD dépendante des récepteurs NMDA au niveau des tranches du shell du NAc (Jeanes et al., 2011). Cet effet aigu de l'éthanol est dû à son action inhibitrice sur la fonction du récepteur NMDA contenant GluN2B dans le NAc (Maldve et al., 2002; Zhang et al., 2005). En outre, il a été démontré que cette inhibition de la fonction du récepteur NMDA par l'éthanol aigu était responsable de l'atténuation de la LTP dépendante du récepteur NMDA induite par l'éthanol dans plusieurs structures cérébrales, y compris le striatum (Izumi et al., 2005; Weitlauf, 2004; Yin et al., 2007).

Le CPFm est également impliqué dans l'addiction à l'alcool. Bien que des recherches aient étudié les effets aigus de l'éthanol sur les récepteurs NMDA du CPF (Weitlauf and Woodward, 2008), rares sont ceux qui ont étudié l'effet sur la plasticité synaptique dans cette zone. Dans une étude en électrophysiologie, une réduction du courant NMDA et pas AMPA été observée dans cette structure suite l'exposition aiguë à l'alcool (Weitlauf and Woodward, 2008). Cette inhibition du courant NMDA peut avoir comme conséquence une diminution de l'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA. Cette diminution de la LTP au niveau de cette structure peut être à l'origine des déficits cognitifs associés à l'exposition aiguë à l'alcool.

ii. Plasticité synaptique induite par des expositions chroniques à l'alcool

Les injections répétées d'alcool favorise l'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA au niveau des neurones dopaminergiques de l'ATV 24 heures après la dernière injection d'éthanol (Bernier et al., 2011). Une étude de Stuber a montré qu'une exposition répétée à l'éthanol dans un protocole d'auto-administration prolongée augmente les contributions post-synaptiques des récepteurs AMPA sur les neurones dopaminergiques de l'ATV 12 et 24h après la dernière exposition à l'éthanol (Stuber et al., 2008) d'une manière assez similaire à la LTP dans cette région (Bonci and Malenka, 1999). L'exposition chronique à l'alcool produit également une augmentation de la fonction des récepeteurs NMDA et de l'expression des sous-unités dans plusieurs structures du système mésolimbique lors du sevrage de l'alcool tels que la BLA(Läck et al., 2007), le striatum (Wang et al.,

2007a, 2011) et le NAc (Szumlinski et al., 2008). Une exposition chronique à l'éthanol suivie par 24h de sevrage cause une perte de la LTD et une induction de la LTP au niveau du NAc. Cette plasticité disparait 72h plus tard (Jeanes et al., 2011). Une autre étude a mis en évidence une diminution de l'expression de la LTD dépendante des récepteurs NMDA dans le NAc core, mais pas dans le shell, chez des souris ayant montré une forte sensibilisation locomotrice à l'éthanol après 2 semaines d'arrêt du traitement chronique à l'éthanol (Abrahao et al., 2013). Une étude de Marty a montré que l'exposition à un protocole de prise intermittente d'éthanol suivie d'un sevrage prolongé (> 40 jours) induit une potentialisation de la transmission synaptique des récepteurs AMPA, associée à une augmentation de la conductance unitaire du récepteur AMPA dans le core du NAcc (Marty and Spigelman, 2012). Ces résultats suggèrent que la potentialisation de la transmission du glutamate observée par cette période prolongée d'abstinence de l'alcool pourrait être due à un changement dans la composition des sous-unités des récepteurs AMPA, augmentant le nombre de récepteur AMPA post-synaptiques fonctionnels dépourvus de GluA2, comme observé précédemment dans les études sur la cocaïne (Conrad et al., 2008; Mameli et al., 2007, 2009).

L'exposition chronique à l'éthanol induit une LTP dans le CPF. Kroener et al. ont observé que l'exposition chronique à l'alcool entraînait des augmentations persistantes du rapport de courant NMDA/AMPA au niveau des synapses glutamatergiques des neurones pyramidaux de la couche V de CPFm (Kroener et al., 2012; Nimitvilai et al., 2016). Cette augmentation est persistante après 1 semaine de sevrage.

Chapitre 3 : Le cholestérol cérébral

I. Généralités sur le cholestérol

Le cholestérol est un des lipides le plus abondant des membranes cellulaires. Son nom dérive du grec ancien, chole- (bile) et stéréos (solide), car il était au début identifié comme un composant solide des calculs biliaires. Sa première extraction sous forme cristalline, à partir de calculs biliaires, a été réalisée en 1768 par François Poulletier de la Salle. Cependant, ce n'est qu'en août 1816 que Michel Eugéne Chevreul, un chimiste français, a identifié et purifié cette substance cristalline à partir de calculs biliaires et l'a appelé cholestérol (Pour description de ces travaux, Dam, 1958).

Le cholestérol est un composé hydrocarboné contenant 27 atomes de carbone et 46 atomes d'hydrogène, plus 1 atome d'oxygène. Il contient quatre cycles de stéroïdes hydrocarbonés entre le groupe hydroxyle et la chaîne hydrocarbonée **(Figure 11)**. La plus grande partie de sa structure est hydrophobe due à sa composition en hydrocarbures. Cependant, la présence du groupe hydroxyle, groupement polaire lui confère une propriété amphiphile, caractéristique des composants lipidiques des membranes cellulaires.

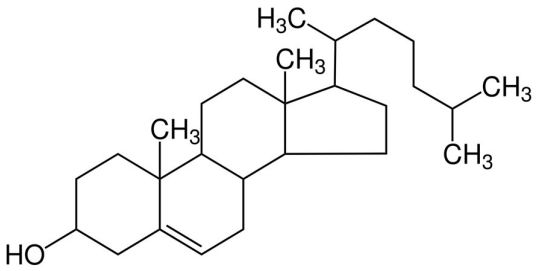


Figure 11 : Structure du cholestérol.

Le cholestérol joue un rôle crucial dans l'organisme au niveau structural et fonctionnel. En effet, au niveau structural, le cholestérol entre dans la composition des membranes biologiques, et intervient dans l'architecture de la cellule et de ses organites. En plus de son rôle au niveau structural, le cholestérol joue un rôle au niveau fonctionnel. Il compose les membranes biologiques et se trouve en forte concentration dans les radeaux lipidiques où il joue un rôle important dans l'activité membranaire, notamment la transduction du signal (Allen et al., 2007; Fielding and Fielding, 2004). De plus, le cholestérol est le précurseur de différents composés biochimiques : les stéroïdes, la vitamine D3, les acides biliaires et les oxystérols (Berg et al., 2002; Jeitner et al., 2011).

II. Le cholestérol cérébral

Le cerveau est un organe très riche en lipides. Il est constitué de différents lipides comme les glycérophospholipides, les sphingolipides et le cholestérol dans des proportions équivalentes (Korade and Kenworthy, 2008). Le cerveau, qui représente 2 à 5 % du poids total de l'organisme, est l'organe le plus riche en cholestérol et contient près de 30 % du cholestérol total (Björkhem et al., 2004; Dietschy and Turley, 2001). Tandis que la concentration en cholestérol dans la plupart des tissus est de 2 mg/g de tissu, celle du cerveau est de l'ordre de 15-20 mg/g de tissu (Dietschy and Turley, 2004). Vu la concentration élevée du cholestérol dans le cerveau, ceci suggère que le cholestérol joue un rôle fondamental dans les fonctions cérébrales.

Le cholestérol cérébral est majoritairement sous forme libre non estérifié (99,5 %) et est réparti pour 70 % dans la gaine de myéline (40 mg/g) (Russell et al., 2009), et pour 30 % dans les membranes plasmiques des astrocytes et des neurones (Dietschy and Turley, 2004).

La demi-vie du cholestérol dans le cerveau adulte est comprise entre 6 mois et 5 ans (Björkhem, 2006), tandis que la demi-vie plasmatique du cholestérol n'est que quelques jours (Dietschy and Turley, 2004).

1. Spécificités du cholestérol cérébral

a. Echange de cholestérol entre le cerveau et la circulation générale

L'échange de cholestérol entre le cerveau et la circulation sanguine est très limité (Russell et al., 2009). Le turnover du cholestérol dans le cerveau semble être indépendant de celui du corps car il ne traverse pas la barrière hémato–encéphalique (BHE) (Jeske and Dietschy, 1980). Cette qualité est protectrice pour le cerveau et le rend indépendant de la fluctuation de la cholestérolémie. A cet égard, il faut noter que le régime alimentaire a peu d'influence sur le cholestérol cérébral. Ainsi, le cerveau doit assurer sa propre synthèse de cholestérol et son élimination pour le maintien à l'équilibre indépendamment de l'homéostasie sanguine (Dietschy, 2009).

b. Les cellules responsables de la synthèse du cholestérol

Comme indiqué précédemment le plus grand pool de cholestérol cérébral (70%) se trouve dans la myéline. Ainsi, durant la myélinisation, sa synthèse est principalement assurée par les oligodendrocytes durant les premières semaines/mois après la naissance. Pendant le développement cérébral, les neurones produisent également du cholestérol mais perdent cette

capacité au-delà des premières semaines. Après la maturation cérébrale et durant l'âge adulte, les besoins neuronale en cholestérol seront obtenus à partir des cellules gliales, particulièrement les astrocytes (Dietschy and Turley, 2004). Ces derniers assurent donc la synthèse de cholestérol pour leurs propres besoins mais aussi pour ceux des neurones (Pfrieger, 2003). Le transport du cholestérol néoformé des astrocytes vers les neurones est assuré via des transporteurs spécifiques (Nieweg et al., 2009).

2. Métabolisme du cholestérol cérébral

a. La voie de synthèse du cholestérol

La voie de synthèse du cholestérol débute par la conversion de 2 molécules d'acétyl-CoA en 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMGCoA) grâce à la HMGCoA synthase suivie par la réduction du HMGCoA en mévalonate grâce à la HMGCoA réductase (pour revue (Petrov et al., 2016)) **(Figure 12)**. Cette réduction est considérée comme étant la réaction limitante et l'étape irréversible de la synthèse du cholestérol (Rozman and Monostory, 2010). Suite à cette étape, la synthèse du cholestérol donne lieu à deux isoprènes : Δ3-isopentenyl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate. A partir de ces isoprènes, on a la formation de géranyl pyrophosphate et de farnésyl pyrophosphate. Ces deux composés ont des effets sur le fonctionnement neuronal qui seront détaillés dans la partie III. La fusion de deux farnésyl pyrophosphate donne naissance au squalène. Le squalène est cyclisé en lanostérol suivant différentes étapes. Les étapes précédentes sont nommées voie du mévalonate. La synthèse se poursuit par les voies Bloch et Kandutsch-Russell pour obtenir enfin la molécule du cholestérol, composée de 27 carbones et qui contient un noyau stérol tétracyclique. Dans ces deux voies, les mêmes enzymes interviennent mais pas dans le même ordre, engendrant alors la formation de molécules intermédiaires différentes. La voie Bloch produit le desmosterol. Cette voie est utilisée par les oligodendrocytes et les astrocytes de cerveaux de rats nouveau-nés (Nieweg et al., 2009). Alors que la voie Kandutsch-Russell assure la formation du 7-déhydrocholestérol qui est un précurseur de la vitamine D (Sharpe and Brown, 2013). Cette voie est la voie majoritaire des cellules de mammifères.

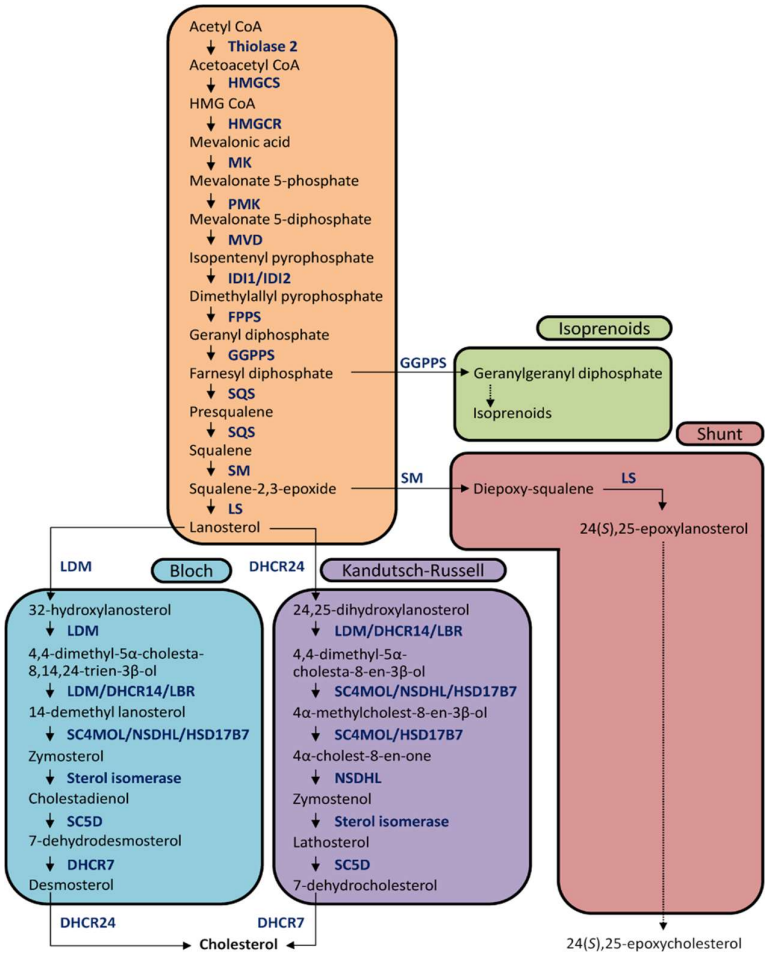


Figure 12 : La voie de synthèse du cholestérol.

La voie du mévalonate donne naissance au lanostérol (en orange), qui peut ensuite être dévié vers la voie de Bloch (en bleu), produisant le cholestérol via le desmostérol, ou la voie de Kandutsch-Russell produisant le cholesterol, via le 7-déshydrocholestérol (en mauve). Deux autres branches divergent également de la voie du mévalonate : la production des isoprénoïdes (en vert) qui sont produits par la géranylgéranyl-diphosphate synthase (GGPPS) et la voie de Shunt dont les enzymes ne sont pas encore complètement élucidés (en rouge).

b. Les mécanismes de régulation de la synthèse du cholestérol

Comme l'activité de la HMGCoA réductase constitue l'étape limitante de la synthèse du cholestérol, elle est le site de régulations rapides et durables. Les cycles de phosphorylation/déphosphorylation permettent des régulations rapides de cette enzyme (Burg and Espenshade, 2011). La protéine kinase activée par l'AMP cyclique (PKA) inhibe l'activité de la HMGCoA réductase en phosphorylant un résidu serine (Ser872), quant à la déphosphorylation de ce site, elle est assurée par une phosphatase, la PP2A, conduit à l'activation de l'enzyme (Friesen and Rodwell, 2004). En plus de ces régulations rapides, la

HMGCoA réductase est sujette à des régulations transcriptionnelles et traductionnelles (Burg and Espenshade, 2011).

Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la synthèse du cholestérol :

- La SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*), la SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein)* et les récepteurs *Liver X Receptor (LXr)* assurent une régulation de la transcription de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol.
- L'INSIG (*INSulin Induced Gene)* assure des régulations post transcriptionnelles de la HMGCoA réductase.

i. Régulation de la synthèse du cholestérol par les protéines SREBP et SCAP

La protéine SREBP est un facteur de transcription qui active l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol. Ces facteurs sont constitués de deux domaines transmembranaires et se trouvent dans le reticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseurs. On en dénombre trois: SREBP1a, SREBP1c et SREBP2 (Horton et al., 2002). La protéine SCAP est présente dans le RE et permet le transport du SREBP vers l'appareil de Golgi (Brown and Goldstein, 1997). Ces deux protéines sont sensibles aux oxystérols, des métabolites du cholestérol, grâce à la présence dans leur structure d'un domaine senseur d'oxystérols appelé « *sterol-sensing-domain »* (Brown and Goldstein, 1997). Lorsque les taux de stérols diminuent la SREBP active la synthèse du cholestérol en se fixant à l'extrémité N-terminal du SCAP par son domaine régulateur (Ikonen, 2008). A son tour, la SCAP recrute les protéines du complexe COPII (*Coat protein complex II*) et facilite la migration du SREBP dans l'appareil de Golgi. Une fois dans la membrane de l'appareil de Golgi, le SREBP subit deux clivages enzymatiques permettant la libération de son facteur de transcription qui migre dans le noyau où il reconnait les séquences SRE (Sterol Regulatory Element) présentes dans les promoteurs des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol et active ainsi leur transcription (Goldstein et al., 2006). En revanche, lorsque le taux cholestérol est élevé, le cholestérol se lie à la protéine SREBP et change sa conformation provoquant la formation du complexe SCAP-SREBP qui se lie à la protéine INSIG. Ce complexe SCAP-SREBP-INSIG va alors s'accumuler dans le RE (Adams et al., 2003, 2004) et n'active plus la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol (Goldstein et al., 2002) **(Figure 13)**.

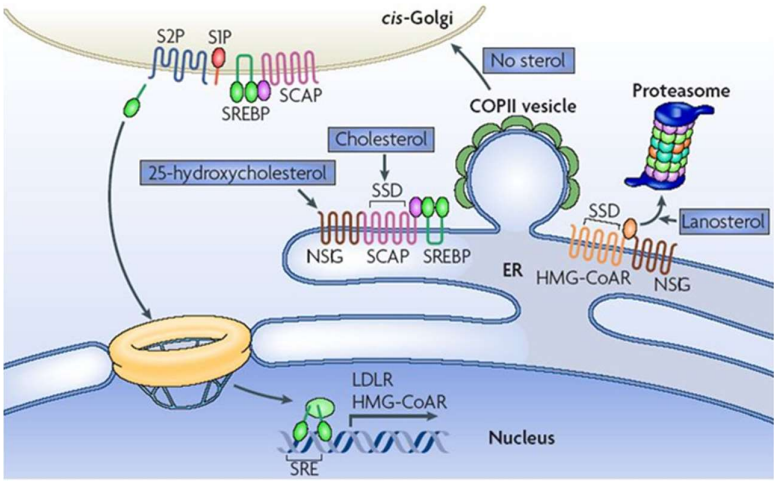


Figure 13 : Régulation de la synthèse de cholestérol via le SREBP et le SCAP.

Quand la concentration de stérols dans le réticulum endoplasmique (ER) est suffisante, la protéine INSIG empêche la pénétration du complexe SREBP-SCAP (protéine activant le clivage SREBP) dans les vésicules COPII. Le transport de SREBP vers le Golgi est nécessaire à la libération protéolytique du facteur de transcription, qui est ensuite transporté au noyau afin d'activer les gènes régulés par les stérols (tels que l'hydroxyméthylglutaryl CoA réductase (HMGCoAR)) et le récepteur de lipoprotéines de basse densité (LDLR)). La HMGCoAR est également régulée post-transcriptionnellement par le stérol, la liaison INSIG de la protéine conduisant à sa dégradation protéasomique (Ikonen, 2008).

ii. Régulation de la synthèse du cholestérol par les récepteurs LXR

D'autres facteurs transcriptionnels interviennent dans le contrôle de transcription des enzymes de la voie du mévalonate, notamment les récepteurs nucléaires récepteurs LXR. Ils existent sous deux isoformes : LXR alpha (α) et Beta (β) (Courtney and Landreth, 2016), qui présentent une spécificité d'expression par les organes. En effet, le LXR alpha est fortement exprimé dans le foie et d'autres tissus impliqués dans le métabolisme périphérique des lipides tels que le rein, l'intestin grêle, la rate et le tissu adipeux, alors que LXR beta est surtout exprimé dans le foie et le cerveau (Bełtowski and Semczuk, 2010; Jamroz-Wiśniewska et al., 2007).

Ces facteurs sont indispensables au maintien des taux de cholestérol. En effet, il a été montré que une déplétion de LXR (« silencing » via un plasmide) stimule l'expression et l'activité de la HMGCoA réductase, engendrant ainsi une augmentation de la synthèse de cholestérol (Wang et al., 2008). Les LXR forment avec les récepteurs rétinoïdes (RXR) des hétérodimères fonctionnels (Mounier et al., 2015), qui se fixent à des séquences spécifiques d'ADN nommée « éléments de réponses LXR » dans la région des promoteurs des gènes cibles. Les ligands endogènes de ces récepteurs sont les oxystérols (produit de dégradation du cholestérol) responsables du rétrocontrôle de la synthèse du cholestérol. Des ligands synthétiques, tels que

T0901317 et GW3965, ont été développés pour activer les LXR (Hong and Tontonoz, 2014). Lorsqu'ils sont inactifs, les hétéro-dimères LXR/RXR sont fixés à des co-répresseurs, et la transcription des gènes cibles n'a pas lieu (Baranowski, 2008). Quand un ligand (tels que les oxystérols) se fixe sur l'hétéro-dimère, ce dernier se dissocie des co-répresseurs, et recrute des co-activateurs, engendrant la transcription des gènes cibles codant les protéines Abca1 et ApoE augmentant ainsi le transport du cholestérol des astrocytes vers les neurones (Baranowski, 2008) **(Figure 14)**.

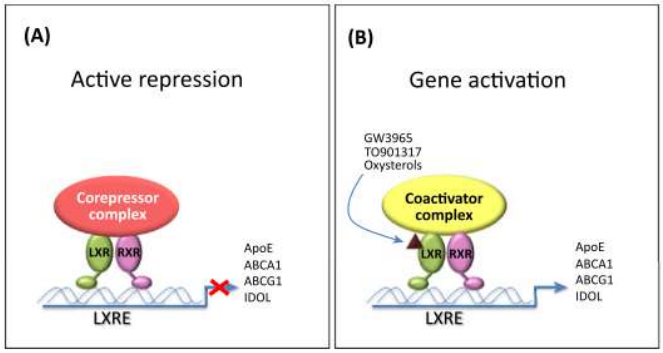


Figure 14 : Mécanisme de la régulation transcriptionnelle induite par les LXRs.

(A) En absence de ligand, les complexes LXR-récepteur du rétinoïde X (RXR) se lient à l'ADN au niveau des éléments de réponse LXR, où ils interagissent avec les complexes corépresseurs et inhibent la transcription des gènes du métabolisme du cholestérol, (B) En présence de ligands synthétiques ou endogènes, les LXR subissent un changement de conformation qui dissocie le complexe corépresseur, permettant le recrutement d'un complexe co-activateur et la promotion de la transcription du gène cible (Courtney and Landreth, 2016).

Les récepteurs LXR contrôlent également l'expression des protéines de l'APOE et l'ABCA1. En effet, Il a été montré que des agonistes des récepteurs LXR entraine une augmentation des niveaux protéiques de l'ABCA1 et de l'enrichissement en lipides (lipidation) de l'APOE suggérant une augmentation de l'efflux du cholestérol (Carter et al., 2017; Kurano et al., 2011).

iii. Régulation post-traductionnelle de l'HMGCoA réductase

Egalement, l'HMGCoA réductase, subit des régulations post-transcriptionnelles via les stérols par l'intermédiaire de l'INSIG **(Figure 15)**. La demi-vie de cette enzyme est affectée par la présence ou l'absence du cholestérol dans son domaine sensible aux stérols. Quand le taux de cholestérol est bas, sa dégradation est ralentie ($t_{1/2}$=12h), permettant ainsi la synthèse du cholestérol. Par contre quand le cholestérol s'accumule, l'enzyme interagit avec l'INSIG et est dégradée en moins d'une heure supprimant ainsi la synthèse du cholestérol (Song et al., 2005).

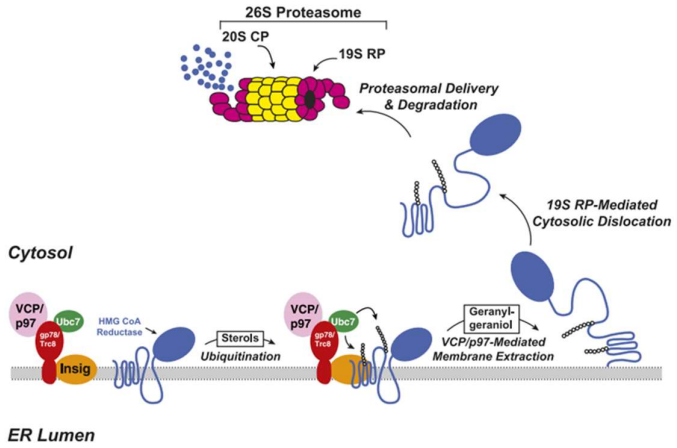


Figure 15 : Dégradation de la HMGCoA réductase mediée par l'INSIG.

Quand le cholestérol s'accumule, la HMGCoA reductase interagit avec l'INSIG et est dégradée par ubiquitination au niveau du cytosol (Schumacher et al., 2015).

c. Transport du cholestérol des astrocytes aux neurones

Après sa synthèse dans les astrocytes, le transfert du cholestérol aux neurones est assuré par sa liaison aux apolipoprotéines, principalement l'apolipoprotéine E (APOE) (Lane-Donovan et al., 2014) et sa sortie des astrocytes grâce à des transporteurs (Mauch et al., 2001) **(Figure 16)**. Les apolipoprotéines sont les constituants protéiques des lipoprotéines. Elles sont responsables de la formation et de la stabilisation des particules lipoprotéiques, et jouent un rôle essentiel dans le transport des lipides. Elles constituent une grande famille de protéines qui partagent entre elles des ressemblances fonctionnelles, structurales et séquentielles (Lane-Donovan et al., 2014). Les apolipoprotéines exprimées au niveau du cerveau sont l'apolipoprotéine E (APOE), l'apolipoprotéine J ou clusterine (APOJ/CLU) et l'apolipoprotéine D (APOD) (Pfrieger and Ungerer, 2011). Les astrocytes expriment majoritairement l'APOE (en condition physiologique) (Boyles et al., 1985; Xu, 2006), mais aussi l'APOJ et l'APOD (Vitali et al., 2014). Il a été démontré que la présence de l'APOE est indispensable à la sécrétion des lipides, essentiellement du cholestérol non esterifié et des phospholipides, produits par les astrocytes (Liao et al., 2017). Toutefois, chez les souris déficientes en APOE, il a été montré que l'APOJ compense le déficit en APOE (Bertrand et al., 1995). Il a été montré que les lipoprotéines (les particules HDL-like) contiennent des précurseurs de cholestérol tels que le lathostérol et le desmostérol indiquant que les astrocytes peuvent aussi secréter des précurseurs, qui sont ensuite absorbés par les neurones où ils seront transformés en cholestérol (Mutka et al., 2004; Wang et al., 2007b).

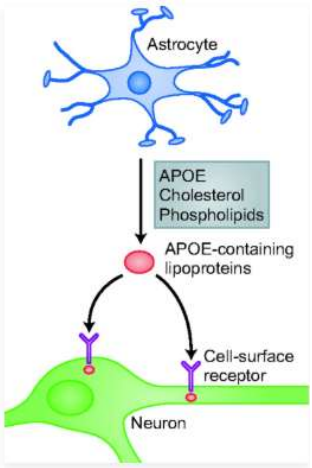


Figure 16 : Transport du cholestérol des astrocytes aux neurones par l'APOE.

Les astrocytes sécrètent l'APOE qui acquiert le cholestérol formant ainsi des lipoprotéines contenant l'APOE. Ceux-ci sont transportés aux neurones où ils sont endocytés via des récepteurs de surface cellulaire (membres de la famille des récepteurs LDL). Par conséquent, le cholestérol est délivré aux neurones (Vance, 2012).

La sécrétion de lipoprotéines est permise par transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC). Le transporteur ABCA1 est exprimé à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales, mais son expression est beaucoup plus élevée dans les neurones (Fukumoto et al., 2002; Koldamova et al., 2003; Wellington et al., 2002). Il permet le transport du cholestérol des astrocytes aux neurones en contribuant à la formation des particules HDL-like, riche en apolipoprotéines et pauvre en lipides qui peuvent être internalisées par les cellules (Oram, 2003). La sécrétion d'APOE par les astrocytes facilite ,via ABCA1, la formation de particules d'HDL plus riches en lipides (Ito et al., 2014). Chez les souris KO ABCA1, une diminution de de l'efflux du cholestérol vers l'APOE exogène a été observé ainsi qu'une diminution de l'expression de l'APOE a été observée dans le cerveau. Cette diminution était plus prononcée au niveau de l'hippocampe, et du striatum. De plus, *in vitro* une diminution de l'ABCA1 engendre une diminution de sécrétion de l'APOE au niveau des astrocytes (Hirsch-Reinshagen et al., 2004). Tous ces résultats suggèrent que la sécrétion d'APOE par les astrocytes est dépendante de l'ABCA1 (Hirsch-Reinshagen et al., 2004; Koldamova et al., 2005). De même, l'absence d'APOE engendre une augmentation de l'ABCA1 qui suggère qu'une diminution de l'efflux (causée par une perte de l'APOE) est compensée par une augmentation de l'ABCA1 (Jansen et al., 2009).

d. Internalisation du cholestérol

Une fois sorties des astrocytes, les lipoprotéines contenant du cholestérol sont importées dans les neurones via des protéines transmembranaires, qui appartiennent à la famille des récepteurs Low density lipoprotein receptors (LDLr) **(Figure 17)**. Elles sont localisées au niveau de domaines transmembranaires riches en clathrine (Lane-Donovan et al., 2014). Plusieurs récepteurs semblent être exprimés dans le système nerveux central, il s'agit du LDLr, du LRP1 (LDR related protein) (récepteur 1 apparenté au LDLR), du VLDLr ou encore de l'APOER2. Ces récepteurs semblent exprimés par l'ensemble des types cellulaires du cerveau (Pohlkamp et al., 2017). Après la liaison des lipoprotéines aux récepteurs LDLr, le complexe lipoprotéine-récepteur est internalisé par endocytose et permet l'entrée du cholestérol dans les neurones. Cette endocytose prend plusieurs formes : la voie des endosomes précoces de tri et de recyclage, la voie des endosomes tardifs et celle des lysosomes (Ikonen, 2008). Les LDLr forment alors des vésicules enveloppées de clathrines. Après endocytose, ces vésicules fusionnent avec les endosomes et perdent leur enveloppe. Les endosomes ont un pH acide qui engendre une dissociation du complexe lipoprotéines-LDLr. Le LDLr retourne à la surface cellulaire par l'intermédiaire des vésicules de recyclage (Ikonen, 2008).

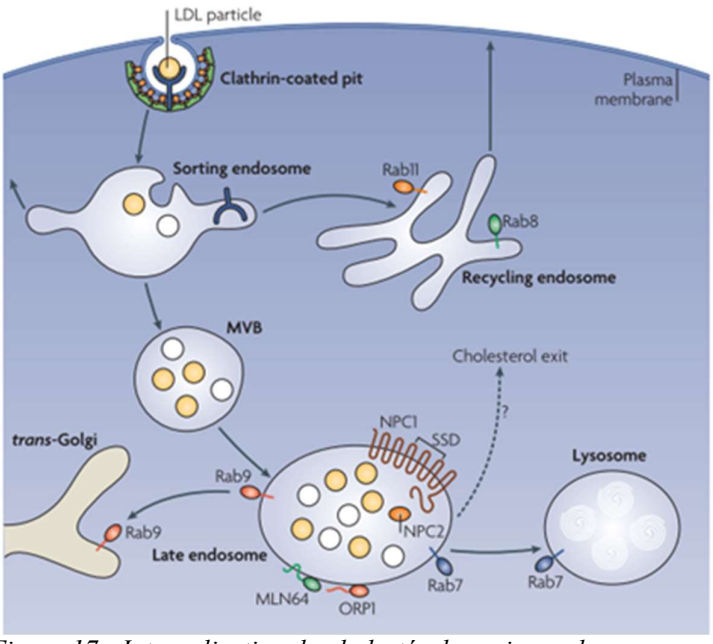


Figure 17 : Internalisation du cholestérol au niveau des neurones.

Les lipoprotéines se lient aux récepteurs LDLr. Ce complexe lipoprotéine-récepteur est internalisé par endocytose assurant l'entrée du cholestérol dans les neurones, où il sera capté par les endosomes : endosome de recyclage ou endosomes tardifs. L'excès de cholestérol dans le reticulum endoplasmique est estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) pour être stocké dans des gouttelettes de lipides cytoplasmiques(Ikonen, 2008).

e. Adressage et stockage du cholestérol

Une fois le cholestérol est arrivé au niveau neuronal, le cholestérol va être stocké ou transporté au niveau de la membrane cellulaire. Une partie du cholestérol est transporté dans des vésicules des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique. L'autre partie du cholestérol importé, est transportée vers les lysosomes par l'intermédiaire des protéines de type niemman pick 1 et 2 (NPC1 et NPC2) **(Figure 18)**. Ces deux protéines transportent le cholestérol en dehors du système endosomal/lysosomal (Ikonen, 2008; Prinz, 2007; Soccio and Breslow, 2004). Elles se lient chacune au cholestérol et agissent en tandem au niveau des endosomes et/ou des lysosomes pour faciliter la sortie du cholestérol (figure) (Vance, 2010; Wang et al., 2010).

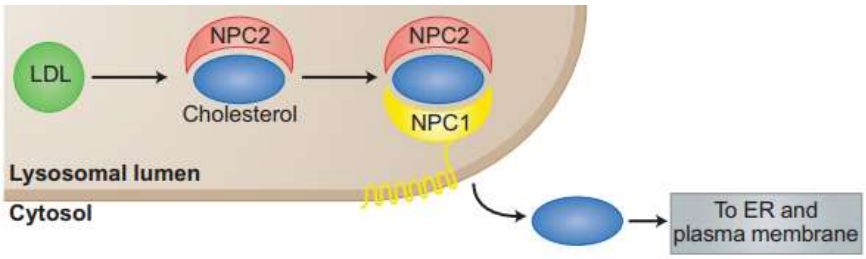


Figure 18 : NPC1 et NPC2 facilite l'export du cholestérol vers les endosomes tardifs et/ou les lysosomes.

Le cholestérol (en bleu) est libéré par les LDL endocytées et se lie à NPC2 (en rouge). La protéine NPC2 transfère directement le cholestérol à la protéine NPC1 (jaune), située dans la membrane du lysosome. Par l'intermédiaire de cette fixation, le cholestérol est exporté de la membrane lysosomale et est transporté via le cytosol vers le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Vance, 2012).

Un dysfonctionnement de ces deux protéines a été décrit dans la maladie neurodégénérative de NIEMANN-PICK. Il s'agit d'une maladie héréditaire autosomale caractérisée par une mutation dans le gène *NPC1* ou *NPC2* dont la conséquence est que le cholestérol non estérifié est séquestré dans les endosomes tardifs et/ou lysosomes et sa quantité diminue au niveau de la membrane plasmique et du RE. Ceci entraîne une démyélinisation et une altération de la composition des radeaux lipidiques et des membranes synaptiques. Dans cette pathologie, ont été décrites une accumulation du cholestérol au niveau des corps cellulaires neuronaux et une réduction de la teneur en cholestérol des axones distaux (Karten et al., 2002).

Le cholestérol en excès est en partie estérifié par l'acétyl-CoA acétyltransférase (ACAT), localisée dans le RE des neurones. Cette forme estérifiée est stockée dans les neurones sous forme de gouttelettes lipidiques (Chang et al., 2009). Cette forme est minoritaire. Elle ne forme que 1 % du cholestérol du cerveau. C'est une forme d'inactivation. Ainsi il existe une enzyme,

l'hydrolase, qui peut libérer le cholestérol à partir des esters. Ces gouttelettes constituent une forme moins toxique que le cholestérol ce qui protège les neurones contre l'excès de cholestérol qui pourrait avoir des effets neurodégénératifs.

f. Elimination du cholestérol en excès

Malgré la régulation fine de la synthèse et des échanges intercellulaires du cholestérol, tout excès de ce dernier doit être continuellement éliminé par excrétion pour éviter qu'il ne s'accumule dans les neurones, vu que cette accumulation peut être neurotoxique. L'élimination est donc permise par deux processus :

- Une voie principale par conversion en métabolites [principalement le 24S-hydroxycholesterol (24OHC)]
- Une voie minoritaire par transport actif.

i. Conversion du cholestérol en 24S-hydroxycholesterol

La principale voie d'élimination du cholestérol du cerveau repose sur son oxydation en 24Shydroxycholesterol plus hydrophile capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Lund et al., 1999) **(Figure 19)**. Cette oxydation est assurée par l'enzyme : cholestérol-24-hydroxylase codée par le gène *CYP46A1* (Lund et al., 1999; Mast et al., 2017). La majorité du cholestérol cérébral éliminé est soumis à l'action de la CYP46A1 (Lund et al., 2003).

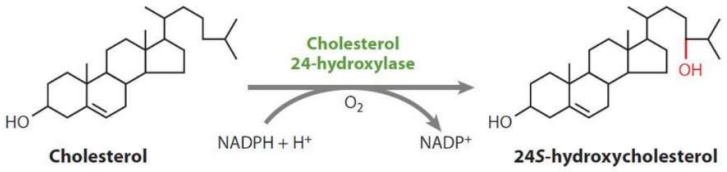


Figure 19 : Conversion enzymatique du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol.

- La cholestérol-24-hydroxylase

La CYP46A1 est une enzyme microsomale exprimée presque exclusivement dans le cerveau chez le rat, mais on la retrouve également en faible proportion dans le foie et les testicules chez la souris (Lund et al., 1999). Chez l'homme, elle est exprimée en faible proportion dans le foie et possède une plus forte expression dans le cerveau (Milagre et al., 2008). Dans le cerveau, Ramirez et al. ont démontré, par des approches d'immunohistochimie, que cette enzyme est localisée au niveau de la membrane du RE dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones, et est absente des axones (Ramirez et al., 2008). La CYP46A1 est fortement exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex, dans les cellules de Purkinje du cervelet, ainsi que dans les interneurones hippocampiques et cérébelleux (Ramirez

et al., 2008). L'importance physiologique de cette enzyme a été démontrée par modulation de son expression (souris KO, surexpression virale) ou par modulation pharmacologique. Les souris KO pour la CYP46A1 ne montre pas de changement du taux de cholestérol cérébral. Cette diminution de dégradation est alors accompagnée par une diminution de la synthèse du cholestérol, sans doute en réponse à la diminution de sa dégradation pour maintenir un taux stable de cholestérol (Lund et al., 2003). De plus, une surexpression de la CYP46A1 entraîne une augmentation des quantités de 24OHC, mais les niveaux de cholestérol ne sont pas affectés, qui pourrait s'expliquer par une synthèse compensatoire de cholestérol (Hudry et al., 2010).
Sur le plan pharmacologique, plusieurs composés peuvent moduler l'activité de cette enzyme comme le «Voriconazole», imidazole antifongique, qui est un inhibiteur de la CYP46A1 à la fois in vitro et in vivo, et l '«Efavirenz», un médicament anti-rétroviral qui active la CYP46A1 in vivo (Anderson et al., 2016). L'inhibition de la CYP46A1 diminue les taux de 24OHC, ainsi que les taux d'ARNm de l'HMGCoA réductase et de précurseurs du cholestérol (Shafaati et al., 2010). D'autre part, l'activation de la CYP46A1 augmente le renouvellement du cholestérol cérébral, sans modification du taux de cholestérol (Mast et al., 2017). Tous ces résultats indiquent que le cerveau possède un processus bien réglé de synthèse et d'exportation du cholestérol qui permet de maintenir un niveau de cholestérol stable ce qui est fondamental pour le fonctionnement normal du cerveau.

- Le 24OHC

Le produit de dégradation du cholestérol, le 24OHC, traverse les membranes lipidiques beaucoup plus facilement et rapidement que le cholestérol. En effet, l'ajout du groupement hydroxyle au bout de la chaine aliphatique permet une interaction plus favorable avec les phospholipides membranaires. (Meaney et al., 2002). Le 24OHC est ainsi capable de franchir rapidement les membranes lipidiques et par la suite la BHE. Il a été démontré chez le rat que le passage du 24OHC à travers la BHE est assuré par diffusion passive ou par l'intervention du transporteur *organic anion transporting polypeptide 2* (OATP2) (Ohtsuki et al., 2007). Ce métabolite joue un rôle de détoxification du cerveau et prévient les l'excès de cholestérol. L'efflux du 24OHC dans un cerveau humain correspond à un taux de 2-7 mg/jour (Iuliano et al., 2015; Lutjohann et al., 1996).

ii. Elimination du cholestérol par des transporteurs

Une faible quantité du cholestérol libre est éliminée par l'intermédiaire du transporteur ABCA1 exprimé par les neurones et ensuite passe dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Strazielle

and Ghersi-Egea, 2013). La lipoprotéine excrétée par l'ABCA1 passe du LCR vers la circulation à travers la BHE (dans ce sens la perméabilité est plus grande). Le passage à travers la BHE est permis par des transporteurs ABCA1 exprimés par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Gosselet et al., 2009; Panzenboeck et al., 2002).

III. Rôles du cholestérol dans le fonctionnement cérébral

Dans le cerveau, le cholestérol a des fonctions propres mais sa voie de synthèse donne lieu à plusieurs molécules, telles que les neurostéroïdes, les isoprenoïdes et les oxystérols, qui ont une fonction propre au niveau du système nerveux central. Ces différentes fonctions sont présentées dans ce qui suit.

1. Cholestérol : le constituant principal de la myéline

Comme déjà mentionné, le cholestérol est le constituant principal de la gaine de myéline. Au cours du développement cérébral, les oligodendrocytes assemblent la myéline compacte et forment la gaine de myéline. La myéline fournit une isolation électrique à l'axone et est essentielle pour la conduction rapide des potentiels d'action par impulsion saltatoire. Le cholestérol constitue plus de 25% de la teneur totale en lipides de la myéline, comparé à moins de 20% dans les autres membranes plasmiques (Morell and Jurevics, 1996). Le rôle du cholestérol dans la myélinisation a été étudié chez des souris ayant une mutation traduite par une inactivation de l'enzyme de biosynthèse du cholestérol, la squalène synthase (SQS; gène Fdft1) (Saher et al., 2005). Cette inactivation influence ainsi la biosynthèse du cholestérol spécifiquement dans la glie myélinisante, les oligodendrocytes dans les cellules du SNC et de Schwann dans le SNP. Dans ces souris mutées, au niveau de la substance blanche, une diminution de la myélinisation est observée. De plus, les axones avaient une myéline mince ou n'était pas myélinisé. Ces résultats montrent que le cholestérol incorporé dans la myéline provient exclusivement des oligodendrocytes (Saher et al., 2005).

2. Modulation de la fluidité et de la rigidité membranaire par le cholestérol.

Le positionnement du cholestérol dans la bicouche lipidique et son interaction avec d'autres lipides jouent un rôle important dans la fluidité de la membrane. Le cholestérol est inséré dans sa majeure partie dans la bicouche lipidique et seul le petit groupement hydroxyle fait face à l'environnement extérieur. En conséquence, ses anneaux de stéroïdes sont à proximité et attiré par les chaînes hydrocarbonées des lipides voisins. Cela donne un effet de condensation dans

les membranes cellulaires (Demel and De Kruyff, 1976). Comme la chaîne hydrocarbonée du cholestérol est rigide, elle a tendance à s'associer aux acides gras à longues chaînes acyle saturées, notamment de la sphingomyéline, conduisant à la formation de phases liquides ordonnées et moins fluides (Ramstedt and Slotte, 2002; Silvius, 2003). Plusieurs expériences ont permis de montrer que la concentration des membranes en cholestérol influe sur leur fluidité et leur perméabilité aux molécules hydrophiles. En effet, l'élimination du cholestérol de la membrane plasmatique par un traitement avec la Beta-methyl-cyclodextrin augmente la fluidité membranaire (Gimpl et al., 1997). Par ailleurs, une addition de cholestérol dans une culture de neurones hippocampiques de rat rend la membrane plus rigide (Fernández-Pérez et al., 2018). Levitan et ses collègues ont quant à eux montré que la concentration de cholestérol dans la membrane plasmatique des cellules endothéliales affecte également l'interaction entre cette membrane et le cytosquelette (Levitan, 2016).

3. Rôle du cholestérol dans la communication neuronale

a. Localisation dans les radeaux lipidiques

Dans la membrane des neurones, le cholestérol se trouve en forte concentration dans des structures spécialisées appelées «radeaux lipidiques» **(Figure 20)**. Ces derniers sont des domaines membranaires spécialisés contenant du cholestérol, des glycosphingolipides et des phospholipides avec des chaînes d'hydrocarbures saturés (Lamaida et al., 1997). En plus de ces lipides, se trouvent des protéines, ayant subi des modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation. L'ancrage des protéines synaptiques dans les radeaux lipidiques permet de contrôler leur distribution et leur disponibilité à la membrane ou elles exercent leur fonction. Par conséquent, ces domaines constituent des zones privilégiées pour le contrôle de l'activité de ces protéines. Ainsi, les radeaux lipidiques sont définis comme des plateformes de signalisation essentielles à la transmission de signaux entre les neurones.

Les radeaux lipidiques peuvent prendre des formes particulières appelées cavéoles **(Figure 20)**. Les cavéoles sont des invaginations membranaires en forme d'oméga **(Ω)** impliquées dans la signalisation cellulaire et l'endocytose. Elles contiennent une couche de protéine appelée cavéoline dans leur feuillet interne de la bicouche membranaire (Sebastião et al., 2013).La formation de cavéoles à la surface des cellules et l'expression de la cavéoline sont modulées par la teneur en cholestérol de la cellule. En effet, des augmentations du taux de cholestérol cellulaire augmentent l'expression de la cavéoline, tandis que la déplétion en cholestérol supprime sa production (Fielding and Fielding, 2004).

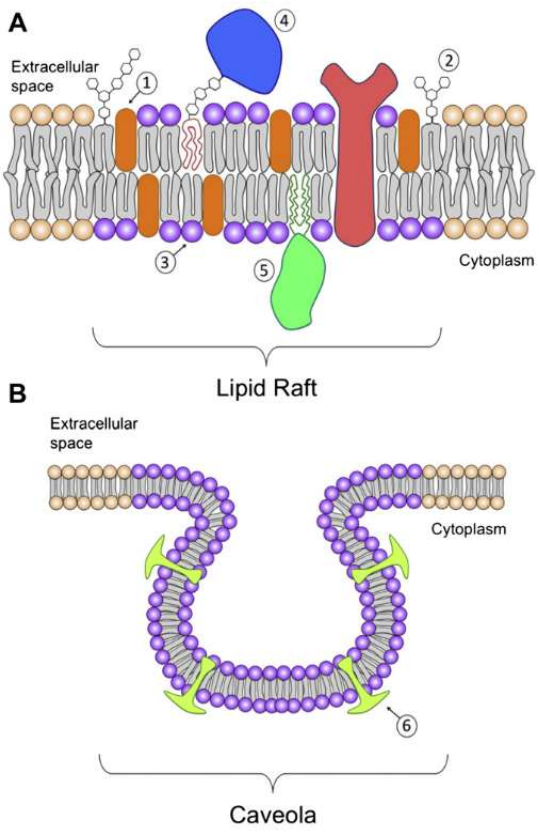


Figure 20 : Les différents types de radeaux lipidiques.

A) Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires étroitement liés, principalement en raison de la présence (1) de cholestérol, (2) de glycosphingolipides et (3) de phospholipides à chaîne hydrocarbonée saturée. Les protéines glycosylphosphatidylinositol (4) et les protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles, telles que la palmitoylation et la myristoylation, sont largement ancrées dans ces domaines (5).

B) Les cavéoles représentent un sous-ensemble de radeaux lipidiques formant une courbure interne induite par les protéines de cavéoline (6) (Sebastião et al., 2013).

b. Action du cholestérol dans les radeaux lipidiques.

Les radeaux lipidiques seraient essentiels au fonctionnement normal des neurones et des circuits neuronaux (DeBruin and Harauz, 2007; Gielen et al., 2006; Tsui-Pierchala et al., 2002). De façon intéressante, les régions pré- et post-synaptiques sont très riches en radeaux lipidiques, suggérant que ces composants pourraient affecter la fonction synaptique. Du coté pré-synaptique, les radeaux lipidiques modulent l'exocytose des neurotransmetteurs et, du côté post-synaptique, ils facilitent le regroupement des protéines telles que les récepteurs des neurotransmetteurs (Allen et al., 2007; Sebastião et al., 2013). Ainsi, le taux de cholestérol présent dans les radeaux lipidiques peuvent affecter la transmission neuronale ainsi que la plasticité synaptique (Allen et al., 2007; Sebastião et al., 2013).

i. Rôle pré-synaptique du cholestérol et régulation de la libération des neurotransmetteurs

La libération des neurotransmetteurs au niveau post-synaptique est régulée par (1) la concentration des membranes en cholestérol sur la biophysique membranaire, (2) l'interaction directe du cholestérol avec les protéines de contrôle de l'exocytose, et (3) la présence du cholestérol dans les radeaux lipidiques. En effet, l'exocytose des vésicules synaptiques induit

une courbure de la membrane dont l'étendue est déterminée par la composition lipidique de la membrane (Rosa and Fratangeli, 2010). Au niveau présynaptique, l'étape critique de la libération des neurotransmetteurs par exocytose est la création d'un pore de fusion qui relie différents compartiments intracellulaires à la membrane et permet la libération du contenu des vésicules (Lindau and Alvarez De Toledo, 2003). La diffusion rapide du cholestérol entre la bicouche lipidique, appelé flipflop, contribue à la formation de pores de fusion. Ainsi, le cholestérol est un modulateur clé de la dynamique des pores de fusion et des vitesses de fusion. De plus, le cholestérol, constitue 40% des lipides totaux trouvés dans les vésicules synaptiques et stabilise les domaines incurvés de la membrane qui se forment au cours de la fission des vésicules et du bourgeonnement. En fait, la réduction pharmacologique du cholestérol (en utilisant l'acide zaragosique, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol) réduit les taux d'exocytose dans les neurones de l'hippocampe (Linetti et al., 2010).

Au niveau pré-synaptique, le cholestérol jouerait aussi un rôle dans le maintien de l'intégrité des radeaux lipidiques, notamment de sa composition en certaines protéines (Head et al., 2014). En effet, il a été décrit que le cholestérol contrôlait le bon fonctionnement de protéines tels que les transporteurs responsables de la recapture des neurotransmetteurs, et en particulier celui de la dopamine (DAT). En effet, la localisation du DAT serait contrôlée par les lipides membranaires et par la formation de complexes entre le DAT et des protéines associées aux radeaux, telles que la flotilline (Cremona et al., 2011; Sorkina et al., 2013). Récemment, il a été montré dans une étude en microscopie en super-résolution, que le DAT pourrait être séquestré dans des nanodomaines dépendants du cholestérol au niveau de la membrane pré-synaptique des neurones et qu'une déplétion en cholestérol réduit la localisation de ce transporteur dans ces domaines (Zeppelin et al., 2018).

ii. Rôle du cholestérol au niveau post-synaptique

La plupart des récepteurs post-synaptiques sont trouvés dans les radeaux lipidiques (Anchisi et al., 2013; Martin et al., 2014; Vance, 2012). Un des facteurs qui impactent la communication neuronale est la composition et la quantité de récepteurs trouvés du coté post-synaptique des synapses.(Petrov and Zefirov, 2013). L'activité du récepteur et la transduction du signal dépendent également du contenu membranaire en cholestérol. Une déplétion aiguë de cholestérol inhibe la translocation des récepteurs AMPA conduisant une réduction de l'expression de ces récepteurs au niveau de la surface membranaire (Hou et al., 2008). Une déplétion chronique du cholestérol augmente l'internalisation de ces récepteurs (Hering et al., 2003).

iii. Rôle du cholestérol dans la plasticité synaptique

Comme mentionné précédemment, la LTP ainsi que la LTD sont les formes durables de la plasticité fonctionnelle des synapses qui dépendent en général du trafic des récepteurs AMPA (AMPAR) en réponse à l'activation des récepteurs NMDA (Malinow and Malenka, 2002). Le trafic des récepteurs des neurotransmetteurs pendant la plasticité synaptique nécessite de multiples acteurs tels que les voies de signalisation et la machinerie de transport des protéines (Huganir and Nicoll, 2013). L'altération du cholestérol pendant la plasticité synaptique et sa contribution à la modification de la fonction synaptique ont été étudiées récemment (Brachet et al., 2015). Brachet et collègues ont montré qu'une perte de cholestérol aiguë peut affecter la fonction synaptique. Les enregistrements électrophysiologiques ont montré que l'élimination du cholestérol potentialise la fonction postsynaptique au niveau des synapses excitatrices, augmentant spécifiquement la transmission synaptique médiée par le récepteur AMPA (AMPAR). De plus, un ajout de cholestérol diminue la LTP (Brachet et al., 2015).

Une diminution de la synthèse du cholestérol par l'administration de statines altère aussi la plasticité synaptique. Une étude de Parent et al a montré que le traitement des coupes de neurones hippocampiques par la simvastatine favorise la transmission synaptique médiée par les récepteurs NMDA. Cette augmentation est associée à la distribution de sous-unité GluN2B du récepteur NMDA au niveau de la surface cellulaire. La teneur en cholestérol total reste inchangée alors qu'une diminution des isoprénoides, intermédiaires de la synthèse du cholestérol était observée. A son tour, l'activation des récepteurs NMDA durant la plasticité synaptique diminue le taux de cholestérol, suggérant que la plasticité synaptique et plus spécifiquement la LTP provoque une perte rapide et durable du cholestérol dans les neurones hippocampiques (Brachet et al., 2015; Sodero et al., 2012).

Ces données révèlent l'existence d'une interaction dynamique entre les niveaux de cholestérol dans les neurones hippocampiques et la plasticité synaptique, et fournissent un lien mécanistique entre les changements de cholestérol dépendants de l'activité, du trafic des récepteurs AMPA et NMDA et la plasticité synaptique.

4. Synthèse d'autres molécules actives grâce à la voie du mévalonate

a. Neurostéroïdes

Le terme 'neurostéroïdes' a été introduit pour la première fois dans les années 1980 par Baulieu pour décrire les stéroïdes produits *de novo* dans le cerveau à partir du cholestérol ; il a ensuite

été élargi pour inclure les dérivés stéroïdiens du métabolisme périphérique, mais ayant une action au niveau central.

Les neurostéroïdes tels que l'alloprégnanolone (AlloP), le THDOC et l'androstanediol, sont produits par une série de réduction stéroïde impliquant la 5α-réductase et la 3α-hydroxystéroïde oxydoréductase (3α-HSOR) **(Figure 21)**. Ces étapes de réduction se produisent dans les tissus périphériques tels que les tissus endocriniens reproducteurs, le foie et la peau (Do Rego et al., 2009). Les neurostéroïdes sont des molécules lipophiles et peuvent donc facilement traverser la BHE et s'accumuler dans le cerveau pour affecter les fonctions cérébrales (Reddy, 2014).

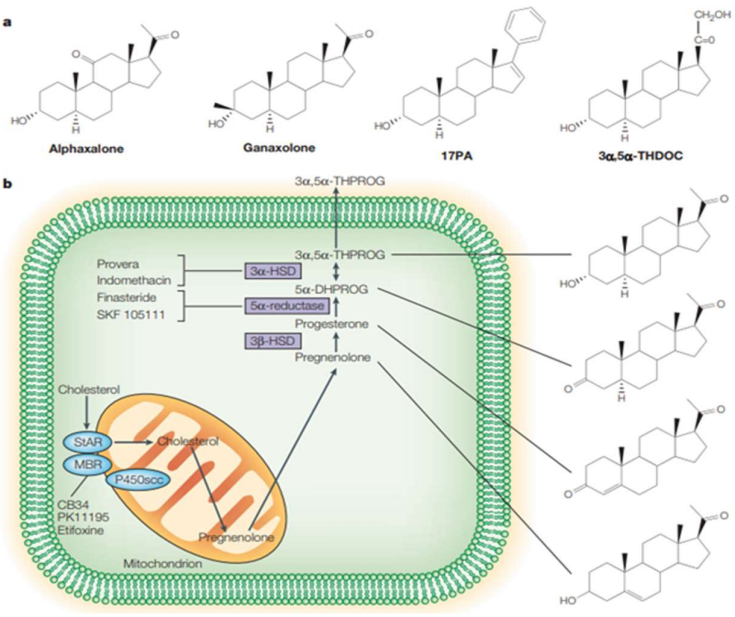


Figure 21 : Structure et synthèse des neurostéroïdes (Belelli and Lambert, 2005).

Les neurostéroïdes sont également produits localement dans le SNC (dans les cellules gliales et les neurones du système nerveux central et périphérique) à partir de précurseurs d'hormones stéroïdiennes et de précurseurs stéroïdiens comme le cholestérol ou la prégnénolone (Reddy and Rogawski, 2012; Vallée, 2016). Cette stéroïdogenèse implique plusieurs enzymes. L'étape initiale de cette voie est la conversion du cholestérol en pregnénolone par le P450scc (l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol du cytochrome P450, CYP11A) exprimée par les astrocytes et les neurones du cerveau (Agís-Balboa et al., 2006) **(Figure 21)**. Cette étape est suivie par la conversion de prégnénolone en progestérone par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (Guennoun et al., 1995). La neurostéroïdogenèse a été décrite dans différentes régions du cerveau comme le cortex, l'hippocampe et l'amygdale (Agís-Balboa et al., 2006).

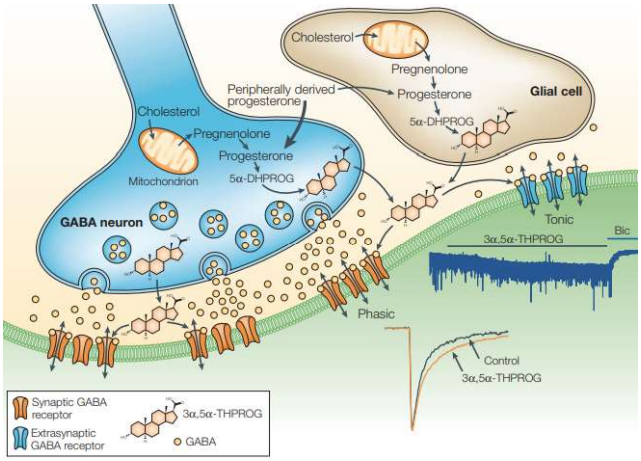


Figure 22 : Les neurostéroïdes: modulateurs de la transmission GABA.

Une représentation schématique d'une synapse inhibitrice et de la modulation de l'inhibition neuronale par des neurostéroïdes libérés localement. Le GABA (acide γ-aminobutyrique) libéré, active rapidement les récepteurs GABAA postsynaptiques donnant lieu à un courant post-synaptique inhibiteur. Les neurostéroïdes libérés localement par les neurones prolongent la durée de telles réponses, renforçant ainsi l'inhibition synaptique (Belelli and Lambert, 2005).

Les neurostéroïdes agissent comme des neuromodulateurs, et ciblent les récepteurs GABAA, NMDA et sigma 1, et ont été localisés dans les neurones qui expriment ces cibles (Gunn et al., 2015; Reddy and Estes, 2016). Plus particulièrement, les neurostéroïdes sont de puissants agonistes allostériques des récepteurs GABA-A trouvés à la fois au niveau synaptique et au niveau postsynaptique (Gunn et al., 2015; Reddy and Estes, 2016) **(Figure 22)**. Le mode d'action des neurostéroïdes dépend de leur concentration: à fortes concentrations, les neurostéroïdes activent directement les récepteurs, et à faibles concentrations, ils potentialisent allostériquement les courants des récepteurs GABA-A (Lambert et al., 1995). Les neurostéroïdes pourraient participer à la physiopathologie de certaines maladies neuropsychiatriques. En effet, des études cliniques chez l'homme ont associé ces hormones à la dépression et aux troubles de l'humeur post-partum (MacKenzie and Maguire, 2014; Ströhle et al., 1999). Chez les rongeurs, une étude menée par Rougé-Pont a montré que l'AlloP contrôle la libération de dopamine dans le NAc en réponse à l'administration de morphine, suggérant que ce neurosteroide a un effet stimulant sur le système mesocorticolimbique connu pour son rôle dans les processus de récompense et de motivation (Rougé-Pont et al., 2002).En revanche, une étude de Vallée et collègues montre que l'administration aiguë de différentes classes de drogues, telles que la cocaïne, la morphine, la nicotine, l'alcool et la THC augmente significativement le taux d'un autre neurosteroïde ; le prégnénolone au niveau du cerveau. L'augmentation observée par la THC était la plus importante, et était associé à une

augmentation de l'expression de l'enzyme cytochrome P450scc, l'enzyme responsable de la synthèse du PREG à partir du cholestérol au niveau cérébral. De plus, l'injection de PREG chez les rats ayant reçu une injection aiguë de THC diminue les symptômes d'intoxication de la THC (Vallée et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les neurostéroïdes peuvent être médiateurs des réponses à certaines drogues d'abus ainsi que leur libération peut être protectrice dans d'autres cas.

Les neurostéroïdes sont considérés comme des nouvelles cibles dans la thérapie de certains troubles du système nerveux central tels que l'épilepsie (Reddy, 2014), la dépendance à l'alcool, la maladie d'Alzheimer, le trouble bipolaire, la migraine et le sevrage tabagique (Reddy and Estes, 2016). Par exemple, dans le cadre de la dépendance à l'alcool, des études précliniques ont montré que la manipulation pharmacologique des niveaux de neurostéroïdes modulerait les réponses comportementales induites par la prise d'alcool chez les rongeurs. Par exemple, une étude a montré que la prégnénolone et le sulfate de prégnénolone à des doses extrêmement faibles (0,01–1 µg / kg) atténuaient ou bloquaient l'effet anxiolytique de l'éthanol, évalué par le test de labyrinthe en croix surélevé (Melchior and Ritzmann, 1994). Plus récemment, il a été montré que l'inhibition de la synthèse des neurostéroïdes par l'administration du finastéride, un inhibiteur de la 5-alpha réductase, retardait l'établissement d'une préférence pour l'éthanol stable dans un modèle murin de prise d'alcool (Ford et al., 2008) .

b. Isoprénoïdes

Outre le cholestérol, la voie du mévalonate permet également la synthèse en aval de plusieurs intermédiaires non-stéroïdes appelés isoprénoïdes (Hooff et al., 2010) **(Figure 13)**. Le farnesyl pyrophosphate (FPP) et le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP) sont les principaux intermédiaires isoprénoïdes synthétisés par la voie du mévalonate. Ils permettent la prénylation des protéines, grâce les enzymes farnesyl transférase (FTase) et géranylgéranyl transférase (GGTase) -I et -II (Zhang and Casey, 1996). Les taux de FPP et de GGPP sont beaucoup plus élevés dans le cerveau que dans les autres tissus de l'organisme (Hooff et al., 2010), ce qui refléte des besoins plus importants en prénylation des protéines dans ce tissu (Mohamed et al., 2015).

Le plus grand groupe de protéines prénylées sont les petites protéines G qui sont des GTPases (sGTPases) et lient le GTP. Elles sont classées en sous-familles (Ras, Rho et Rab) en fonction de la séquence et la similarité de leurs fonctions (Rojas et al., 2012). Pour exercer leur fonction, Les sGTPases doivent s'associer à la membrane cytoplasmique et pour ce faire établir une liaison covalente avec un groupe lipidique. C'est pourquoi ces familles sGTPases subissent une

modification post-traductionnelle par l'addition du groupe lipidique qui est la prénylation (Moutinho et al., 2017).

La sous-famille des protéines Rho comprend de petites GTPases telles que RhoA, Rac1 et Cdc42 qui jouent un rôle central dans la régulation du cytosquelette d'actine au niveau des épines dendritiques, contrôlant ainsi la plasticité structurale et fonctionnelle des épines (Hedrick et al., 2016), mais aussi la migration des cellules neuronales, la croissance et le guidage des axones, l'arborisation dendritique et la formation des synapses (Moutinho et al., 2017; Song et al., 2018). Ainsi, il a été montré que Rac-1 est impliqué dans le remodelage dendritique des neurones corticaux et hippocampiques à la fois *in vitro* (Hayashi-Takagi et al., 2010; Tashiro, 2000; Tashiro and Yuste, 2004) et *in vivo* (Oh et al., 2010).

Une altération de la synthèse du cholestérol peut affecter la formation des isoprénoïdes et ainsi la prénylation de ces protéines. Par exemple, Ostrovski et al ont montré que l'inhibition pharmacologique de la voie du mévalonate par les statines, qui sont des inhibiteurs de l'HMGCoA réductase, inhibe l'isoprénylation des sGTPases dans le cerveau (Ostrowski et al., 2016). Cette inhibition semble être responsable de la diminution de la croissance des neurites et de la réduction de la densité des épines dendritiques observées dans les neurones de rat ayant eu une dose de statine par voie orale (Kim et al., 2009).

De façon intéressante, une augmentation de la prénylation et de l'activation des sGTPases de la famille Rho et Rab a été observée chez des souris surexprimant CYP46A1 (Moutinho et al., 2016). Cette augmentation induite de la prénylation des sGTPases entraîne une augmentation de la croissance dendritique neuronale et de la densité de protrusion dendritique, et provoque une augmentation des protéines synaptiques dans les fractions synaptosomales brutes (Moutinho et al., 2016). Cela peut souligner l'importance de la voie du mévalonate et de la production d'isoprénoïdes dans le développement et la fonction neuronale.

IV. Implication du métabolisme du cholestérol dans le comportement, la mémoire et l'apprentissage

Compte tenu de ses différents rôles dans le fonctionnement des cellules, il a été suggéré que des modulations des taux de cholestérol pourraient avoir des conséquences sur le fonctionnement cérébral, et sur différents types de comportements. Il est d'ailleurs intéressant de noter que des études en cliniques et précliniques indiquent une corrélation entre les taux de cholestérol plasmatique et des changements de comportement (Pour revue Cartocci et al., 2017). Cependant, puisque le métabolisme du cholestérol cérébral est séparé du reste du corps

(Dietschy, 2009), il reste difficile d'établir un lien direct entre les taux de cholestérol cérébral, le taux de cholestérol plasmatique et les troubles comportementaux. Une manière indirecte d'évaluer l'existence du lien entre le cholestérol cérébral et les troubles comportementaux, consiste à étudier la conséquence de l'administration de statines lipophiles qui traversent la barrière hémato-encéphalique et diminuent ainsi la synthèse du cholestérol dans le cerveau et de regarder les conséquences comportementales (Golomb and Evans, 2008). Une diminution de la synthèse endogène du cholestérol induite par l'administration de statines favorise les performances cognitives chez les rongeurs (Segatto et al., 2014). Dans une étude de Segatto, un traitement chronique à la simvastatine a amélioré la mémoire lors de la tâche d'évitement passif chez le rat (Segatto et al., 2014). Plusieurs études ont montré que les statines facilitent l'apprentissage et la mémoire chez les rongeurs et améliore les performances dans le test d'apprentissage de la piscine de Morris (Li et al., 2006; Lu et al., 2007).

En plus d'un rôle de la synthèse du cholestérol sur les processus mnésiques, une altération du transport du cholestérol pourrait aussi affecter ces processus (Gordon et al., 1995; Oitzl et al., 1997). Ainsi, Gordon et ses collègues ont montré que des souris KO pour le gène *ApoE* présente des déficits de la mémoire (Gordon et al., 1995). L'altération de l'apprentissage spatial et de la mémoire chez ces souris dépourvues de l' *ApoE* pourrait s'expliquer par des modifications synaptiques comme par exemple une réduction de la LTP (Veinbergs et al., 1998). Pour finir, une régulation de la dégradation du cholestérol peut aussi affecter l'apprentissage. Les souris déficiente en CYP46A1 présente des troubles dans l'apprentissage spatial, moteur et associative suite à un test dans la piscine de Morris, ainsi que des perturbations des phénomènes de LTP (Kotti et al., 2006). De plus, l'incubation des coupes hippocampiques des souris CYP46A1 KO avec du mévalonate ou du géranylgéraniol (produit intermédiaire de la voie de mévalonate, participant à la premylation des protéines) rétablit la LTP, alors que l'addition du cholestérol n'a aucun effet (Kotti et al., 2006). De plus, un travail récent a montré que la surexpression du CYP46A1 peut réellement augmenter l'excroissance dendritique ainsi que la densité en épines et provoque une augmentation des protéines synaptiques dans la fraction synaptosomale in vivo et in vitro (Moutinho et al., 2016). Ces modifications morphologiques et moléculaires observées seront responsable de l'amélioration de la fonction cognitive observée in vivo chez la souris transgénique CYP46A1 (Maioli et al., 2013). Tous ces résultats suggèrent une implication du métabolisme du cholestérol dans les processus de mémoire et d'apprentissage.

V. Implication du métabolisme du cholestérol cérébral dans des neuropathologies

Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle du cholestérol dans plusieurs maladies neurodégénératives (tels que la maldie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson) (pour revue (Martin et al., 2014)), dans des maladies hypomyélinisantes (tels que le syndrome de Smith-Lemli-optiz, la maladie de Niemman Pick type C et la maladie de Pelizaeus Merzbacher (pour revue (Saher and Stumpf, 2015)) ou encore dans les troubles du spectre autistique (pour revue (Wang, 2014)) .

1. La maladie d'Alzheimer (MA)

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative multifactorielle progressive qui touche près de 50 millions de personnes dans le monde entier (Alzheimer's-Disease-International, 2015). Pendant des décennies, le dépôt du peptide bêta-amyloïde extracellulaire (Aβ) a été considérée comme une caractéristique pathologique de la maladie (Sadigh-Eteghad et al., 2015). La molécule Aβ provient de la protéolyse de la protéine précurseur d'amyloïde (APP) (Bolduc et al., 2016). Bien qu'une augmentation de l'Aβ cérébrale puisse expliquer une partie de la neurodégénérescence détectée dans le cerveau des patients atteints de la MA, des travaux suggèrent que le métabolisme du cholestérol pourrait aussi être impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Par exemple, la présence de l'allèle ε4 de l'APOE semble être un facteur de risque majeur pour cette maladie, en particulier dans la forme tardive de la MA (Roses, 1996; Tanzi and Bertram, 2005). Il a également été démontré que l'APOE joue un rôle dans la dégradation (Jiang et al., 2008) et la clairance de l'Aβ dans le cerveau (Xiong et al., 2009).

De plus, étant une enzyme essentielle de l'homéostasie du cholestérol du SNC, on devrait s'attendre à ce que la CYP46A1 soit aussi impliquée dans la pathogenèse de l'AD. Plusieurs études ont montré une expression anormale du CYP46A1 dans le tissu cérébral de patients atteints de MA. Par exemple, une induction sélective de cette enzyme autour des plaques neuritiques a été décrite, les cellules neuronales présentent des taux inférieurs de CYP46A1 et son expression peut être détectée dans les astrocytes (Bogdanovic et al., 2001). De plus, le traitement des cellules de neuroblastomes exprimant l'APP humain par le 24OHC est capable de réduire la production de peptide bêta-amyloïde (Aβ) en inhibant le trafic de l'APP (Urano et al., 2013) ce qui suggère qu'une augmentation de la production de cet oxystérol pourrait être bénéfique dans le cadre de la MA. Pour finir, en utilisant une approche virale *in vivo*, plusieurs études ont permis d'élucider le rôle de la CYP46A1 dans la physiopathologie de la MA. En

utilisant des souris APP23 (modèle murin de la MA), Hudry et al ont montré que la surexpression de la CYP46A1 dans le cortex et l'hippocampe de ces souris réduit la pathologie amyloïde, avant et même après l'apparition de la maladie. Les auteurs ont suggéré que le mécanisme sous-jacent de l'effet CYP46A1 ne semble pas être médié par une production plus élevée de 24OHC, mais plutôt par la réduction des niveaux du cholestérol dans les radeaux lipidiques pouvant modifier la protéolyse de l'APP, entraînant une réduction production de l'Aβ (Hudry et al., 2010). Plus récemment, Burlot e al. ont montré que l'injection du vecteur viral CYP46A1 dans l'hippocampe dans des souris THY-Tau22, un autre modèle murin de la MA sans pathologie amyloïde, a pu abolir les déficits cognitifs et l'altération de la LTD (Burlot et al., 2015). Parallèlement, Djelti et al ont indiqué qu'une inhibition du CYP46A1 dans l'hippocampe des souris sauvages via l'injection d'un virus, induit une accumulation de cholestérol, suivie d'une perte neuronale, une atrophie de l'hippocampe et des déficits cognitifs (Djelti et al., 2015). De plus, cette inhibition engendre une accumulation significative de cholestérol dans les cerveaux des souris traitées par rapport au control (Djelti et al., 2015). Tous ces résultats montrent que l'inhibition de la CYP46A1 peut jouer un rôle dans la pathogenèse et progression de la MA et son augmentation pourrait être considérée comme une nouvelle stratégie thérapeutique de la MA.

2. La maladie de Huntington (MH)

La MH est une maladie neurodégénérative autosomale dominante, caractérisée par une déficience motrice, un déclin cognitif, des troubles psychiatriques. L'estimation de vie est de 15–20 ans à partir du début des symptômes. La MH est causée par une expansion anormale du trinucléotide CAG dans l'extrémité 5 'du gène IT15 (chromosome 4p16.3). Cette mutation code pour une expansion de la glutamine dans la protéine huntingtine (HTT) (MacDonald et al., 1993). L'atrophie progressive du striatum (noyau caudé et putamen) en association avec une astrogliose (Vonsattel et al., 1985) sont les caractéristiques neuropathologies de la maladie. Une atrophie corticale sévère associée à une dégénérescence au niveau du striatum a été aussi observée dans les IRM des patients atteints de cette maladie (Aylward, 2007). La HTT est largement exprimé dans tous les tissus, en particulier dans le cerveau et les testicules. Au sein de la cellule, elle s'associe à divers organites et structures jouant un rôle dans les fonctions intracellulaires, y compris le transport de protéines, le transport vésiculaire, l'endocytose, la signalisation postsynaptique, la régulation transcriptionnelle (Gil and Rego, 2008). L'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol cérébrale tels que la *HmgcoA reductase* et la *Dhcr24* était réduite dans le striatum et dans le cortex de souris transgéniques

ainsi que dans des coupes de cortex des patients atteints de la maladie en post mortem (Samara et al., 2014; Valenza, 2005; Valenza et al., 2007).

Dans tous les modèles animaux de cette maladie, une réduction du 24OHC dans le cerveau entier, dans le striatum et dans le cortex a été observée (Valenza et al., 2010). Une altération de la synthèse correspond probablement à une altération parallèle de l'élimination du cholestérol par les neurones métaboliquement actifs (Valenza et al., 2010). Les marqueurs de la synthèse, de l'accumulation et du turnover du cholestérol et de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol ont été réduits proportionnellement à la longueur des répétitions CAG et à la charge de HTT mutant (N homozygote hétérozygote). Chez les souris sauvages, la quantité de cholestérol augmente avec la maturation atteignant un plateau chez les animaux adultes. Dans un modèle murin de MH, la quantité de cholestérol cérébral et de précurseurs était inférieure à celle des animaux de même âge (Valenza et al., 2010). Ces données suggèrent que la HTT pourrait jouer un rôle spécifique dans l'homéostasie du cholestérol et que le HTT mutant altère la synthèse et le turnover du cholestérol dans le cerveau. La synthèse ainsi que la dégradation du cholestérol semble être impliquées dans la MH. Dans une étude en post-portem, une diminution de l'expression de la CYP46A1 était observée dans des coupes de putamen des patients atteint de MH accompagnée par une augmentation du taux du cholestérol et des intermédiaires de la voie du mévalonate dans cette structure (Kreilaus et al., 2016). Dans une étude récente, Boussicault et al. ont montré qu'une diminution de l'expression de cette enzyme dans le striatum de souris sauvage par shRNA produit une dégénérescence des neurones striataux et les déficits moteurs rappelant le phénotype de la maladie de HT (Boussicault et al., 2016). De plus, une injection de virus permettant la surexpression de la CYP461 dans le striatum d'un modèle murin de la MH (souris HT) réduit l'atrophie neuronale ainsi que le nombre et la taille des agrégats de HTT mutant, améliore les déficits moteurs, restaure les taux de cholestérol et de lanostérol et augmente le taux de desmosterol (Boussicault et al., 2016). Ces études suggèrent que la diminution de la CYP pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie et que la restauration de son expression peut constituer une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de cette maladie.

3. L'addiction

Des études chez l'homme, ainsi que des études chez les rongeurs, ont montré un lien entre l'addiction à la cocaïne et le cholestérol. Premièrement, une étude réalisée post-mortem a montré une altération dans l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le cortex des consommateurs de plusieurs drogues tels que la cocaïne, la

phencyclidine et le cannabis (Lehrmann et al., 2006). Ces auteurs ont montré une augmentation de l'expression des gènes *Fdft1*, *Apol2* impliqués respectivement dans la synthèse et le transport du cholestérol dans le cortex frontal antérieur (Lehrmann et al., 2006). De plus, une étude réalisée dans notre laboratoire suggère qu'un lien entre le cholestérol cérébral et l'addiction à la cocaïne pouvait exister dans un modèle animal d'AA de cocaïne puisque l'administration de statines, inhibiteurs de la HMGCoA réductase ,qui traversent la BHE, diminue le risque de rechute à la cocaïne et à la nicotine chez les rats (Chauvet et al., 2016). Plus récemment, Cotto et al. ont montré que des injections répétées de cocaïne chez les souris suivi par 24 heures d'abstinence diminue le taux de protéines de LXR, qui sont impliqués dans la régulation de du métabolisme du cholestérol dans l'hippocampe de ces souris (Cotto et al., 2018).

Des administrations d'alcool semblent également avoir des conséquences sur le métabolisme cérébral du cholestérol. Des études chez des rats P-préférant l'alcool (souches de rats hybridés génétiquement pour leur préférence à l'alcool) montrent que l'exposition chronique à l'éthanol altère l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol cérébrale dans différentes structures du cerveau de rats impliqués dans l'addiction tels que l'ATV (McBride et al., 2013), l'hippocampe ventral (McClintick et al., 2018), le raphé nucleus (McClintick et al., 2015) et la substance grise périaqueducale (Mcclintick et al., 2016) de façon région-spécifique. Parmi les gènes modulés on peut citer l'*Abca1* et la *HmgcoA réductase* et *synthase* dans l'ATV et dans l'hippocampe ventral (McBride et al., 2013; McClintick et al., 2018), la *Srebf2* dans le noyau du raphé (McClintick et al., 2015).

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier l'effet des drogues d'abus sur le métabolisme cérébral du cholestérol. En effet, il a été démontré que la consommation de drogues, qu'elle soit aigüe ou chronique produit des neuroadaptations au sein du système mésocorticolimbique responsable de la persistance du risque de rechute. Parallèlement, le cholestérol joue un rôle crucial dans plusieurs fonctions cérébrales telles que la neurotransmission et les processus de plasticité synaptique, connues pour être impliqués dans l'addiction. L'objectif de ce travail de thèse consistait à élucider l'implication potentielle du métabolisme du cholestérol dans l'addiction et en particulier si ce métabolisme était affecté par les drogues d'abus. Mon travail de thèse est divisé en 3 parties.

Notre premier article, publié dans **« Frontiers in Molecular Neurosciences »**, est intitulé **«Persistent neuroadaptations in the expression of genes involved in cholesterol homeostasis induced by chronic, voluntary alcohol intake in rats »**. Dans cette étude, nous avons évalué les effets de l'exposition chronique à l'alcool sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

Notre deuxième article, intitulé **« Impact of acute and repeated cocaine administrations on the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the rat brain »** est en préparation. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'exposition aiguë et chronique à la cocaïne sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

Une étude complémentaire a été réalisée visant à évaluer de l'effet de l'altération du métabolisme du cholestérol sur la rechute aux drogues était initié. A cet égard, nous avons utilisé une approche virale permettant de surexprimer la CYP46A1, l'enzyme de dégradation du cholestérol cérébral dans le cortex préfrontal pour évaluer l'effet sur la recherche de cocaïne dans un modèle de rechute.

Résultats

Article 1

Article 1: Persistent neuroadaptations in the expression of genes involved in cholesterol homeostasis induced by chronic, voluntary alcohol intake in rats

L'addiction à l'alcool est associée à des neuroadaptations persistantes au niveau des différentes structures cérébrales, supposées être impliquée dans le risque persistant de rechute après une période d'abstinence. Des études récentes ont montré que l'exposition chronique à l'alcool pouvait engendrer des changements au niveau de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de lipides et entre autres le métabolisme du cholestérol cérébral. En général, ces études s'étaient focalisées sur les effets d'un sevrage aigu. Pour notre part, nous étions intéressés par les adaptations durables induites par l'exposition chronique à l'alcool et susceptibles de participer à la rechute. Dans cette étude, nous avons examiné si la consommation volontaire d'alcool dans un protocole de prise intermittente pouvait modifier l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol, après trois semaines d'abstinence. Ce travail a été mené dans des régions du cerveau impliquées dans l'addiction, tels que le CPF, le NAc, le mésencéphale et l'amygdale.

frontiers in Molecular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 13 December 2018
doi: 10.3389/fnmol.2018.00457

Persistent Neuroadaptations in the Expression of Genes Involved in Cholesterol Homeostasis Induced by Chronic, Voluntary Alcohol Intake in Rats

Josette Alsebaaly[1,2], Emilie Dugast[1,3], Laure Favot[4], Lydia Rabbaa Khabbaz[2], Marcello Solinas[1]† and Nathalie Thiriet[1]*†*

[1]Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Université de Poitiers, INSERM, U-1084, Poitiers, France, [2]Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacie Clinique et Contrôle de Qualité des Médicaments (LPCQM), Faculty of Pharmacy, PTS, University of Saint-Joseph of Beirut, Beirut, Lebanon, [3]CHU de Poitiers, Poitiers, France, [4]Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), EA4331, University of Poitiers, Poitiers, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Ildikó Rácz,
Universitätsklinikum Bonn, Germany

Reviewed by:
Fabio Marti,
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France
Xiaolu Zhang,
Northern Jiangsu People's Hospital, China

***Correspondence:**
Marcello Solinas
marcello.solinas@univ-poitiers.fr
Nathalie Thiriet
nathalie.thiriet@univ-poitiers.fr

†These authors have contributed equally to this work

Received: 20 August 2018
Accepted: 27 November 2018
Published: 13 December 2018

Citation:
Alsebaaly J, Dugast E, Favot L, Rabbaa Khabbaz L, Solinas M and Thiriet N (2018) Persistent Neuroadaptations in the Expression of Genes Involved in Cholesterol Homeostasis Induced by Chronic, Voluntary Alcohol Intake in Rats. Front. Mol. Neurosci. 11:457. doi: 10.3389/fnmol.2018.00457

Alcohol use disorder (AUD) is associated with persistent adaptations in the brain that are believed to participate in the long-lasting vulnerability to relapse after abstinence. Cholesterol, the major sterol compound found in the central nervous system (CNS), plays a major role in maintenance of neuronal morphology, synaptogenesis and synaptic communication and may be involved in alcohol-induced neuroadaptations. In this study, we investigated whether alcohol consumption in a two-bottle choice paradigm followed by 3 weeks of abstinence could alter the expression of genes encoding proteins involved in cholesterol homeostasis in brain regions involved in addiction and relapse, namely the prefrontal cortex (PFC), the nucleus accumbens (NAc), the mesencephalon and the amygdala. We found that voluntary alcohol intake followed by 3 weeks of forced abstinence produces changes in the transcription of several genes encoding proteins directly involved in cholesterol synthesis such as 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1) and farnesyl diphosphate synthase (FDPS) and in its regulation such as sterol regulatory element-binding factor-2 (SREBF2), in cholesterol transport such as ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1) and in cholesterol degradation such as CYP46A1. Interestingly, these changes appeared to be region-specific and suggest that previous chronic exposure to alcohol might durably increase cholesterol metabolism in the PFC, the NAc and the mesencephalon and decrease cholesterol metabolism in the amygdala. Altogether, these results suggest that alcohol consumption leads to durable deregulations in cholesterol metabolism in key areas involved in loss of control over drug use and addiction. These long-term neuroadaptations may participate in the changes in brain structure and functioning that are responsible for the long-lasting risks of relapse to alcohol.

Keywords: alcohol, addiction, cholesterol metabolism, gene expression, neuroadaptations

INTRODUCTION

Alcohol use disorder (AUD) is a chronic relapsing brain disease that represents an important health problem and a big economic cost for our societies (Moss, 2013). AUD is characterized by episodes of intoxication, use of alcohol despite negatives consequences, compulsion to seek and consume alcohol and negative emotional states when alcohol use is stopped (Gilpin and Koob, 2008). As other drugs of abuse, alcohol produces its rewarding effects by stimulating the dopaminergic neurons of the mesocorticolimbic pathway that originates in the ventral tegmental area and projects to the nucleus accumbens (NAc), the prefrontal cortex (PFC) and the amygdala (Gessa et al., 1985; Di Chiara and Imperato, 1988). Alcohol by acting on ionotropic receptors physiologically targeted by glutamate, GABA, acetylcholine and serotonin, increases the activity of dopaminergic neurons leading to increases in dopamine levels in targeted areas (Spanagel, 2009).

Chronic exposure to alcohol produces short-term, as well as long-term neuroadaptations in the brain that could participate to AUD (Most et al., 2014). Acute withdrawal from alcohol produce many molecular, functional and behavioral alterations that result in well-defined withdrawal symptoms (i.e., tremors, risks of delirium tremens and seizures), these effects are usually short lasting (1–3 days) and disappear over time (Heilig et al., 2010). At the molecular level, acute withdrawal from chronic exposure to alcohol has been shown to potentiate glutamatergic neurotransmission by increasing the expression of NMDA receptors (NMDARs). In fact, post-mortem studies have described increased expression of the NMDA type 2B subunit in the PFC and hippocampus of human alcoholics (Zhou et al., 2011; Warden and Mayfield, 2017). These observations have also been described in animal models (for review see Roberto and Varodayan, 2017). In addition, adaptations in GABAergic neurotransmission in a region-specific manner have been described (for review see Roberto and Varodayan, 2017). Other adaptations have been shown to take place after protracted abstinence from alcohol (>3 weeks), when physical symptoms of withdrawal have disappeared and other symptoms such as elevated anxiety and dysphoria appear (Heilig et al., 2010). These molecular long-term adaptations appear to reduce the activity of the dopaminergic system which could be responsible for the negative affect symptoms associated with abstinence from alcohol and ultimately for the persistent risks of relapse to alcohol consumption (Melis et al., 2005; Volkow et al., 2007).

Recent evidence indicates that in the brain, lipids in general and sterols in particular, could play a role in neuronal adaptations. Cholesterol is the major sterol found in the central nervous system (CNS; Martin et al., 2014) and its homeostasis depends on local synthesis and turnover since it does not cross the brain blood barrier (Saeed et al., 2014). Cholesterol is mainly present in the myelin sheath formed by oligodendrocytes to insulate neurons (Dietschy and Turley, 2004; Saher and Stumpf, 2015); however neurons and other glial cells also contain large amounts of cholesterol (Martin et al., 2014). In the adult brain, cholesterol is produced in astrocytes by a multistep process called the mevalonate pathway, in which the rate limiting step is the activity of the hydroxymethylglutaryl-CoA (HMGCoA) reductase (Rozman and Monostory, 2010). Cholesterol is then exported from astrocytes after binding to lipoproteins (mainly the apolipoprotein E, called APOE; Mahley, 2016) and passage through membrane transporters, such as ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1; Dietschy and Turley, 2004; Chen et al., 2013; Lecis and Segatto, 2014). Cholesterol is imported in neurons by binding to low density lipoprotein receptor (LDLr) and LDL-receptor like protein (Beffert et al., 2004). Cholesterol in excess is then degraded by the enzyme 24S-cholesterol hydroxylase also named CYP46A1, which is mostly expressed in neurons (Russell et al., 2009). Several sterol compounds (oxysterols, isoprenoids, neurosteroids, etc.) produced by the mevalonate pathway are known to have also their own activity in the brain (Reddy, 2010; Sun et al., 2016b; Moutinho et al., 2017). At the cellular level, cholesterol content plays a role in maintaining neuronal membrane integrity and in determining membrane permeability and fluidity (Korade and Kenworthy, 2008; Egawa et al., 2016). In addition, cholesterol has been shown to be involved in synaptogenesis, maintenance of neuronal morphology and synaptic communication (Petrov et al., 2016). Importantly, recent studies suggest that cholesterol plays a role in synaptic plasticity (Egawa et al., 2016). For example, induction of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus produces a redistribution of intracellular cholesterol, activation of cdc42 protein which finally results in potentiation of AMPA currents (Brachet et al., 2015). In addition, cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity and impairs NMDAR-mediated signaling and LTP (Koudinov and Koudinova, 2001; Frank et al., 2008; Korinek et al., 2015). Interestingly, synaptic plasticity processes such as LTP have been proposed to participate in addiction (Lüscher and Malenka, 2011) and therefore, changes in the cholesterol metabolism may results in altered synaptic plasticity and participate in addiction processes.

Accumulating evidences suggest that brain cholesterol homeostasis could play a role in drug addiction. First of all, a transcriptomic post-mortem study in humans found that genes involved in the synthesis and trafficking of cholesterol are overexpressed in the cortex of individuals with a history of cocaine, cannabis and phencyclidine abuse (Lehrmann et al., 2006). Second, in animal models, studying the transcriptional changes induced by alcohol exposure, McClintick et al. (2016) found that the expression of genes implicated in the cholesterol synthesis, such as HMGCoA reductase and HMGCoA synthase, is altered by exposure to alcohol in the periaqueductal gray. Finally, indirect evidence for the role of cholesterol in addiction comes from a study showing that chronic treatment with brain-penetrating statins, which are inhibitors of the HMGCoA reductase enzyme (Law and Rudnicka, 2006; Fracassi et al., 2017), reduces drug seeking for cocaine and nicotine without affecting food-seeking behavior in a rodent model of addiction (Chauvet et al., 2016). Altogether, these evidences suggest that altered cholesterol homeostasis may be a mechanism involved in addiction to drugs including alcohol.

The aim of our study was to investigate neuroadaptations in cholesterol homeostasis induced by alcohol consumption that persist after discontinuation of voluntary exposure to alcohol. We used intermittent exposure to alcohol in a two-bottle choice procedure followed by 3 weeks of abstinence. We chose this time point because it corresponds to period of protracted abstinence in rodents, a time when physical symptoms of withdrawal have disappeared (Heilig et al., 2010). These neuroadaptations are believed to be related to high risks of relapse to alcohol and to the phenomenon of incubation of craving (Pickens et al., 2011) that has been described for several drugs including alcohol (Bienkowski et al., 2004). To screen for changes in the expression of many of genes encoding proteins involved in the brain cholesterol metabolism in several brain areas, we chose to measure the mRNA levels of candidate genes by real time PCR (RT-PCR). We focused our investigation on the PFC, the NAc, the amygdala and the mesencephalon, which are known to play a major role in alcohol addiction (Volkow et al., 2016; Cooper et al., 2017). We investigated the expression of genes encoding enzymes of the mevalonate pathway [HMGCoA synthase, HMGCoA reductase, farnesyl diphosphate synthase (FDPS), farnesyl diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1) and 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24)], protein involved in transport of cholesterol (APOE, LDLr and ABCA1), the enzyme CYP46A1, responsible for the degradation of cholesterol, as well as proteins implicated in the regulation of cholesterol synthesis [sterol regulatory element-binding factor-2 (SREBF2), Liver X receptor type Beta (LXR beta)].

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twenty-four adult male Long-Evans rats weighing 300 g at the beginning of the experiment (Janvier Labs, France) were used in this study. After habituation to the animal facility, they were individually housed in a controlled environment under a 12-h light/dark cycle (lights on at 8 a.m.) with food available *ad libitum*. All experiments were conducted during the light phase and in accordance with the European Union directives (2010/63/EU) for the care of laboratory animals and approved by the local ethics committee (COMETHEA).

Intermittent Exposure to Alcohol

Ethanol 96% (Cooper, France) was diluted with tap water to obtain a final concentration of 20% (v/v). Fluids were presented in glass bottles with stainless-steel drinking spouts inserted through two grommets in front of their home cage, according to a protocol similar to that used by Simms et al. (2008). Every second days, "alcohol" rats (n = 14) had the access for 24 h to two bottles, one containing the 20% ethanol solution or one containing tap water, allowing voluntary alcohol intake. During each exposure, the position of the ethanol bottle was changed to avoid side preferences. More precisely, on Mondays, Wednesdays and Fridays (10 a.m.), rats were given access to the two bottles, and the day after (10 a.m.), the two bottles were weighed and the bottle containing ethanol was replaced by a bottle containing water. Control rats (n = 10) had continuous access only to two bottles of water. We weighted the bottles and we measured alcohol intake (= g of pure ethanol/kg bodyweight/24 h), the preference for alcohol (= percentage of ethanol consumed over total fluid intake), to compare the volume of alcohol solution and water consumed, and the volume of fluid intake on "alcohol" and "water" days. The alternate exposure to alcohol lasted for 47 days, leading to 21 sessions of intermittent exposure. Animals were then exposed to two bottles of water for a 3-week abstinence period.

Tissue Collection

Three weeks after the last exposure to ethanol, rats were anesthetized with pentobarbital (120 mg/kg, Dolethal® Vetoquinol France), decapitated and brains were removed, and dissected using a rat matrix (WPI, London). Brain structures, namely the PFC, the NAc, the mesencephalon and the amygdala, were isolated by blunt dissection and stored at −80°C until used.

RNA Isolation and Reverse Transcription

Total RNA was isolated using TRIzol Reagent and chloroform and then purified using Macherey Nagel kit (Macherey Nagel, France). The RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the RNA integrity was evaluated by the Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent 2100 Bioanalyzer). All RNAs had a RIN (RNA integrity number) above eight.

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

Equal amounts of RNA input (1 μg) were reverse-transcripted using Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Dutscher, France). Real time qPCR was performed using the LightCycler480 detection system (Roche, France). Reaction mix was exposed to the amplification program consisting in one cycle (95°C for 5 min), followed by 45 cycles, including three phases (phase 1: 95°C for 20 s; phase 2: 64°C for 15 s for all primers (except for hrpt1 = 60°C); phase 3: 72°C for 20 s).

The sequences of primers used (**Supplementary Table S1**) were either designed using Primer-BLAST software[1], or found in previous publications. Results were normalized to three housekeeping genes (*gapdh, β-actin* and *hrpt1*) and reported as RNA fold changes according to the ΔΔCT method ($2^{\Delta\Delta CT} = 2^{\Delta CT \text{ sample} - \text{mean } \Delta CT \text{ "control animal"}}$).

Statistical Analysis

Behavioral data were analyzed using one-way or two-way ANOVA for repeated measures followed by Newman–Keuls *post hoc*. For RT-PCR, we used a Student t-test to compare ethanol-exposed rats (n = 14) and control rats (n = 10). The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$.

[1]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

RESULTS

Rats Show Escalation of Alcohol Intake and Preference Over Time

In a two-bottle-choice procedure, intermittent-access to the 20% ethanol solution resulted in a steady increase in ethanol consumption (n = 14; **Figure 1**). Ethanol intake was 7 g/kg/24 h at the beginning and over time it reached a mean of 9 g/kg/24 h at the end of the study (**Figure 1A**). Statistical analysis revealed a significant effect of sessions for ethanol intake ($F_{(13,20)}$ = 9.99, $p < 0.0001$). The preference for the bottle containing alcohol was aproximately 45% at the beginning and it reached 70% at the end of the study (**Figure 1B**). Statistical analysis revealed a significant effect of sessions for alcohol preference ($F_{(13,20)}$ = 6.56, $p < 0.0001$). On the first day of exposure to alcohol, rats drank a mean of 12.5 ml/24 h of alcohol and a mean of 16 ml/24 h of water (**Figure 1C**). At the end of the study, rats drank a mean of 19 ml/24 h of alcohol and a mean of 11 ml/24 h of water (**Figure 1C**). Statistical analysis revealed a significant effect of sessions ($F_{(13,20)}$ = 16.90, $p < 0.0001$), of alcohol ($F_{(1,13)}$ = 26.54, $p < 0.0001$) and a significant sessions × alcohol interaction ($F_{(13,20)}$ = 8.00, $p < 0.0001$). Fluid consumption (ml/24 h) of rats exposed to the two-bottle choice on alcohol and water days was similar and remained stable throughout the experiment (around 27 ml/24 h; data not shown).

Intermittent Alcohol Intake Induces Persistent Modifications in the Expression of Genes Involved in the Metabolism of Cholesterol in the PFC

In the PFC (**Figure 2**), alcohol intake followed by 3 weeks of abstinence produced an increase in the expression of the gene encoding HMGCoA reductase, the rate limiting enzyme of cholesterol synthesis (+30%, $p < 0.001$) and a decrease in the expression of the gene encoding the enzyme FDPS, involved in the intermediate steps of cholesterol synthesis (−17%, $p < 0.05$) in rats exposed to alcohol (n = 14) compared to control group (n = 10). Alcohol consumption also produced a decrease in the expression of ABCA1 transporter, responsible for cholesterol export from cells (−20%, $p < 0.05$). In addition, alcohol intake produced a decrease in the expression of the enzyme CYP46A1, which degrades cholesterol (−15%, $p < 0.05$). All the other genes studied were not affected by exposure to alcohol.

Intermittent Alcohol Intake Induces Persistent Modification in Genes Involved in the Metabolism of Cholesterol in the NAc

In the NAc (**Figure 3**), alcohol intake followed by 3 weeks of abstinence produced an increase in the expression of the genes encoding FDPS and FDFT1, involved in the intermediate steps of cholesterol synthesis (+20%, $p < 0.01$ for FDPS and +20%, $p < 0.01$ for FDFT1) in rats exposed to alcohol (n = 14) compared to control group (n = 10). It also produced an increase in the expression of the gene encoding ABCA1 (+70%, $p < 0.001$).

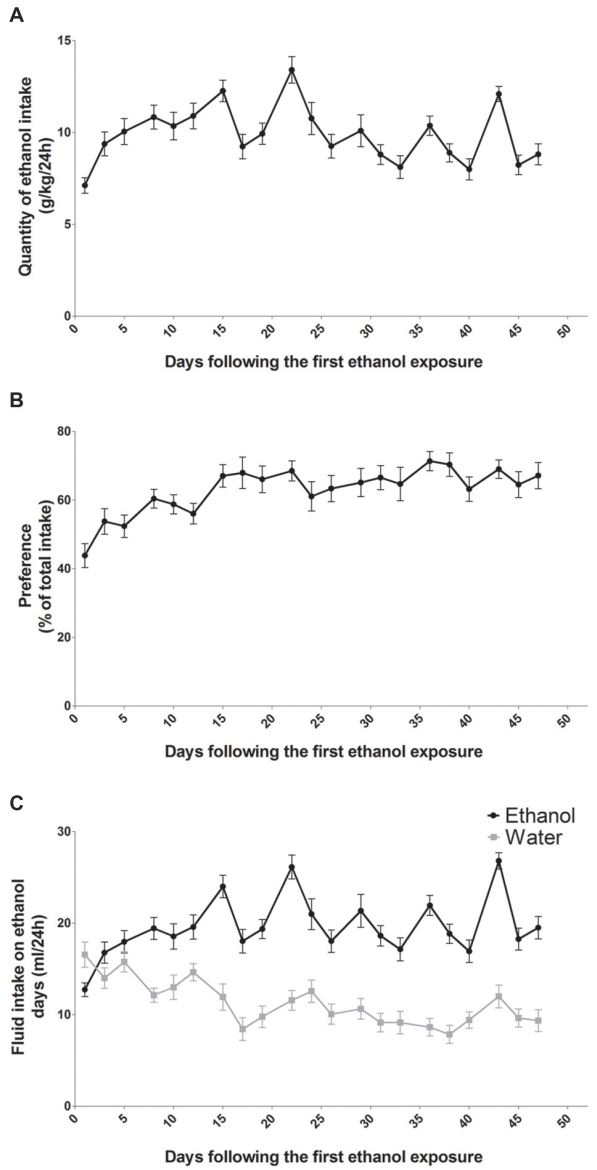


FIGURE 1 | Alcohol intake and preference in rats exposed to an intermittent-access to ethanol. Ethanol intake **(A)** and preference for ethanol over water **(B)** in rat exposed to two bottle one containing water and one containing ethanol 20% (n = 14). Volumes of ethanol (black curve) and water (gray curve) consumed on alcohol days **(C)**.

In addition, alcohol consumption produced a decrease in the expression of the gene encoding SREBF2 (−12%, $p < 0.05$). All the other genes studied were not affected by exposure to alcohol.

Intermittent Alcohol Intake Induces Persistent Modification in Genes Involved in the Metabolism of Cholesterol in the Mesencephalon

In the mesencephalon (**Figure 4**), alcohol intake followed by 3 weeks of abstinence caused an increase in the expression of the genes encoding FDPS and FDFT1, that are both involved

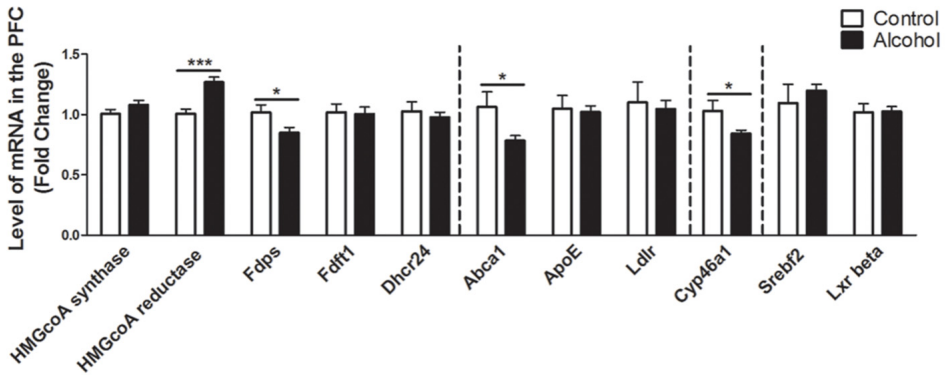


FIGURE 2 | Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the PFC after exposure to alcohol. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to a two-bottle choice paradigm and water controls. Values represent the means ± SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to control animals (n = 10) and black bars correspond to ethanol animals (n = 14). Student t-test, $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$ different from control group. Abbreviations: Amy, amygdala; PFC, prefrontal cortex; HMGcoA, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A; Fdps, farnesyl diphosphate synthase; Fdft1, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; Dhcr24, 24-dehydrocholesterol reductase; Abca1, ATP-binding cassette A1; ApoE, apolipoprotein E; Ldlr, low density lipoprotein receptor; Cyp46a1, 24S cholesterol hydroxylase; Srebf2, sterol-regulatory element-binding factor; Lxr beta, liver X receptor type beta.

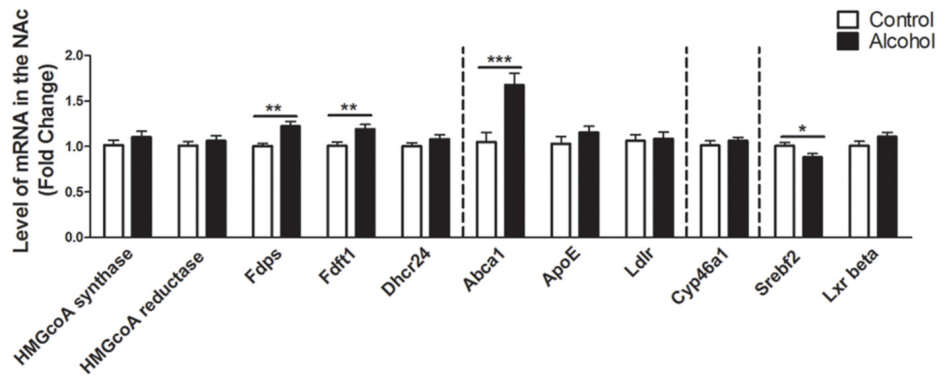


FIGURE 3 | Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the NAc after exposure to alcohol. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to a two-bottle choice paradigm and water controls. Values represent the means ± SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to control animals (n = 10) and black bars correspond to ethanol animals (n = 14). Student t-test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ different from control group. Abbreviations: NAc, nucleus accumbens; HMGcoA, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A; Fdps, farnesyl diphosphate synthase; Fdft1, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; Dhcr24, 24-dehydrocholesterol reductase; Abca1, ATP-binding cassette A1; ApoE, apolipoprotein E; Ldlr, low density lipoprotein receptor; Cyp46a1, 24S cholesterol hydroxylase; Srebf2, sterol-regulatory element-binding factor; Lxr beta, liver X receptor type beta.

in the cholesterol synthesis (+25%, $p < 0.001$ for FDPS and +15%, $p < 0.05$ for FDFT1) in rats exposed to alcohol (n = 14) compared to control group (n = 10). In addition, alcohol consumption produced a decrease in the expression of SREBF2 (−20%, $p < 0.05$). Alcohol intake also decreased the expression of CYP46A1 (−20%, $p < 0.01$). All the other genes studied were not affected by exposure to alcohol.

Intermittent Alcohol Intake Induces Persistent Modification in Genes Involved in the Metabolism of Cholesterol in the Amygdala

In the amygdala (**Figure 5**), alcohol intake followed by 3 weeks of abstinence produced a decrease in the expression of the genes encoding HMGCoA synthase and FDPS (−10%, $p < 0.05$ for HMGCoA synthase and −15%, $p < 0.05$ for FDPS) in rats exposed to alcohol (n = 14) when compared to control rats (n = 10). All the other genes studied were not affected by exposure to alcohol.

DISCUSSION

In this study, we investigated the long-term changes in the expression of genes involved in cerebral cholesterol homeostasis induced by chronic alcohol exposure followed by a period of protracted abstinence. These changes might participate in the increased craving that appear during abstinence and in the consequent relapse to alcohol (Bienkowski et al., 2004;

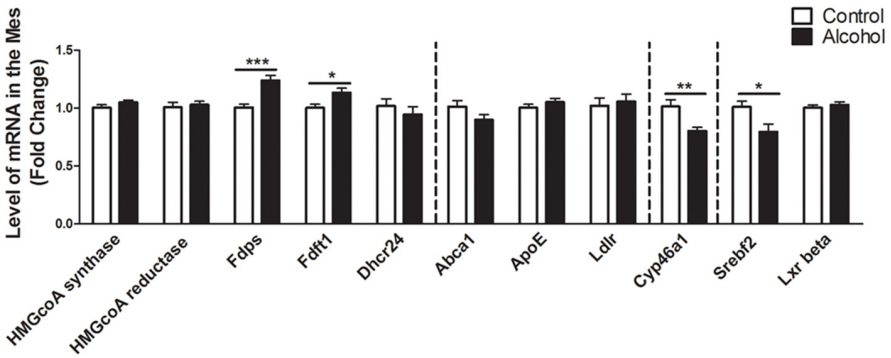


FIGURE 4 | Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the mesencephalon after exposure to alcohol. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to a two-bottle choice paradigm and water controls. Values represent the means ± SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to control animals (n = 10) and black bars correspond to ethanol animals (n = 14). Student t-test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ different from control group. Abbreviations: Mes, mesencephalon; HMGcoA, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A; Fdps, farnesyl diphosphate synthase; Fdft1, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; Dhcr24, 24-dehydrocholesterol reductase; Abca1, ATP-binding cassette A1; ApoE, apolipoprotein E; Ldlr, low density lipoprotein receptor; Cyp46a1, 24S cholesterol hydroxylase; Srebf2, sterol-regulatory element-binding factor; Lxr beta, liver X receptor type beta.

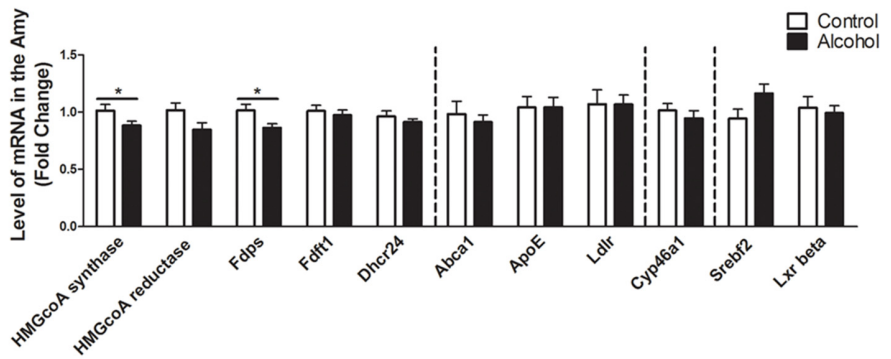


FIGURE 5 | Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the amygdala after exposure to alcohol. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to a two-bottle choice paradigm and water controls. Values represent the means ± SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to control animals (n = 10) and black bars correspond to ethanol animals (n = 14). Student t-test, $^{*}p < 0.05$ different from control group. Abbreviations: Amy, amygdala; HMGcoA, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A; Fdps, farnesyl diphosphate synthase; Fdft1, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; Dhcr24, 24-dehydrocholesterol reductase; Abca1, ATP-binding cassette A1; ApoE, apolipoprotein E; Ldlr, low density lipoprotein receptor; Cyp46a1, 24S cholesterol hydroxylase; Srebf2, sterol-regulatory element-binding factor; Lxr beta, liver X receptor type beta.

Pickens et al., 2011). For this, we allowed rats to drink alcohol intermittently for 47 days and, after a period of 3 weeks of forced abstinence, we measured the expression of genes encoding proteins involved in cholesterol metabolism in several brain areas involved in addiction processes. We found persistent modifications in the expression of several genes encoding proteins involved in the synthesis, transport and degradation of cholesterol in a region-specific manner. These changes might participate in the long-term adaptations associated with alcohol addiction and responsible for the high risks of relapse to this drug.

In the PFC, after 3 weeks of discontinuation of chronic intake of alcohol, we observed an increase in the expression of HMGCoA reductase, the rate limiting enzyme in the mevalonate pathway. In the NAc and the mesencephalon, the FDPS or FDFT1 enzymes, that act downstream in this pathway also showed increased expression levels. These results suggest that exposure to alcohol followed by 3 weeks of abstinence could result in increases in the production of cholesterol in these brain regions. In the NAc and the mesencephalon, we also found that alcohol exposure decreases the expression of SREBF2, a regulator of the transcription of genes encoding proteins of the mevalonate pathway. This effect could be a consequence of the increased levels of cholesterol triggered by the higher expression of enzymes responsible for its synthesis in these brain areas (Horton et al., 2003; Adams et al., 2004). Finally, in the PFC and the mesencephalon, we also observed a decrease in the expression of CYP46A1, the main enzyme involved in brain cholesterol catabolism, which could also lead to accumulation of cholesterol in these brain regions. Conversely in the amygdala, we mainly found a decreased expression of the enzyme HMGCoA synthase and FDPS involved in cholesterol synthesis, which suggests that alcohol exposure followed by 3 weeks of abstinence could lead to long-lasting decreases in cholesterol levels in this

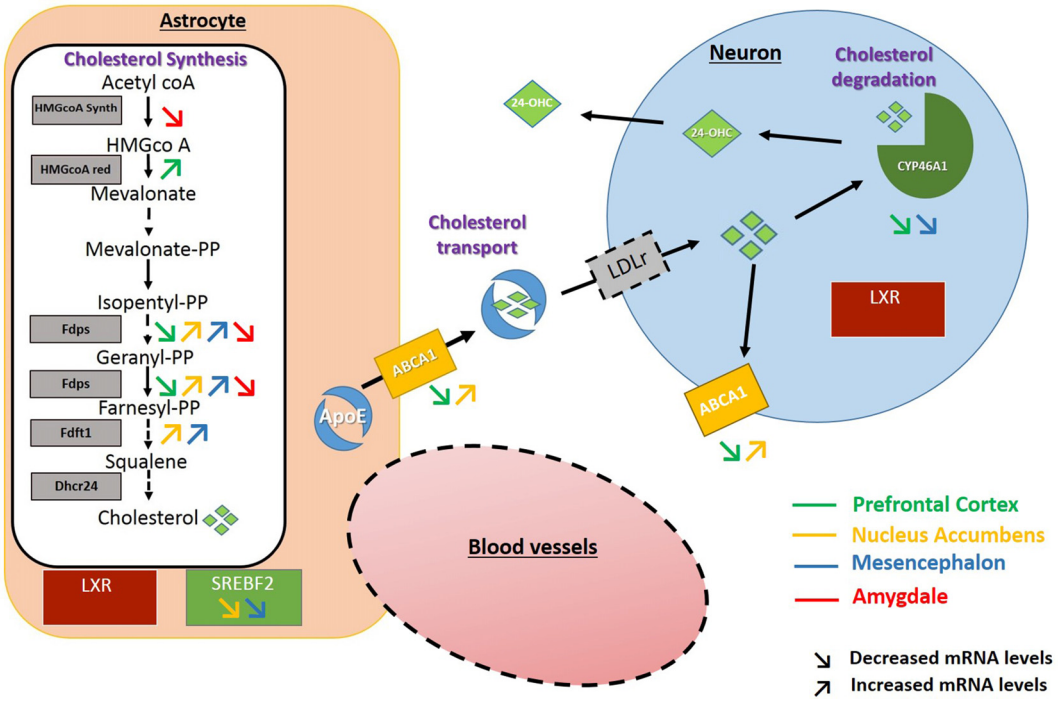


FIGURE 6 | Schematic representation of the changes found in the expression of genes encoding proteins of the cholesterol metabolism. Increased and decreased expressions are represented by up and down arrows in the PFC (green arrows), NAc (yellow arrows), Mesencephalon (blue arrows), Amygdala (red arrows).

brain area. All the changes observed have been summarized in **Figure 6**.

Exposure to alcohol has been shown to lead to a great number of neuroadaptations. Some of these changes appear rapidly after the interruption of the alcohol intake and disappear within a few days (for review see Heilig et al., 2010; Roberto and Varodayan, 2017). Other adaptations could persist long after discontinuation of alcohol intake (Heilig et al., 2010) and be responsible for the incubation of craving that has been described after abstinence from alcohol consumption (Bienkowski et al., 2004; Pickens et al., 2011). Our study mainly focused on these changes because they are thought to play a critical role in relapse to alcohol use (Gilpin and Koob, 2008; Spanagel, 2009). Changes in the cerebral metabolism of cholesterol could participate in these neuroadaptations. For example, cholesterol could affect synaptic communication at the presynaptic level by modulating neurotransmitter uptake or release and also at the post-synaptic level by acting on the quantity of receptors expressed at the membrane. Concerning dopamine neurotransmission, using super-resolution microscopy, it has been shown that the dopaminergic transporter (DAT) may be sequestrated in cholesterol-dependent nanodomains in the membrane of presynaptic neurons and that cholesterol depletion reduces localization of the DAT in these nanodomains (Rahbek-Clemmensen et al., 2017). Other evidences suggest that cholesterol dysregulation may alter the DAT functioning (Jones et al., 2012; Luessen and Chen, 2016; Zeppelin et al., 2018). Thus, it is possible that if cholesterol homeostasis is dysregulated, the functioning of the dopamine system and eventually the response to future exposure to drugs may be changed, which may in turn increase the risks of addiction. Indeed, the activity of the dopaminergic neurotransmission was shown to be decreased after acute withdrawal (Carroll et al., 2006; Czoty, 2015; Karkhanis et al., 2015) and increased after protracted abstinence from alcohol (Hirth et al., 2016). Interestingly, changes in cholesterol content that might result from the changes we observed could participate in these effects observed after alcohol withdrawal. In addition, cholesterol homeostasis can participate in addiction processes by altering synaptic plasticity. For example, in culture of hippocampal neurons, cholesterol depletion by use of inhibitors of the HMGCoA reductase has been shown to impair synaptic vesicles exocytosis (Linetti et al., 2010) and, in cortical synaptosomes, cholesterol removal from the plasma membrane increases spontaneous glutamate release and reduced the evoked release (Teixeira et al., 2012). Also, in the hippocampus, activation of post-synaptic NMDARs during LTP is associated with a reduction in intracellular cholesterol content in neurons, which seems to facilitate the redistribution of AMPA receptor to the membrane (Brachet et al., 2015) and dietary cholesterol has been shown to affect synaptic plasticity (Wang and Zheng, 2015). Finally, endogenous 24S-hydroxycholesterol, the main metabolite of cholesterol in the brain, has been shown to modulate NMDAR-mediated function (Sun et al., 2016a). Altogether, these studies indicate that cholesterol may play a role in modulating neurotransmission and that changes in cholesterol metabolism induced by alcohol exposure followed by a 3-week period of abstinence reported in our study may participate in such neuroadaptations and in the long-term effects of alcohol

that drive the addiction cycle (Koob and Le Moal, 2001; Sommer and Spanagel, 2013).

A few studies investigated the effects of alcohol exposure, followed or not by a withdrawal periods, on the expression of genes involved in cholesterol metabolism both in humans post-mortem tissues (Lewohl et al., 2000; Mayfield et al., 2002; Flatscher-Bader et al., 2008, 2010) and in animal models (for example see McBride et al., 2013; McClintick et al., 2016). Some of these studies targeted the same brain areas we investigated, namely the NAc (Bell et al., 2009), the ventral tegmental area (McBride et al., 2013), the amygdala (McBride et al., 2014) or the PFC (McClintick et al., 2018), and some have focused on other structures such as the dorsal raphe nucleus (McClintick et al., 2015) or the periaqueductal gray (McClintick et al., 2016). These studies mostly used large-scale transcriptomic analysis and some of them, but not all, also found that cerebral cholesterol metabolism is affected by alcohol consumption. Interestingly, some of the alterations reported in these studies are similar to the ones found in our study. For example, McBride et al. (2013) observed a decreased expression of SREBF1 in the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats following repeated excessive binge-like alcohol drinking followed by protracted abstinence, an effect similar to what we observed in the mesencephalon for SREBF2. In the periaqueductal gray, binge-like alcohol consumption produced a rapid decrease in the expression of the HMGCoA reductase and synthase, FDFT1 and FDPS (McClintick et al., 2016). These results (even if they were obtained after acute withdrawal from alcohol) are similar to those we found in the amygdala. Interestingly, these two structures both control emotional processes like fear and anxiety and interact strongly with each other (Graeff et al., 1993; Johansen et al., 2010). It is to note that, the expression of the HMGCoA reductase and SREBF2 genes were also decreased in the ventral hippocampus, also involved in anxiety-like behavior, of adolescent rat exposed to alcohol and sacrificed rapidly at the end of the exposure to alcohol (McClintick et al., 2018). It could be speculated that the transcriptional changes we observed, if they are translated in protein changes and modulation of cholesterol levels, can contribute to functional plasticity and, consequently, to the long-term increase in anxiety-like behavior following chronic ethanol exposure (Läck et al., 2005; Gilpin et al., 2015).

It is to note that some discrepancies also exist between our results and those previously reported. The differences between these studies and ours could be due to several methodological differences such as animal species used (mice vs. rats), the genetic background of rats used (selected alcohol-preferring vs. Long-Evans), the type of alcohol exposure (administered by the experimenter, forced or voluntary intake), the age of the rats (adolescence vs. adulthood), the sensitivity of the approach used to evaluate the gene expression (qPCR vs. large-scale analysis) and also the time of abstinence (from no abstinence to short-term and long-term abstinence). In fact, acute withdrawal from alcohol has been shown to produce behavioral and neurobiological effects that are the consequence of homeostatic adaptation associated with chronic exposure to alcohol (Koob and Le Moal, 2001; Sommer and Spanagel, 2013). On the other hand, the behavioral effects and most of the neurobiological effects disappear within a few days whereas some may persist and other may develop over time (Heilig et al., 2010). Interestingly, exposure to alcohol was reported to produce little changes in gene expression in the NAc in animal sacrificed immediately after the end of ethanol exposure (Morud et al., 2017), when changes have been described after protracted abstinence (Hirth et al., 2016). Importantly, brain cholesterol homeostasis is a very tightly regulated phenomenon and several redundant mechanisms exist to maintain cholesterol levels within the appropriated physiological range. Therefore, it is possible that the brain could find several different strategies to react to changes in cholesterol levels associated with drug and alcohol use and that, conversely, changes in different proteins involved in cholesterol homeostasis could ultimately produce similar changes in cholesterol levels.

It is important to notice that this is an exploratory study aiming at looking for evidence that alcohol may produce neuroadaptations in cholesterol homeostasis in regions involved in addiction processes. For this, we chose to focus on changes in gene expression as measured by RT-PCR techniques, which allows screening a large number of genes in several brain areas. On the other hand, this study does not provide direct information concerning the levels of proteins that are encoded by those genes and the levels of cholesterol, its precursors and its metabolites. Future studies are needed to determine the exact changes produced by chronic voluntary alcohol exposure and their functional consequences. Notwithstanding these limitations our study clearly show that the cholesterol system reacts to chronic administration of alcohol and that neurobiological traces of alcohol exposure could be found in this system even after several weeks of discontinuation of alcohol intake, a period when craving for alcohol and risks of relapse are high (Bienkowski et al., 2004; Pickens et al., 2011).

CONCLUSION

In conclusion, in this explorative study, we show that voluntary intake of alcohol followed by protracted abstinence produces long-lasting changes in the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in brain regions involved in addiction. Although further investigation is needed to determine the functional consequences of these alterations our results suggest that cholesterol homeostasis may be involved in development and maintenance of addiction to alcohol.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS and NT designed the general experiments, analyzed the data and wrote the article with contribution by JA. JA and ED conducted the experiments. All authors contributed to the critical revision of the data and of the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was funded by a grant from the "Fondation pour la Recherche en Alcoologie" (France) to NT. JA was recipient

of a PhD fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique du Liban (CNRS-L).

ACKNOWLEDGMENTS

This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers). We thank Pauline Belujon for comments on the manuscript.

REFERENCES

Adams, C. M., Reitz, J., De Brabander, J. K., Feramisco, J. D., Li, L., Brown, M. S., et al. (2004). Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* 279, 52772–52780. doi: 10.1074/jbc.m410302200

Beffert, U., Stolt, P. C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J. Lipid Res.* 45, 403–409. doi: 10.1194/jlr.r300017-jlr200

Bell, R. L., Kimpel, M. W., McClintick, J. N., Strother, W. N., Carr, L. G., Liang, T., et al. (2009). Gene expression changes in the nucleus accumbens of alcohol-preferring rats following chronic ethanol consumption. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 131–147. doi: 10.1016/j.pbb.2009.07.019

Bienkowski, P., Rogowski, A., Korkosz, A., Mierzejewski, P., Radwanska, K., Kaczmarek, L., et al. (2004). Time-dependent changes in alcohol-seeking behaviour during abstinence. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14, 355–360. doi: 10.1016/j.euroneuro.2003.10.005

Brachet, A., Norwood, S., Brouwers, J. F., Palomer, E., Helms, J. B., Dotti, C. G., et al. (2015). LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J. Cell Biol.* 208, 791–806. doi: 10.1083/jcb.201407122

Carroll, M. R., Rodd, Z. A., Murphy, J. M., and Simon, J. R. (2006). Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats. *Alcohol* 40, 103–109. doi: 10.1016/j.alcohol.2006.10.003

Chauvet, C., Nicolas, C., Lafay-Chebassier, C., Jaber, M., Thiriet, N., and Solinas, M. (2016). Statins reduce the risks of relapse to addiction in rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 1588–1597. doi: 10.1038/npp.2015.317

Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G., and Guizzetti, M. (2013). Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 263–275. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.09.007

Cooper, S., Robison, A. J., and Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward circuitry in addiction. *Neurotherapeutics* 14, 687–697. doi: 10.1007/s13311-017-0525-z

Czoty, P. W. (2015). Effects of chronic binge-like ethanol consumption on cocaine self-administration in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 153, 278–285. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.05.016

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 5274–5278. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274

Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397. doi: 10.1194/jlr.R400004-JLR200

Egawa, J., Pearn, M. L., Lemkuil, B. P., Patel, P. M., and Head, B. P. (2016). Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J. Physiol.* 594, 4565–4579. doi: 10.1113/jp270590

Flatscher-Bader, T., Harrison, E., Matsumoto, I., and Wilce, P. A. (2010). Genes associated with alcohol abuse and tobacco smoking in the human nucleus accumbens and ventral tegmental area. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34, 1291–1302. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01207.x

Flatscher-Bader, T., Zuvela, N., Landis, N., and Wilce, P. A. (2008). Smoking and alcoholism target genes associated with plasticity and glutamate transmission in the human ventral tegmental area. *Hum. Mol. Genet.* 17, 38–51. doi: 10.1093/hmg/ddm283

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00457/full#supplementary-material

TABLE S1 | Primer sequences used for RT-qPCR (for, forward primers; rev, reverse primers).

Fracassi, A., Marangoni, M., Rosso, P., Pallottini, V., Fioramonti, M., Siteni, S., et al. (2017). Statins and the brain: more than lipid lowering agents? *Curr. Neuropharmacol.* doi: 10.2174/1570159x15666170703101816 [Epub ahead of print].

Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., and D'Arcangelo, G. (2008). Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 212, 407–414. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.04.019

Gessa, G. L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., and Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 348, 201–203. doi: 10.1016/0006-8993(85)90381-6

Gilpin, N. W., Herman, M. A., and Roberto, M. (2015). The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. *Biol. Psychiatry* 77, 859–869. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.09.008

Gilpin, N. W., and Koob, G. F. (2008). Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res. Health* 31, 185–195.

Graeff, F. G., Silveira, M. C. L., Nogueira, R. L., Audi, E. A., and Oliveira, R. M. W. (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.* 58, 123–131. doi: 10.1016/0166-4328(93)90097-A

Heilig, M., Egli, M., Crabbe, J. C., and Becker, H. C. (2010). Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addict. Biol.* 15, 169–184. doi: 10.1111/j.1369-1600.2009.00194.x

Hirth, N., Meinhardt, M. W., Noori, H. R., Salgado, H., Torres-Ramirez, O., Uhrig, S., et al. (2016). Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, 3024–3029. doi: 10.1073/pnas.1506012113

Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., et al. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 12027–12032. doi: 10.1073/pnas.1534923100

Johansen, J. P., Tarpley, J. W., Ledoux, J. E., and Blair, H. T. (2010). Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nat. Neurosci.* 13, 979–986. doi: 10.1038/nn.2594

Jones, K. T., Zhen, J., and Reith, M. E. A. (2012). Importance of cholesterol in dopamine transporter function. *J. Neurochem.* 123, 700–715. doi: 10.1111/jnc.12007

Karkhanis, A. N., Rose, J. H., Huggins, K. N., Konstantopoulos, J. K., and Jones, S. R. (2015). Chronic intermittent ethanol exposure reduces presynaptic dopamine neurotransmission in the mouse nucleus accumbens. *Drug Alcohol Depend.* 150, 24–30. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.019

Koob, G. F., and Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97–129. doi: 10.1016/s0893-133x(00)00195-0

Korade, Z., and Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.02.019

Korinek, M., Vyklicky, V., Borovska, J., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Krausova, B., et al. (2015). Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *J. Physiol. Lond.* 593, 2279–2293. doi: 10.1113/jphysiol.2014.288209

Koudinov, A. R., and Koudinova, N. V. (2001). Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J.* 15, 1858–1860. doi: 10.1096/fj.00-0815fje

Läck, A., Floyd, D. W., and Mccool, B. A. (2005). Chronic ethanol ingestion modulates proanxiety factors expressed in rat central amygdala. *Alcohol* 36, 83–90. doi: 10.1016/j.alcohol.2005.07.004

Law, M., and Rudnicka, A. R. (2006). Statin safety: a systematic review. *Am. J. Cardiol.* 97, 52C–60C. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.010

Lecis, C., and Segatto, M. (2014). Cholesterol homeostasis imbalance and brain functioning: neurological disorders and behavioral consequences. *J. Neurol. Neurol. Disord.* 1, 1–14. doi: 10.15744/2454-4981.1.101

Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-soboslay, A., Becker, K. G., Lowe, R., Huestis, M. A., et al. (2006). Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 1:e114. doi: 10.1371/journal.pone.0000114

Lewohl, J. M., Wang, L., Miles, M. F., Zhang, L., Dodd, P. R., and Harris, R. A. (2000). Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24, 1873–1882. doi: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb01993.x

Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., et al. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Sci.* 123, 595–605. doi: 10.1242/jcs.060681

Luessen, D. J., and Chen, R. (2016). Therapeutics psychostimulants, brain membrane lipids and dopamine transmission. *J Biomol. Res. Ther.* 5:2. doi: 10.4172/2167-7956.1000143

Lüscher, C., and Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.017

Mahley, R. W. (2016). Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1305–1315. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307023

Martin, M. G., Pfrieger, F., and Dotti, C. G. (2014). Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* 15, 1036–1052. doi: 10.15252/embr.201439225

Mayfield, R. D., Lewohl, J. M., Dodd, P. R., Herlihy, A., Liu, J., and Harris, R. A. (2002). Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J. Neurochem.* 81, 802–813. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00860.x

McBride, W. J., Kimpel, M. W., McClintick, J. N., Ding, Z. M., Edenberg, H. J., Liang, T., et al. (2014). Changes in gene expression within the extended amygdala following binge-like alcohol drinking by adolescent alcohol-preferring (P) rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 117, 52–60. doi: 10.1016/j.pbb.2013.12.009

McBride, W. J., Kimpel, M. W., McClintick, J. N., Ding, Z. M., Hauser, S. R., Edenberg, H. J., et al. (2013). Changes in gene expression within the ventral tegmental area following repeated excessive binge-like alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 47, 367–380. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.04.002

McClintick, J. N., Mcbride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2016). Gene expression changes in glutamate and GABA-A receptors, neuropeptides, ion channels and cholesterol synthesis in the periaqueductal gray following binge-like alcohol drinking by adolescent alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 955–968. doi: 10.1111/acer.13056

McClintick, J. N., McBride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2015). Gene expression changes in serotonin, GABA-A receptors, neuropeptides and ion channels in the dorsal raphe nucleus of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 129, 87–96. doi: 10.1016/j.pbb.2014.12.007

McClintick, J. N., McBride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2018). Gene expression changes in the ventral hippocampus and medial prefrontal cortex of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Alcohol* 68, 37–47. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.09.002

Melis, M., Spiga, S., and Diana, M. (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 101–154. doi: 10.1016/s0074-7742(05)63005-x

Morud, J., Ashouri, A., Larsson, E., Ericson, M., and Söderpalm, B. (2017). Transcriptional profiling of the rat nucleus accumbens after modest or high alcohol exposure. *PLoS One* 12:e0181084. doi: 10.1371/journal.pone.0181084

Moss, H. B. (2013). The impact of alcohol on society: A brief overview. *Soc. Work Public Health* 28, 175–177. doi: 10.1080/19371918.2013.758987

Most, D., Ferguson, L., and Harris, R. A. (2014). Molecular basis of alcoholism. *Handb. Clin. Neurol.* 125, 89–111. doi: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00006-9

Moutinho, M., Nunes, M. J., and Rodrigues, E. (2017). The mevalonate pathway in neurons: it's not just about cholesterol. *Exp. Cell Res.* 360, 55–60. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.034

Petrov, A. M., Kasimov, M. R., and Zefirov, A. L. (2016). Brain cholesterol metabolism and its defects: linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae.* 8, 58–73.

Pickens, C. L., Airavaara, M., Theberge, F., Fanous, S., Hope, B. T., and Shaham, Y. (2011). Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends Neurosci.* 34, 411–420. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.001

Rahbek-Clemmensen, T., Lycas, M. D., Erlendsson, S., Eriksen, J., Apuschkin, M., Vilhardt, F., et al. (2017). Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nat. Commun.* 8:740. doi: 10.1038/s41467-017-00790-3

Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids. Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog. Brain Res.* 186, 113–137. doi: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7

Roberto, M., and Varodayan, F. P. (2017). Synaptic targets: chronic alcohol actions. *Neuropharmacology* 122, 85–99. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.013

Rozman, D., and Monostory, K. (2010). Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol. Ther.* 127, 19–40. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.03.007

Russell, D. W., Halford, R. W., Ramirez, D. M. O., Shah, R., and Kotti, T. (2009). Cholesterol 24-Hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 1017–1040. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.072407.103859

Saeed, A. A., Genové, G., Li, T., Lütjohann, D., Olin, M., Mast, N., et al. (2014). Effects of a disrupted blood-brain barrier on cholesterol homeostasis in the brain. *J. Biol. Chem.* 289, 23712–23722. doi: 10.1074/jbc.m114.556159

Saher, G., and Stumpf, S. K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 1083–1094. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.02.010

Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., et al. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1816–1823. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x

Sommer, W., and Spanagel, R. (2013). "Behavioral neurobiology of alcohol addiction," in *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, eds M. A. Geyer, B. A. Ellenbroek, C. A. Marsden, T. R. E. Barnes and S. L. Andersen (Switzerland: Springer), v–vii. doi: 10.1007/978-3-642-28720-6

Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol. Rev.* 89, 649–705. doi: 10.1152/physrev.00013.2008

Sun, M. Y., Izumi, Y., Benz, A., Zorumski, C. F., and Mennerick, S. J. (2016a). Endogenous 24S-hydroxycholesterol modulates NMDAR-mediated function in hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 115, 1263–1272. doi: 10.1152/jn.00890.2015

Sun, M. Y., Linsenbardt, A. J., Emnett, C. M., Eisenman, L. N., Izumi, Y., Zorumski, C. F., et al. (2016b). 24(S)-Hydroxycholesterol as a modulator of neuronal signaling and survival. *Neuroscientist* 22, 132–144. doi: 10.1177/1073858414568122

Teixeira, G., Vieira, L. B., Gomez, M. V., and Guatimosim, C. (2012). Cholesterol as a key player in the balance of evoked and spontaneous glutamate release in rat brain cortical synaptosomes. *Neurochem. Int.* 61, 1151–1159. doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.008

Volkow, N. D., Koob, G. F., and McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction. *N. Engl. J. Med.* 374, 363–371. doi: 10.1056/nejmra1511480

Volkow, N. D., Wang, G.-J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Jayne, M., et al. (2007). Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J. Neurosci.* 27, 12700–12706. doi: 10.1523/jneurosci.3371-07.2007

Wang, D., and Zheng, W. (2015). Dietary cholesterol concentration affects synaptic plasticity and dendrite spine morphology of rabbit hippocampal neurons. *Brain Res.* 1622, 350–360. doi: 10.1016/j.brainres.2015.06.049

Warden, A. S., and Mayfield, R. D. (2017). Gene expression profiling in the human alcoholic brain. *Neuropharmacology* 2122, 161–174. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.02.017

Zeppelin, T., Ladefoged, L. K., Sinning, S., Periole, X., and Schiøtt, B. (2018). A direct interaction of cholesterol with the dopamine transporter prevents its out-to-inward transition. *PLoS Comput. Biol.* 14, 1–24. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005907

Zhou, Z., Yuan, Q., Mash, D. C., and Goldman, D. (2011). Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 6626–6631. doi: 10.1073/pnas.1018514108

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Alsebaaly, Dugast, Favot, Rabbaa Khabbaz, Solinas and Thiriet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Genes	Accession number	Primers	Ref
HMGCoA synthase *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*	NM_017268.1	**For :ATCGCGTTTGGTGCCTGAAG**	
		Rev: AAGGGCAACGATTCCCACAT	
HMGCoA reductase *Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*	NM_013134.2	**For: GGTGCATCGCCATCCTGTAC**	
		Rev: GCTGACGCAGGTTCTGGAA	
Fdft1 *Farnesyl diphosphate farnesyl transferase*	NM_019238.2	**For: ACCAACGCCCTACAACACAT**	A
		Rev: GTAACTGCTTGCCCCTTCC	
Fdps *Farnesyl diphosphate synthase*	NM_031840.1	**For: TCAGTGTCTGCTACGAGCC**	B
		Rev: TCGTACTTGAAGAACACACTCC	
Abca1 *ATP binding cassette A1*	NM_178095.2	**For: GGTAGTGTGGCCACTTTCGT**	C
		Rev: TCTGGGCCTGATGAAAAATC	
ApoE *Apolipoprotein E*	J00705	**For: TCCATTGCCTCCACCACAGT**	
		Rev: GGGCGTAGGTGAGGGATGA	
Ldlr *Low Density lipoprotein receptor*	NM_175762.2	**For: TTCTTCAGGTTGGGGATCAG**	C
		Rev: CAGCTCTGTGTGAACCTGGA	
Dhcr24 *24-Dehydrocholesterol reductase*	NM_001080148.1	**For: TAGAGCCCAGCAAGCTGAAT**	
		Rev: ATCCAGCCAAAGAGGTAGCG	
CYP46A1 *24S cholesterol hydroxylase*	NM_001108723.1	**For: GTGCCACCATCGACATCCTG**	D
		Rev: GGTGTTACGGGACGCACTGATAC	
Srebf2 *Sterol regulatory element-binding protein-2*	NM_001033694.1	**For: GTCCTCACCTTCCTGGGTCT**	A
		Rev: CAGCAGTAGAGTCGGCATCA	
Lxr Beta *Liver X receptor beta*	NM_031626.1	**For: TGAAGGCATCCACCATCGAG**	
		Rev: CGTGATGCACTCTGTCTCGT	
Gapdh *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*	NM_017008.4	**For: ATGGGAAGGTCGGTGTGAAC**	
		Rev: ACTCCACGACATACTCAGCAC	
ActB *Actin beta*	NM_031144.3	**For: GGAGAAGATTTGGCACCAC**	
		Rev: AGGCATACAGGGACAACAC	
Hprt1 *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*	NM_012583.2	**For: TGGTCAAGCAGTACAGCCCC**	
		Rev: TAGTGGCCACATCAACAGGA	

Table : Primer sequences used for RT-qPCR (For: Forward primers; Rev: Reverse primers)

References used:

A. Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., and Palou, A. (2010). Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1127–1133. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.10.001.

B. Yuan, F., Wang, H., Tian, Y., Li, Q., He, L., Li, N., et al. (2016). Fish oil alleviated high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulating hepatic lipids metabolism and metaflammation: A transcriptomic study. *Lipids Health Dis.* 15. doi:10.1186/s12944-016-0190-y.

C. Fernández-Pérez, L., Santana-Farré, R., De Mirecki-Garrido, M., García, I., Guerra, B., Mateo-Díaz, C., et al. (2014). Lipid profiling and transcriptomic analysis reveals a functional interplay between estradiol and growth hormone in liver. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0096305.

D. Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski, C. F., and Izumi, Y. (2016). 24(S)-Hydroxycholesterol protects the ex vivo rat retina from injury by elevated hydrostatic pressure. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep33886.

Article 2

Article 2: Impact of acute and repeated cocaine administrations on the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the rat brain.

Plusieurs études suggèrent qu'une altération de l'homéostasie du cholestérol cérébral pourrait être impliquée dans les neuroadaptations responsables de l'addiction. Dans la première étude de ma thèse, nous avons montré que l'exposition chronique à l'alcool, suivi d'une longue période d'abstinence, engendre des altérations au niveau de l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol cérébral dans plusieurs structures cérébrales impliquées dans l'addiction et la rechute. De plus, notre équipe a également montré qu'un traitement chronique avec des statines, qui inhibent la synthèse du cholestérol, réduit la recherche de cocaïne et de nicotine dans un modèle d'addiction chez les rongeurs. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que des administrations de cocaïne perturbent aussi l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau et conduisent à des neuroadaptations responsables de la persistance de l'addiction. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets de l'exposition aiguë ou chronique de cocaïne sur l'expression de gènes impliquées dans l'homéostasie du cholestérol dans le CPF et le NAc, des structures cérébrales impliquées dans l'addiction et la rechute. Nous avons plus spécifiquement étudié l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol (HMGCoA réductase), impliquées dans le transport du cholestérol (ApoE et le transporteur Abca1), régulation du métabolisme du cholestérol (LXR bêta) et de la dégradation du cholestérol cérébral (Cyp46A1).

Impact of acute and repeated cocaine administrations on the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the rat brain.

Josette Alsebaaly[1,2], Emilie Dugast[1, 3], Lydia Rabbaa Khabbaz[2], Marcello Solinas[1], Nathalie Thiriet[1]

[1]*Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Université de Poitiers, INSERM, U-1084, Poitiers-France.*

[2] *Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacie clinique et Contrôle de Qualité des Médicaments (LPCQM), Faculty of Pharmacy, PTS, University of Saint-Joseph of Beirut, Beirut, Lebanon.*

3 CHU de Poitiers, Poitiers, France,

Running Title: Cocaine and brain cholesterol metabolism

Correspondence :

Dr Nathalie THIRIET

nathalie.thiriet@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Cholesterol is involved in the maintenance of neuronal morphology, synaptogenesis and synaptic communication. Each of these mechanisms are known to be modulated by chronic cocaine exposure and to participate in addiction. We hypothesized that 1) cocaine could acutely alter cholesterol homeostasis and 2) this alteration would become persistent after chronic administration. To test this, first we administered cocaine acutely and, 1, 3, and 6 h after the injection, we investigated the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the prefrontal cortex (PFC), the nucleus accumbens (NAc), two of the main terminals of the dopaminergic system. Then, we repeatedly injected cocaine and, after 3 weeks of abstinence, we investigated gene expression in a network of regions involved in relapse which includes the PFC, the NAc, the dorsal and ventral hippocampus, the amygdala and the caudate putamen. We targeted genes encoding proteins directly involved in cholesterol synthesis, transport and degradation. We found that acute injections of cocaine induce time-dependent and region specific changes in the in genes expression in the PFC and the NAc. In addition, we found that chronic administration of cocaine changes in gene expression that persist after 3 weeks of abstinence. These changes were also region specific but were different from those produced by acute administration. Altogether these results demonstrate that cocaine produce alterations in cholesterol homeostasis in several brain areas and after repeated administration some of these effects may become persistent. These neuroadaptations could participate in the long-lasting risks of relapse to cocaine addiction.

Keywords: Addiction, Cocaine, Cholesterol metabolism, Gene expression, Neuroadaptations

Introduction:

Acute cocaine administration, by inhibiting dopamine transporter, increases dopamine concentration within the mesocorticolimbic system (Brodie and Dunwiddie, 1990; Di Chiara and Imperato, 1988), which corresponds to neurons that originates in the ventral tegmental area and projects to a number of cortical and limbic regions such as the nucleus accumbens (NAc) and the prefrontal cortex (PFC) (Brodie and Dunwiddie, 1990; Di Chiara and Imperato, 1988). The increased dopamine level is associated with an increase in locomotor activity in rodents (Kalivas and Stewart, 1991). When cocaine is administered repeatedly, the locomotor effect of cocaine increases and is associated with an enhanced dopaminergic transmission in the mesocorticolimbic system. Other than its effect on dopaminergic system, chronic cocaine injections is associated with long-term neuroadaptations in the brain (Pierce and Kalivas, 1997). On the morphological level, repeated injections of cocaine increase the density of dendritic spines in the NAc (MacAskill et al., 2014) and in the the PFC of rats (Robinson et al., 2001). In addition, synaptic plasticity has been described after chronic exposure to cocaine like a decrease in the AMPAR / NMDAR ratio in the NAc shell is observed 24 hours after the last exposure to cocaine (Kourrich et al., 2007). The reduced AMPAR/NMDAR ratio observed after chronic exposure to cocaine in the NAc was replaced by an increase of this ratio after a long period of abstinence (Kourrich et al., 2007), showing that cocaine withdrawal also produces many alterations within dopaminergic circuits as well as in other monoaminergic systems .

The human brain contains 20-25% of the body's total cholesterol (Björkhem et al., 2004; Dietschy, 2009) and requires a well-balanced cholesterol homeostasis to assure the high metabolic requirements of neurons and to maintain neuronal connectivity (Goritz et al., 2005; Pfenninger, 2009). At the cellular level, cholesterol plays a role in maintaining neuronal membrane integrity and in determining membrane permeability and fluidity (Egawa et al., 2016; Korade and Kenworthy, 2008). Cholesterol has been shown to be involved in synaptogenesis, maintenance of neuronal morphology and synaptic communication (Petrov et al., 2016). Therefore, alteration in cellular cholesterol (depletion or surplus) can affect the neuronal functioning (Ko et al., 2005; Linetti et al., 2010). Cholesterol is produced by a multistep process called the mevalonate pathway, in which the rate limiting step is the activity of the hydroxymethylglutaryl-CoA (HMGCoA) reductase (Rozman and Monostory, 2010). Then, cholesterol binds to lipoproteins (mainly the apolipoprotein E, APOE) (Mahley, 2016) and is exported through membrane transporters, such as ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1) (Chen et al., 2013; Dietschy and Turley, 2004; Lecis and Segatto, 2014). At the membrane of neuron, cholesterol is taken by low density lipoprotein receptor (LDLr) and LDL-receptor like protein and internalized into the neurons (Beffert et al., 2004). Cholesterol in excess is then degraded by the

enzyme 24S-cholesterol hydroxylase also named CYP46A1. This metabolism is very strictly regulated and alterations of several enzymes is implicated in several brain diseases such as Alzheimer's disease and Huntington's disease.

Emerging evidences suggest that brain cholesterol homeostasis could play a role in drug addiction. First of all, a transcriptomic post-mortem study in humans found that genes involved in the synthesis and trafficking of cholesterol are overexpressed in the cortex of individuals with a history of cocaine, cannabis and phencyclidine abuse (Lehrmann et al., 2006). Secondly, in animal models, a recent study has shown that repeated exposure to cocaine can affect levels of proteins involved in cholesterol metabolism in mice hippocampus (Cotto et al., 2018). Finally, indirect evidence for the role of cholesterol in addiction comes from a study showing that chronic treatment with brain-penetrating statins, which are inhibitors of the HMGCoA reductase enzyme (Fracassi et al., 2019; Law and Rudnicka, 2006), reduces drug seeking for cocaine and nicotine without affecting food-seeking behavior in a rodent model of addiction (Chauvet et al., 2016). Altogether, these evidences suggest that altered cholesterol homeostasis may be a mechanism involved in addiction to drugs including cocaine.

The aim of our study is to investigate the neuroadaptations in cholesterol homeostasis induced (1) by acute injection of cocaine and (2) by repeated injections followed by a long period of abstinence in different brain structures such as the prefrontal cortex (PFC), the nucleus accumbens (NAc), the dorsal (DHipp) and ventral hippocampus (VHipp), the amygdala and the caudate putamen (Cpu), involved in cocaine addiction. Concerning the first part, the aim was investigating if cocaine does acutely alter this metabolic pathway. The purpose of the second part was to investigate if these alterations are long lasting and find their potential implication in neuroadaptations found after a long period of abstinence. For this, we investigated the expression of genes encoding enzymes involved in cholesterol synthesis, in transport of cholesterol, in the degradation of cholesterol, as well as in the regulation of cholesterol synthesis.

Materials and Methods

Animals

Sprague Dawley rats, weighing 300 g at the beginning of the experiment (Janvier labs, France), were used in this study. After habituation to the animal facility, they were housed two by two in a controlled environment under a 12-h light/dark cycle (lights on at 8 a.m.) with food available ad libitum. All experiments were conducted during the light phase and in accordance with the European Union directives (2010/63/EU) for the care of laboratory animals and approved by the local ethics committee (COMETHEA).

Drug treatment

Acute treatment: Rats were first placed for 15 minutes in the open field for habituation. After this period, rats were injected with either cocaine (15 mg/kg, i.p.) (n=30) or saline (n=10) (NaCl 0.9 g/l, i.p.), and they were immediately placed back in the open field arena for one hour and were sacrificed at 1h, 3h or 6h after the injection of cocaine or saline.

Chronic treatment: Twenty-four male Sprague-Dawley rats received ten injections of cocaine or saline. After each injection, rats were put in the open field arena and locomotor activity was assessed. They were sacrificed 21 days after the last injection. The timeline of this chronic treatment is found in **Figure 1.**

Locomotor activity measurement

Motor activity was measured in Plexiglas cages (50×50×50 cm) placed in frames mounted with computer-monitored infrared photocell beams (Videotrack from ViewPoint France). Horizontal locomotion was measured by the number of beam crossings in the open field connected to a computer. Rats were first habituated to the open field room for 60 min before the experiment. Rats were then placed for 15 min in the open field for habituation to the system before being injected and replaced in the system. Locomotor activity was measured in the open field 60 min after each saline or cocaine injections.

Tissue collection and RNA isolation

Rats were anesthetized with pentobarbital (120 mg/kg, Dolethal® Vetoquinol France), decapitated and brains were removed and dissected using a rat matrix (WPI, London). Brain structures were isolated by blunt dissection and stored at -80°C until used. Total RNA was isolated using TRIzol Reagent and chloroform and then purified using Macherey Nagel kit (Macherey Nagel, France). The RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) and the RNA integrity was evaluated by the Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent 2100 bioanalyzer). All RNAs had a RIN (RNA integrity number) above eight.

Reverse Transcription and quantitative PCR

Equal amounts of RNA input (1 µg) were reverse-transcripted using Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA; Dutscher, France). Real time qPCR was performed using the LightCycler480 detection system (Roche, France). Reaction mix was exposed to the amplification program consisting in one cycle (95°C for 5 min), followed by 45 cycles, including 3 phases (phase 1: 95°C for 20 s; phase 2: 64°C for 15 s for all primers except for hrpt1 = 60°C); phase 3: 72°C for 20 s). The sequences of primers used (**Supplementary Table S1**) were either designed using Primer-BLAST software, or found in previous publications. Results were normalized to three housekeeping genes (gapdh, actin and hrpt1) and reported as RNA fold changes according to the ΔΔCT method ($2\Delta\Delta CT = 2^{\Delta CT \text{ sample - mean } \Delta CT \text{ ''control animal''}}$).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5. All data are represented as mean SEM. For the study on the effect of acute injection of cocaine on gene expression a non-parametric one way-ANOVA corrected by the post hoc Dunnett was performed. For the study on the effect of repeated injection of cocaine on gene expression an unpaired Student's t-test was performed. For behavioral measures, a two-way ANOVA analysis corrected by the post hoc Bonferroni was performed with time and treatment as independent factors. Differences were considered significant when $P<.05$.

Results

Acute injection of cocaine alters in the expression of genes involved in the metabolism of cholesterol in the PFC and in the NAc

In the **PFC (Figure 2)**, one hour after an acute injection of cocaine we observed an increased mRNA levels of the gene encoding the *HmgcoA synthase* ($p<0.01$), which belong to the mevalonate pathway, and the gene encoding *LXR beta* ($p<0.01$), a negative regulator of cholesterol synthesis. The levels of these mRNAs returned to control levels at later time points. Levels of mRNA coding for the enzyme responsible for cholesterol degradation, *CYP46A1*, were increased 1 and 3 hours after cocaine exposure ($p<0.001$). All the other genes studied were not affected by acute exposure to cocaine in this brain area.

In the **NAc (Figure 3)**, one hour after an acute injection of cocaine the only gene whose expression was altered was *Ldlr*, which is involved in cholesterol transport. mRNA levels for this gene returned to control levels at later time points ($p<0.01$). Three hours and six hours after acute injection of cocaine, we observed a decreased expression of the gene encoding *HmgcoA reductase*, the rate limiting enzyme in the mevalonate pathway ($p<0.001$). Levels of mRNA levels of *Fdps* and *LXR beta*, which are involved in cholesterol synthesis and regulation respectively, were increased 6 hours after cocaine exposure ($p<0.01$ for *Fdps* and $p<0.05$ for *LXR beta*). Levels of mRNA coding *caveolin 1*, involved in the formation of lipid rafts, were increased 3 hours and 6 hours after cocaine exposure ($p<0.01$). All the other genes studied were not affected by exposure to cocaine.

Chronic cocaine treatment induces persistent modifications in expression of genes involved in the metabolism of cholesterol in the several brain structures

At the behavioral level, repeated administrations of cocaine produce an increase in locomotor activity between day 1 and day 10 whereas locomotor activity decreased over time. In addition, we observed an increase in locomotor activity in cocaine group compared to saline group. Statistical analysis revealed a significant effect of ($F_{(9,378)}= 2.33$, $p<0.05$) , a significant effect of treatment ($F_{(1,378)}= 366,5$, $p<0.0001$) and a significant Time X Treatment interaction ($F_{(9,378)}= 8,14$, $p<0.0001$) **(Figure 4)**.

At the molecular level, in the **PFC (Figure 5)**, repeated cocaine exposure followed by 3 weeks of abstinence decreased the expression of the genes encoding for *Fdft1* (-25%, $p<0.05$) and increased the expression of *Dhcr24* (70%, $p\leq0.001$), both involved in cholesterol synthesis. Levels of mRNA of genes *Abca1* and *ApoE* (-30%, $p<0.05$ for *Abca1*; -40 %, $p<0.01$ for *ApoE*), encoding proteins involved in cholesterol transport, were decreased. Interestingly, the expression of regulators of the mevalonate pathway, the *Srebf2* and *LXR beta*, were both decreased (-35 %, $p<0.05$ for *Srebf2*; -30 %, $p<0.01$ for *LXR beta*) suggesting a decrease in the cholesterol turnover. All the other genes studied were not

affected by exposure to cocaine followed by 3 weeks of abstinence. For CYP46A1, we confirmed that there were no changes in the protein level (**Supplementary data).**

In the **Nac (Figure 6)**, repeated cocaine exposure increased the mRNA levels of *HmgcoA reductase* and *Cyp46a1* (30%, $p \leq 0.01$ for *HmgcoA reductase* and 35%, $p \leq 0.001$ for *Cyp46a1*). For CYP46A1, we also found an increased protein level (**Supplementary data)**. All the other genes studied were not affected by exposure to cocaine.

In the **ventral hippocampus (VHipp) (Figure 7),** repeated cocaine exposure decreased *Abca1* mRNA levels (30%, $p \leq 0.01$). All the other genes studied were not affected by exposure to cocaine followed by 3 weeks of abstinence.

In the **dorsal hippocampus (DHipp) (Figure 8),** repeated cocaine exposure increased *HmgcoA synthase* (20%, $p \leq 0.01$), *Dhcr24* (20%, $p < 0.05$) and *caveolin 1* (10%, $p < 0.01$) mRNA levels. All the other genes studied were not affected by exposure to cocaine followed by 3 weeks of abstinence.

In the **amygdala (Figure 9),** repeated cocaine exposure decreased *Ldlr* (-30%, $p < 0.05$) mRNA levels. All the other genes studied were not affected by exposure to cocaine followed by 3 weeks of abstinence.

In the **caudate putamen (CPu) (Figure 10),** repeated cocaine exposure produced no changes in the cholesterol metabolism.

DISCUSSION

In this study, we investigated the effect of acute and repeated administration of cocaine on the expression of genes involved in the metabolism of cerebral cholesterol.

For acute administration, attention was focused on two brain areas, the PFC and the NAc, which are the main terminals of the dopaminergic mesocorticolimbic system. Acute cocaine is known to increase dopamine neurotransmission in these brain regions as measured by microdialysis (Kalivas and Duffy, 1990, 1993) and to activate neurons as measured by induction of immediate early genes such as c-FOS (Thiriet et al., 2000). Therefore, we hypothesized that the effects of acute cocaine on cholesterol homeostasis would be more pronounced in these regions and would have followed a time course that parallel increases in dopamine release. In the **PFC**, acute cocaine administration increased after one hour the expression of genes encoding *HmgcoA synthase* and *LXR beta* involved in cholesterol synthesis and the regulation of this synthesis respectively. In addition, acute cocaine increased the expression of *Cyp46a*1 encoding the enzyme responsible for brain cholesterol degradation 1 and 3 hours after cocaine exposure in the PFC. These results suggest that acute cocaine exposure increase both the synthesis and the degradation of cholesterol 1 hour after acute exposure. Increased expression of *Cyp46a*1 persisted after 3 hours. Conversely, in the **NAc**, acute cocaine increases mRNA levels of *Ldlr*, known to be responsible for the endocytosis of cholesterol enriched *ApoE* by neurons (Beffert et al., 2004), one hour after cocaine exposure. In addition, acute cocaine decreased the expression of the genes encoding *HmgcoA reductase*, the rate limiting enzyme of cholesterol synthesis, three hours after the injection, suggesting a reduction in the synthesis of cholesterol. Also, acute cocaine reduced *HmgcoA* reductase and increased *Fdps* and *LXR beta* mRNA levels, respectively implicated in cholesterol synthesis and regulation 6 hours later. Globally, acute cocaine injection reduces cholesterol synthesis in the NAc.

Acute cocaine injection causes structural changes within the brain. These alterations are supposed to be responsible for the installation of drug addiction. For example, acute cocaine exposure led to the formation of new dendritic spines one hour later in the NAc (Dos Santos et al., 2017) and 6 hours later in the CPF (Muñoz-Cuevas et al., 2013). Since cholesterol is considered to be involved in the formation of new dendritic spines (Hering et al., 2003), the alterations in cerebral cholesterol metabolism could participate in these neuroadaptations.

In this study, acute cocaine exposure activates cholesterol trafficking 1 hour after cocaine exposure and reduce cholesterol synthesis later on in the NAc. This phenomenon could be put in link with molecular and cellular changes in the dopaminergic neurotransmission produced by an acute injection of cocaine. For example, acute injection of cocaine (15 mg/kg, ip) produced an elevation in

extracellular dopamine concentration in the NAc (Kalivas and Duffy, 1990). This elevation is maximal after 40 minutes is accompanied with a maximal response in the locomotor activity (Kalivas and Duffy, 1990). In fact, it has been shown that reduced cholesterol can reduce the exocytosis of neurotransmitters (Linetti et al., 2010). Therefore, the reduction in cholesterol synthesis observed after 3 hours of acute cocaine injection can be involved in the reduction in dopamine levels.

Caveolin 1 is known to regulate the dopamine receptor D1R turnover and signaling in brain (Kong et al., 2007). D1R internalization depends on the integrity of caveolae, because disruption of caveolae strongly reduced agonist-mediated receptor sequestration (Kong et al., 2007). We observed an increase in *caveolin 1* expression, 3 hours after acute cocaine injection persisted 6 hours later. Therefore, this increase can be link to the increase of internalization of D1R after acute exposure to cocaine.

Acute cocaine exposure alters the expression of genes encoding proteins involved in cerebral cholesterol metabolism in a region and time dependent manner. These alterations can be involved in the synaptic neuroadaptations as well as in the alteration in dopaminergic changes observed after acute cocaine injection and responsible for the increased risk of addiction.

This study also investigated whether the expression of genes involved in cholesterol metabolism would be durably altered after a chronic cocaine treatment. To investigate neuroadaptations involved in long-term risks of relapse, we measured the gene expression after a 3 weeks period of abstinence (Lu et al., 2004). In the **PFC**, repeated cocaine injections resulted in persistent decrease in the expression of *Abca1* and *ApoE,* which are involved in cholesterol transport from astrocytes to neurons. A decrease in the expression of *Srebf2* and *LXR beta*, regulators of cholesterol metabolism, were also observed in this brain area. These results may indicate that cocaine treatment could lead to a reduction in the intercellular exchange of cholesterol in this structure Interestingly, a study conducted post-mortem in brains of human addicts has previously shown that the exposure to drug of abuse such as cocaine, cannabis and phencyclidine was associated with alterations in the expression of genes implicated in cholesterol metabolism in the same brain area (Lehrmann et al., 2006).

Our results suggest that chronic cocaine treatment might lead to reduced cholesterol levels in neurons. In fact, repeated cocaine exposure facilitates long-term potentiation (LTP) induction in mPFC pyramidal neurons (Lu et al., 2010), a phenomena that could be facilitated by less cholesterol in neurons and increased receptors at the membrane (Brachet et al., 2015). Altogether, these results suggest that reduced cholesterol metabolism could be altered by chronic cocaine treatment and could participate in functional changes observed after chronic cocaine treatment.

In **the NAc**, repeated cocaine injections increased the expression of *HMGcoA reductase*. In addition, repeated cocaine injections increased the expression of *CYP46A1*, the main enzyme involved in brain cholesterol catabolism. Globally, this suggest that the metabolism is more active in this brain area.

Some studies have shown alterations in the glutamatergic system, in the NAc, 21 days after repeated cocaine injection. For example, Boudreau et al found that such treatment produce an increase in the expression of AMPA receptor at the cellular surface (Boudreau and Wolf, 2005).This may correspond to a LTP due to the increased insertion of AMPA receptor (Malinow and Malenka, 2002). Brachet et al found that LTP is associated with a loss of cholesterol (Brachet et al., 2015). This loss would activate the cholesterol synthesis in this area. The increased expression of *HMGcoA reductase* could be an indicator for this activation.

In the **vHipp**, repeated cocaine injections decreased the expression of *Abca1*, involved in cholesterol transport from astrocytes to neurons. In addition, **the dHipp**, repeated cocaine injections increased *HMGcoA synthase* and *Dhcr24*. Both of these enzymes acts downstream in the mevalonate pathway and regulate cholesterol synthesis. Recently, Cotto et al. showed that chronic cocaine exposure affect cholesterol metabolism in mice hippocampus after 24 hours of abstinence (Cotto et al., 2018). They observed a reduction in *LXR beta* and *Cyp46a1* protein levels in the hippocampus of treated mice compared to control (Cotto et al., 2018). The difference observed in these results and ours can be due to the duration of the abstinence period. Hippocampal functioning is altered with chronic administration of cocaine (Beveridge et al., 2006; Gu et al., 2010; London et al., 1990), an effect that may contribute to the cognitive and emotional alterations frequently observed following exposure to cocaine such as impaired spatial learning in rodents exposed to cocaine (Mendez et al., 2008). These chronic cocaine-induced deficits persist during cocaine withdrawal (Kelley et al., 2005) up to 3 months of abstinence (Mendez et al., 2008). Impaired brain metabolism of cholesterol has also been associated with impaired cognitive processes such as learning (Schreurs, 2010) and with neuroplastic changes. Alteration in cholesterol levels was found to alter LTP (Brachet et al., 2015) which is considered as one of the most important cellular mechanism of learning (Disterhoft and De Jonge, 1987). Altogether, it could be suggested that altered expression in cholesterol metabolism can be implicated in the altered learning observed during cocaine withdrawal.

In the **amygdala**, repeated cocaine injections followed by 3 weeks of abstinence decreased the expression of *Ldlr* involved in cholesterol internalization in the neurons. This result suggests that repeated cocaine treatment could result in a decrease in the internalization of cholesterol to neurons in the amygdala. An anxiety-like negative emotional state is often present during cocaine withdrawal and may contribute to the high risk of relapse. The amygdala plays a crucial role not only in anxiety behavior, but also in the reinstatement of cocaine use. Alteration of cholesterol level may also play a role in the anxiety-like negative emotional state (Cartocci et al., 2017). Anxiety observed during withdrawal is associated with an enhancement of induction of LTP (Pollandt et al., 2006), which can be caused by the reduced amount of cholesterol in the neurons. This reduction in cholesterol

metabolism was also observed after a chronic exposure to alcohol (Alsebaaly et al., 2018). Hence, it could be speculated the changes we have observed in these genes may contribute to the anxiety behavior observed during abstinence following chronic exposure to the drugs of abuse.

Our previous results showed that statins given during abstinence reduce cocaine seeking after a period of withdrawal (Chauvet et al., 2016). In fact, statins, other than its effect on reducing the protein levels of HMGCoA reductase, was shown to increase the protein levels of several proteins such as Srebf2 and LDLr, related to the brain cholesterol metabolism in different brain structures such as the prefrontal cortex, the amygdala, the ventral striatum and the hippocampus without affecting cholesterol levels in these brain areas (Segatto et al., 2014). Interestingly, these effects could invert the changes observed in the gene expression observed in this current study in the PFC (the reduction in the mRNA levels of *Srebf2*), the Nac (the increase in mRNA levels of *HmgcoA reductase*) and the amygdala (the reduction in mRNA levels of *Ldlr*). These regions, which belong to the mesocorticolimbic system, are known to be involved in cocaine addiction and relapse. Therefore, chronic statin injection during withdrawal, may restore the alterations observed after chronic cocaine treatment, which may be responsible for the statin effect in reducing cocaine seeking.

In conclusion, this study shows that acute and chronic cocaine alter the expression of genes implicated in cholesterol metabolism. These alterations are persistent after 21 days of withdrawal from repeated treatment. Alterations in the cholesterol metabolism are region specific and treatment specific (acute vs. chronic). This study provides some possible explanations for the beneficial effects of statins against drug seeking. Future studies are needed to explore the effect cocaine exposure on the cholesterol levels and their functional consequences in these regions. This study is the first to investigate the effect of acute and chronic cocaine on cholesterol metabolism in several brain regions involved in addiction and and highlight the potential role of the cholesterol metabolism in addiction and relapse.

Funding: JA was recipient of a PhD fellowship from the Centre national de la recherche scientifique du Liban (CNRS-L).

Acknowledgements: This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

Figures and Legends

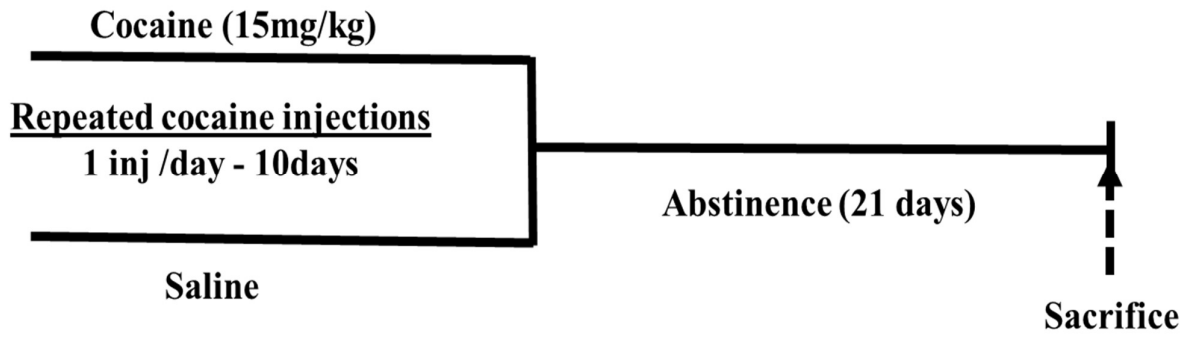


Fig 1. Schematic representation of the experimental design used for the repeated injections protocol.

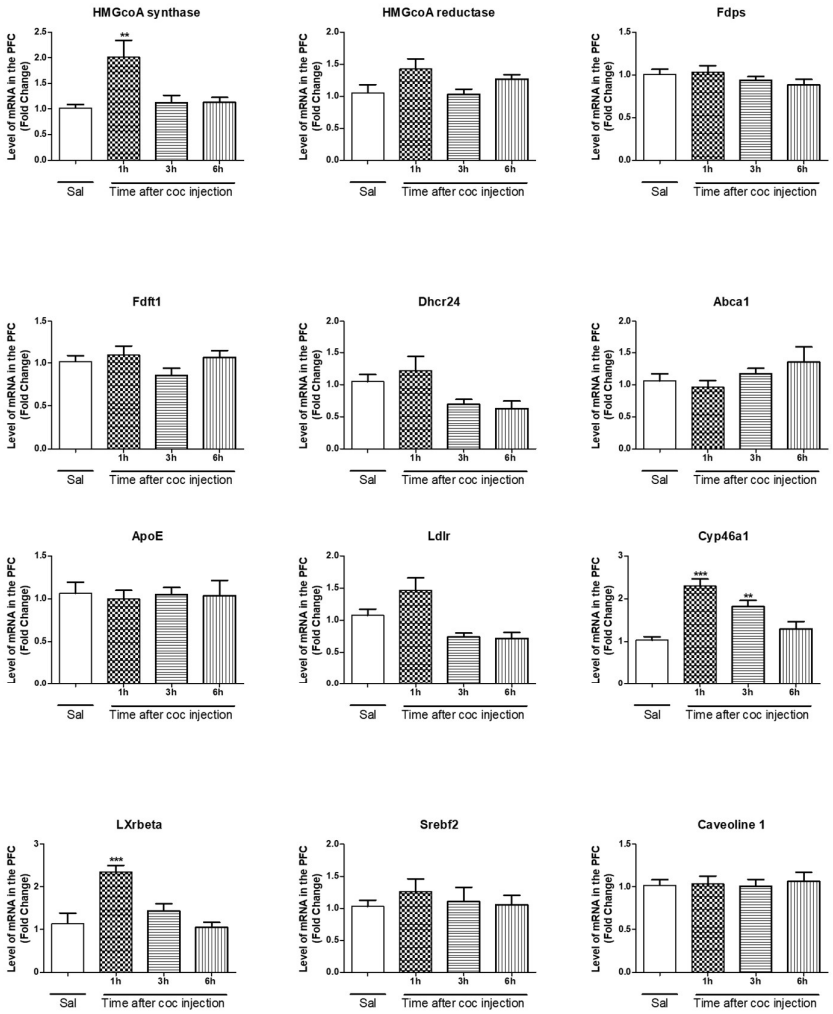


Fig 2. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the PFC in response to acute cocaine injection. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats that received an acute injection of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=10) and patterned bars correspond to cocaine injected animals (n=10 per group). Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ different from saline group. Abbreviations: PFC: Prefrontal cortex, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

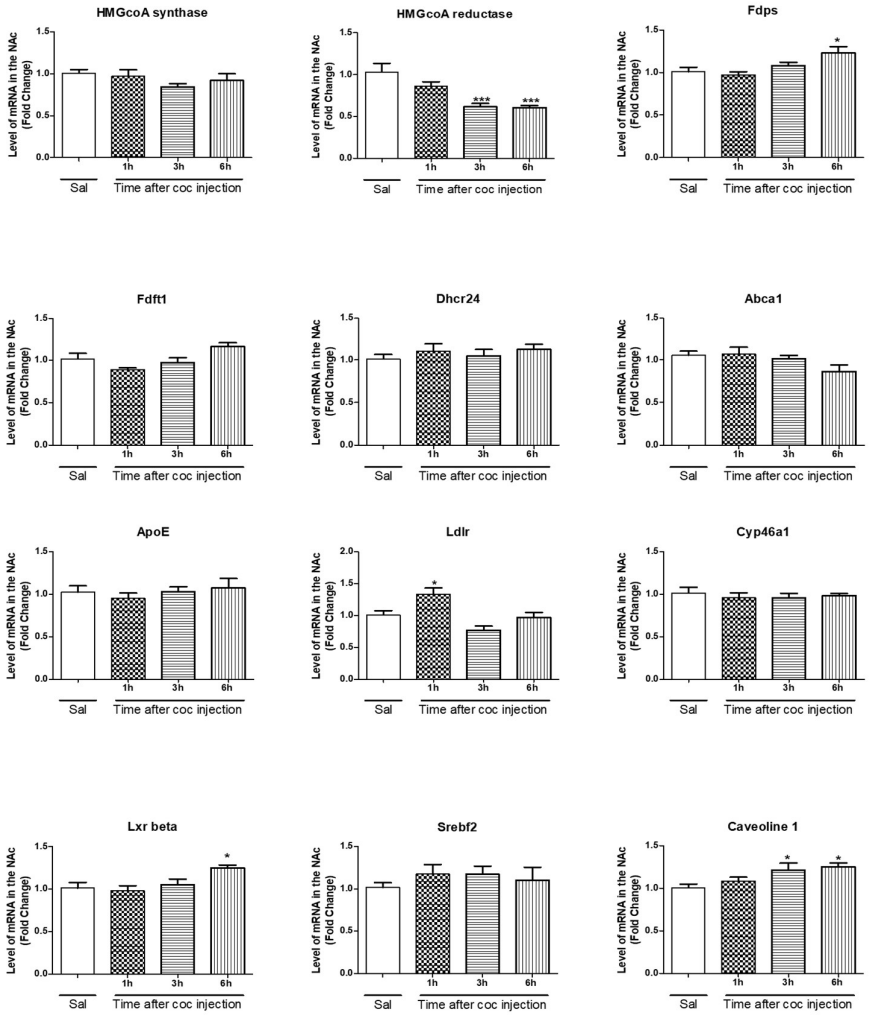


Fig 3. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the NAc in response to acute cocaine injection. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats that received an acute injection of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=10) and patterned bars correspond to cocaine injected animals (n=10 per group). Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$,$***p < 0.001$ different from saline group. Abbreviations: NAc: Nucleus accumbens, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.



Fig 4. Repeated cocaine administrations (15 mg/kg, i.p.) induce an increase in locomotor activity. Mean ± SEM locomotor activity in response to saline and cocaine injections is shown. Locomotor activity was monitored for one hour immediately after each injection.

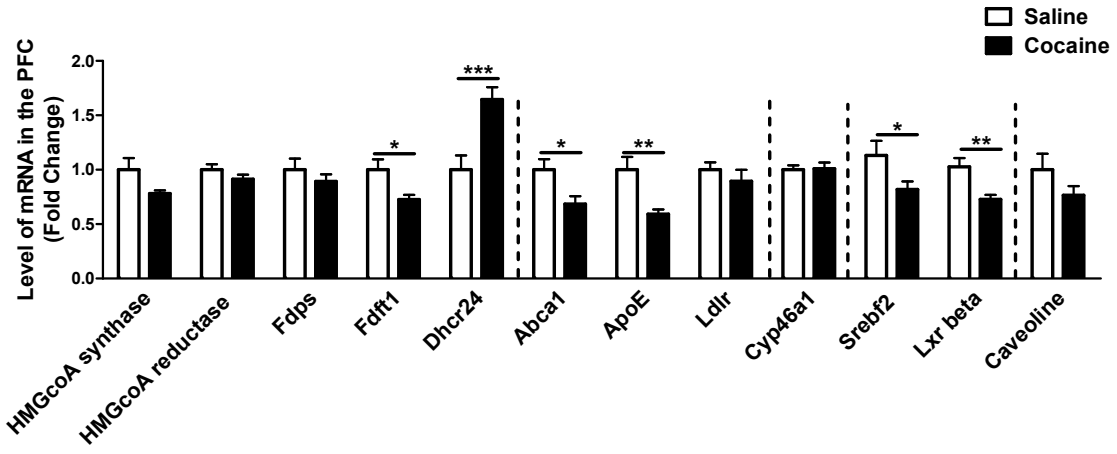


Fig 5. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the PFC in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: PFC: Prefrontal cortex, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

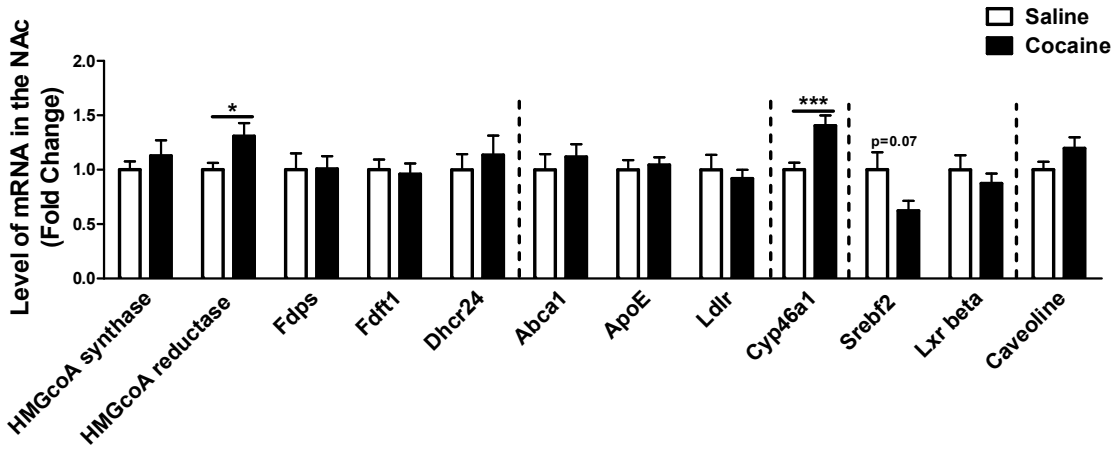


Fig 6. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the NAc in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: NAc: Nucleus accumbens, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

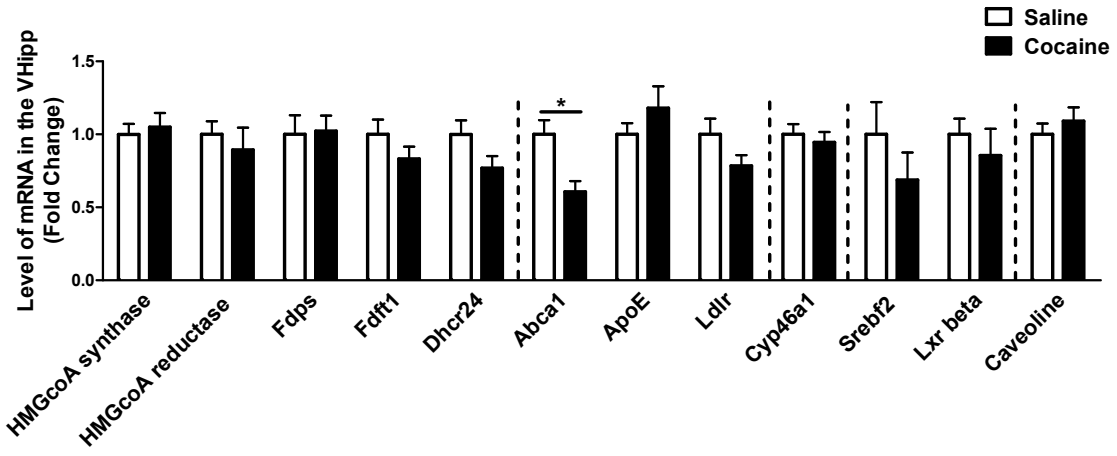


Fig 7. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the ventral hippocampus in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, $*p < 0.05$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: Vhipp: ventral hippocampus, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

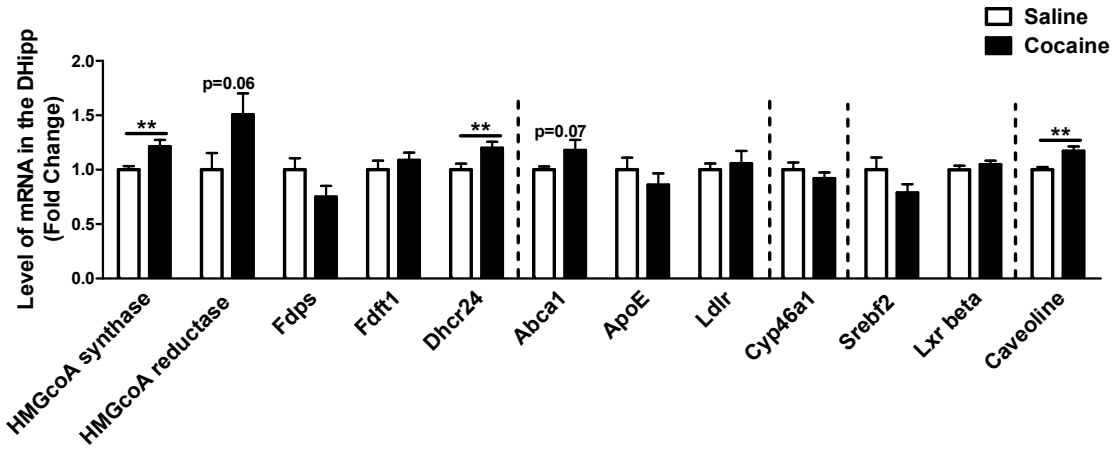


Fig 8. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the dorsal hippocampus in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: Dhipp: dorsal hippocampus, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

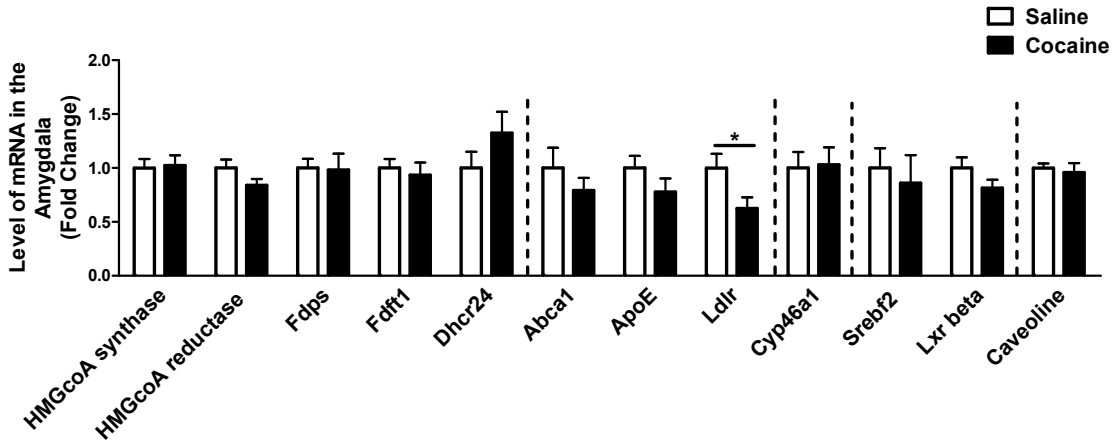


Fig 9. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the amygdala in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

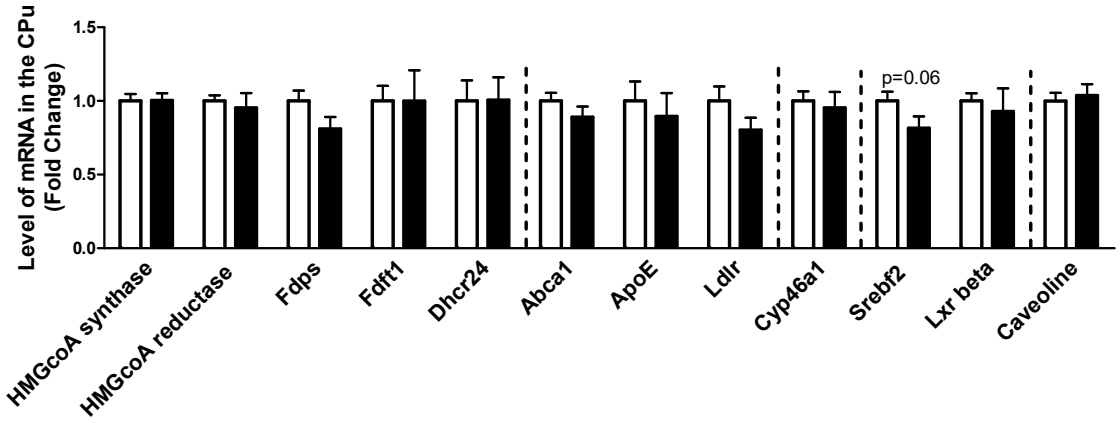


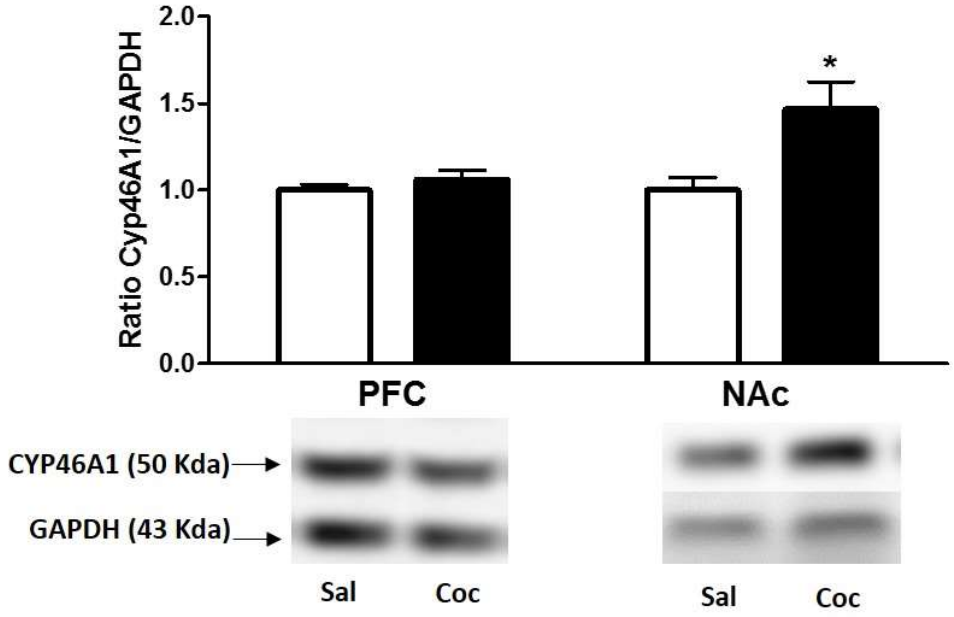
Fig 10. Changes in expression of genes involved in cholesterol metabolism in the caudate putamen in response to chronic treatment with cocaine. Expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol in rats exposed to repeated injections of cocaine or saline. Values represent the means ±SEM of $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine injected animals (n=15). Student *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ different from saline group. Dotted lines separate different group of genes by their functions.

Abbreviations: Cpu: caudate putamen, HMGCoA: 3-hydroxyl-3-methylglutaryl- coenzyme A, Fdps: farnesyl diphosphate synthase, Fdft1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1, Dhcr24: 24-dehydrocholesterol reductase, Abca1: ATP-binding cassette A1, ApoE: Apolipoprotein E, Ldlr: Low density lipoprotein receptor, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, Srebf2: sterol-regulatory element-binding factor, Lxr beta: liver X receptor type beta.

Supplementary data

Western blotting/Immunoblotting

Rat brain samples were homogenized by ultra-sonication in a 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) lysis solution (MOPS pH= 8.6, NP40 70%, Sodium pyrophosphate 100mM, NaCL 250mM, EGTA 3mM with PMSF 100x, NaF 1M, Na orthovanadate 0.2M, Protease inhibitors 100x). Samples were then heated to 90 °C for 5 min and centrifuged at 4 °C for 5 min (1000 g). Supernatants were collected and analyzed using a RC-DC protein assay kit (BioRad, France). Fifteen mg of proteins per sample were loaded on a pre-prepared SDS-page gel (BioRad, France), and then gels were transferred onto PVDF membrane using Transblot turbo transfer pack (BioRad, France) that were blocked with chemical blocking using iD blocking kit for western blot membrane (Eurogentec, France) for 5 minutes. Membranes were incubated with primary antibodies: rabbit polyclonal anti-CYP46A1 (1:1000) (Abcam), and mouse monoclonal anti-GAPDH 1:1000 (Millipore) diluted in a buffer containing Tris-Buffered Saline (TBS) solution containing 0.1% Tween-20 and 5% milk) for 2 h at room temperature. Several rinses were made (3 × 10 min) with TBS containing 0.1% Tween-20 before incubation for 1 h with appropriate secondary antibodies anti-rabbit or anti-mouse peroxidase conjugated diluted in the same buffer. Membranes were revealed using the ECL chemiluminescent reaction (Millipore). Membranes analyzed using Genesys Imaging system (Syngene). Genetools for Syngene software was used for quantification. GAPDH signal was used to normalize CYP46A1 signal, in order to avoid loading artifacts.



Supplementary figure 1. Changes in protein levels of CYP46A1 in the PFC and NAc in response to chronic treatment with cocaine. Values represent the means ±SEM the ratio CYP46A1/GAPDH normalized to the control group. White bars correspond to saline injected animals (n=15) and black bars correspond to cocaine treated animals (n=15). Student *t*-test, **p* < 0.05 different from saline group.

Abbreviations: PFC: Prefrontal cortex, Nac: Nucleus accumbens, Cyp46a1: 24S cholesterol hydroxylase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Supplementary Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR (for, forward primers; rev, reverse primers).

Genes	Accession number	Primers	Ref used
HMGCoA synthase *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*	NM_017268.1	For :ATCGCGTTTGGTGCCTGAAG	
		Rev: AAGGGCAACGATTCCCACAT	
HMGCoA reductase *Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*	NM_013134.2	For: GGTGCATCGCCATCCTGTAC	
		Rev: GCTGACGCAGGTTCTGGAA	
Fdft1 *Farnesyl diphosphate farnesyl transferase*	NM_019238.2	For: ACCAACGCCCTACAACACAT	
		Rev: GTAACTGCTTGCCCCTTCC	Caimari et al., 2010
Fdps *Farnesyl diphosphate synthase*	NM_031840.1	For: TCAGTGTCTGCTACGAGCC	
		Rev: TCGTACTTGAAGAACACACTCC	Yuan et al., 2016
Abca1 *ATP binding cassette A1*	NM_178095.2	For: GGTAGTGTGGCCACTTTCGT	Fernández-Pérez et al., 2014
		Rev: TCTGGGCCTGATGAAAAATC	
ApoE *Apolipoprotein E*	J00705	For: TCCATTGCCTCCACCACAGT	
		Rev: GGGCGTAGGTGAGGGATGA	
Ldlr *Low Density lipoprotein receptor*	NM_175762.2	For: TTCTTCAGGTTGGGGATCAG	Fernández-Pérez et al., 2014
		Rev: CAGCTCTGTGTGAACCTGGA	
Dhcr24 *24-Dehydrocholesterol reductase*	NM_001080148.1	For: TAGAGCCCAGCAAGCTGAAT	
		Rev: ATCCAGCCAAAGAGGTAGCG	
CYP46A1 *24S cholesterol hydroxylase*	NM_001108723.1	For: GTGCCACCATCGACATCCTG	
		Rev: GGTGTTACGGGACGCACTGATAC	Ishikawa et al., 2016
Srebf2 *Sterol regulatory element-binding protein-2*	NM_001033694.1	For: GTCCTCACCTTCCTGGGTCT	
		Rev: CAGCAGTAGAGTCGGCATCA	Caimari et al., 2010
Lxr Beta *Liver X receptor beta*	NM_031626.1	For: TGAAGGCATCCACCATCGAG	
		Rev: CGTGATGCACTCTGTCTCGT	
Caveolin 1	NM_031556.3	For: GCTTCACCACCTTCACTG	
		Rev: GATGCACGGTACAACTGC	Xu et al., 2016
Gapdh *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*	NM_017008.4	For: ATGGGAAGGTCGGTGTGAAC	
		Rev: ACTCCACGACATACTCAGCAC	
ActB *Actin beta*	NM_031144.3	For: GGAGAAGATTTGGCACCAC	
		Rev: AGGCATACAGGGACAACAC	
Hprt1 *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*	NM_012583.2	For: TGGTCAAGCAGTACAGCCCC	
		Rev: TAGTGGCCACATCAACAGGA	

REFERENCES

Alsebaaly, J., Dugast, E., Favot, L., Rabbaa Khabbaz, L., Solinas, M., and Thiriet, N. (2018). Persistent Neuroadaptations in the Expression of Genes Involved in Cholesterol Homeostasis Induced by Chronic, Voluntary Alcohol Intake in Rats. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 457. doi:10.3389/fnmol.2018.00457.

Beffert, U., Stolt, P. C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J. Lipid Res.* 45, 403–409. doi:10.1194/jlr.R300017-JLR200.

Beveridge, T. J. R., Smith, H. R., Daunais, J. B., Nader, M. A., and Porrino, L. J. (2006). Chronic cocaine self-administration is associated with altered functional activity in the temporal lobes of non human primates. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3109–3118. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04788.x.

Björkhem, I., Meaney, S., and Fogelman, A. M. (2004). Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. doi:10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b.

Boudreau, A. C., and Wolf, M. E. (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 25, 9144–51. doi:10.1523/JNEUROSCI.2252-05.2005.

Brachet, A., Norwood, S., Brouwers, J. F., Palomer, E., Helms, J. B., Dotti, C. G., et al. (2015). LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J. Cell Biol.* 208, 791–806. doi:10.1083/jcb.201407122.

Brodie, M. S., and Dunwiddie, T. V. (1990). Cocaine effects in the ventral tegmental area: Evidence for an indirect dopaminergic mechanism of action. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 342, 660–665. doi:10.1007/BF00175709.

Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., and Palou, A. (2010). Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1127–1133. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.10.001.

Chauvet, C., Nicolas, C., Lafay-Chebassier, C., Jaber, M., Thiriet, N., and Solinas, M. (2016). Statins reduce the risks of relapse to addiction in rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 1588–1597. doi:10.1038/npp.2015.317.

Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G., and Guizzetti, M. (2013). Cholesterol efflux is

differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 263–275. doi:10.1016/j.bbalip.2012.09.007.

Cotto, B., Natarajaseenivasan, K., Ferrero, K., Wesley, L., Sayre, M., and Langford, D. (2018). Cocaine and HIV-1 Tat disrupt cholesterol homeostasis in astrocytes: Implications for HIV-associated neurocognitive disorders in cocaine user patients. *Glia* 66, 889–902. doi:10.1002/glia.23291.

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5274–5278. doi:10.1073/pnas.85.14.5274.

Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* 390, 287–293. doi:10.1515/BC.2009.035.

Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2004). *Thematic review series: Brain Lipids.* Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397. doi:10.1194/jlr.R400004-JLR200.

Disterhoft, J. F., and De Jonge, M. (1987). Associative learning and long-term potentiation: cellular mechanisms compared. *Int J Neurol* 21–22, 172–183. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2980687.

Dos Santos, M., Salery, M., Forget, B., Garcia Perez, M. A., Betuing, S., Boudier, T., et al. (2017). Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biol. Psychiatry* 82, 806–818. doi:10.1016/j.biopsych.2017.03.014.

Egawa, J., Pearn, M. L., Lemkuil, B. P., Patel, P. M., and Head, B. P. (2016). Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J. Physiol.* 594, 4565–4579. doi:10.1113/JP270590.

Fernández-Pérez, L., Santana-Farré, R., de Mirecki-Garrido, M., García, I., Guerra, B., Mateo-Díaz, C., et al. (2014). Lipid profiling and transcriptomic analysis reveals a functional interplay between estradiol and growth hormone in liver. *PLoS One* 9, e96305. doi:10.1371/journal.pone.0096305.

Fracassi, A., Marangoni, M., Rosso, P., Pallottini, V., Fioramonti, M., Siteni, S., et al. (2019). Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr. Neuropharmacol.* 17, 59–83.

doi:10.2174/1570159X15666170703101816.

Goritz, C., Mauch, D. H., and Pfrieger, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 190–201. doi:10.1016/j.mcn.2005.02.006.

Gu, H., Salmeron, B. J., Ross, T. J., Geng, X., Zhan, W., Stein, E. A., et al. (2010). Mesocorticolimbic circuits are impaired in chronic cocaine users as demonstrated by resting-state functional connectivity. *Neuroimage* 53, 593–601. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.066.

Hering, H., Lin, C., and Sheng, M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23, 3262–3271. doi:23/8/3262 [pii].

Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski, C. F., and Izumi, Y. (2016). 24(S)-Hydroxycholesterol protects the ex vivo rat retina from injury by elevated hydrostatic pressure. *Sci. Rep.* 6, 33886. doi:10.1038/srep33886.

Kalivas, P. W., and Duffy, P. (1990). Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5, 48–58. doi:10.1002/syn.890050104.

Kalivas, P. W., and Duffy, P. (1993). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J. Neurosci.* 13, 266–75. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423473.

Kalivas, P. W., and Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.* 16, 223–244. doi:10.1016/0165-0173(91)90007-U.

Kelley, B. J., Yeager, K. R., Pepper, T. H., and Beversdorf, D. Q. (2005). Cognitive impairment in acute cocaine withdrawal. *Cogn. Behav. Neurol.* 18, 108–112. doi:10.1097/01.wnn.0000160823.61201.20.

Ko, M., Zou, K., Minagawa, H., Yu, W., Gong, J. S., Yanagisawa, K., et al. (2005). Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 42759–42765. doi:10.1074/jbc.M509164200.

Kong, M. M. C., Hasbi, A., Mattocks, M., Fan, T., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2007). Regulation of D1 dopamine receptor trafficking and signaling by caveolin-1. *Mol. Pharmacol.* 72, 1157–1170. doi:10.1124/mol.107.034769.

Korade, Z., and Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.02.019.

Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., and Thomas, M. J. (2007). Cocaine Experience Controls Bidirectional Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 27, 7921–7928. doi:10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007.

Law, M., and Rudnicka, A. R. (2006). Statin Safety: A Systematic Review. *Am. J. Cardiol.* 97, 52C–60C. doi:10.1016/j.amjcard.2005.12.010.

Lecis, C., and Segatto, M. (2014). Cholesterol Homeostasis Imbalance and Brain Functioning : Neurological Dis- orders and Behavioral Consequences. *J. Neurol. Neurol. Disord.* 1, 1–14. doi:10.15744/2454-4981.1.101.

Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-Soboslay, A., Becker, K. G., Lowe, R., Huestis, M. A., et al. (2006). Transcriptional changes common to human cocaine cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 1. doi:10.1371/journal.pone.0000114.

Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., et al. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Sci.* 123, 595–605. doi:10.1242/jcs.060681.

London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., et al. (1990). Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 567–574. Available at: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=2350209.

Lu, H., Cheng, P. lin, Lim, B. K., Khoshnevisrad, N., and Poo, M. ming (2010). Elevated BDNF after Cocaine Withdrawal Facilitates LTP in Medial Prefrontal Cortex by Suppressing GABA Inhibition. *Neuron* 67, 821–833. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.012.

Lu, L., Grimm, J. W., Hope, B. T., and Shaham, Y. (2004). Incubation of cocaine craving after withdrawal: A review of preclinical data. *Neuropharmacology* 47, 214–226. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.027.

MacAskill, A. F., Cassel, J. M., and Carter, A. G. (2014). Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 17, 1198–1207. doi:10.1038/nn.3783.

Mahley, R. W. (2016). Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1305–1315. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307023.

Malinow, R., and Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 25, 103–26. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758.

Mendez, I. A., Montgomery, K. S., LaSarge, C. L., Simon, N. W., Bizon, J. L., and Setlow, B. (2008). Long-term effects of prior cocaine exposure on Morris water maze performance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 185–191. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.005.

Muñoz-Cuevas, F. J., Athilingam, J., Piscopo, D., and Wilbrecht, L. (2013). Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.* 16, 1367–1369. doi:10.1038/nn.3498.

Petrov, A. M., Kasimov, M. R., and Zefirov, A. L. (2016). Brain cholesterol metabolism and its defects: Linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae* 8, 58–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27099785.

Pfenninger, K. H. (2009). Plasma membrane expansion: A neuron's Herculean task. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 251–261. doi:10.1038/nrn2593.

Pierce, R. C., and Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res. Rev.* 25, 192–216. doi:10.1016/S0165-0173(97)00021-0.

Pollandt, S., Liu, J., Orozco-Cabal, L., Grigoriadis, D. E., Vale, W. W., Gallagher, J. P., et al. (2006). Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation induced by corticotropin-releasing factor at central amygdala glutamatergic synapses via CRF1, NMDA receptors and PKA. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1733–1743. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05049.x.

Robinson, T. E., Gorny, G., Mitton, E., and Kolb, B. (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39, 257–266. doi:10.1002/1098-2396(20010301)39:3<257::AID-SYN1007>3.0.CO;2-1.

Rozman, D., and Monostory, K. (2010). Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol. Ther.* 127, 19–40. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.03.007.

Schreurs, B. G. (2010). The effects of cholesterol on learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 1366–1379. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.04.010.

Segatto, M., Manduca, A., Lecis, C., Rosso, P., Jozwiak, A., Swiezewska, E., et al. (2014). Simvastatin treatment highlights a new role for the isoprenoid/cholesterol biosynthetic pathway in the modulation of emotional reactivity and cognitive performance in rats. *Neuropsychopharmacology* 39, 841–54. doi:10.1038/npp.2013.284.

Thiriet, N., Aunis, D., and Zwiller, J. (2000). C-fos and egr-1 immediate-early gene induction by cocaine and cocaethylene in rat brain: A comparative study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 914, 46–57. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05182.x.

Xu, L., Wang, L., Wen, Z., Wu, L., Jiang, Y., Yang, L., et al. (2016). Caveolin-1 is a checkpoint regulator in hypoxia-induced astrocyte apoptosis via Ras/Raf/ERK pathway. *Am. J. Physiol. Physiol.* 310, C903–C910. doi:10.1152/ajpcell.00309.2015.

Yuan, F., Wang, H., Tian, Y., Li, Q., He, L., Li, N., et al. (2016). Fish oil alleviated high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulating hepatic lipids metabolism and metaflammation: A transcriptomic study. *Lipids Health Dis.* 15. doi:10.1186/s12944-016-0190-y.

Tableau résumant les différents résultats

		CPF					Nac				
		Cocaïne				Alcool	Cocaïne				Alcool
		Aigu			Chronique	Chronique	Aigu			Chronique	Chronique
		1h	3h	6h			1h	3h	6h		
Synthèse	HmgCoA synthase	↗						↘	↘		
	HmgCoA réductase					↗				↗	
	Fdps					↘			↗		↗
	Fdft1				↘						↗
	Dhcr24				↗						
Transport	Abca1				↘	↘					↗
	Apo E				↘						
	Ldlr						↗				
Dégradation	CYP46A1	↗	↗			↘				↗	
Régulation	Srebf2				↘						↘
	LXR beta	↗			↘				↗		
Lipid rafts	Caveoline							↗	↗		

		Mésencéphale					Amygdale				
		Cocaïne				Alcool	Cocaïne				Alcool
		Aigu			Chronique	Chronique	Aigu			Chronique	Chronique
		1h	3h	6h			1h	3h	6h		
Synthèse	HmgCoA synthase										↘
	HmgCoA réductase										
	Fdps					↗					↘
	Fdft1					↗					
	Dhcr24										
Transport	Abca1										
	Apo E										
	Ldlr									↘	
Dégradation	CYP46A1					↘					
Régulation	Srebf2					↘					
	LXR beta										
Lipid rafts	Caveoline										

		Hippocampe Dorsale					Hippocampe ventrale				
		Cocaïne				Alcool	Cocaïne				Alcool
		Aigu			Chronique	Chronique	Aigu			Chronique	Chronique
		1h	3h	6h			1h	3h	6h		
Synthèse	HmgCoA synthase				↗						
	HmgCoA réductase										
	Fdps										
	Fdft1										
	Dhcr24				↗						
Transport	Abca1									↘	
	Apo E										
	Ldlr										
Dégradation	CYP46A1										
Régulation	Srebf2										
	LXR beta										
Lipid rafts	Caveoline				↗						

Résultats supplémentaires

Supplementary results: Effect of the modulation of the enzyme CYP46A1 in the prefrontal cortex on relapse to cocaine.

Introduction

The experiments performed in the first part of my thesis clearly show that administration of drugs of abuse alter the expression of genes involved in cholesterol metabolism in brain regions involved in addiction and relapse. Whereas these results support the idea that cholesterol may play a role in addiction, this support is only indirect. Thus, in the last part of my thesis, I have investigated the causal role between cholesterol metabolism and drug-related behavior. To this end, I have decided to use viral vector approaches to modulate the expression of genes involved in cholesterol metabolism directly in the brain during the abstinence phase and looked at the consequences of this manipulation on relapse test.

Choice of the region to be targeted

The anterior cingulate cortex is one of the main brain regions involved in addiction (Garavan and Hester, 2007; Kalivas and Volkow, 2005; Schoenbaum and Shaham, 2008). This structure is known to mediate cognitive function related to goal-directed behavior (Rushworth et al., 2007) and is reactive to drug cues in animals (McLaughlin and See, 2003; Neisewander et al., 2000). In addition, cognitive functions that are mediated by this region appear to be impaired in addicts (Aron and Paulus, 2007; Garavan and Hester, 2007). Importantly, misuse of cocaine, cannabis and phencyclidine have been found to be associated with alterations in the expression of genes implicated in cholesterol metabolism in the cortex of cocaine abusers (Lehrmann et al., 2006). These results suggest that cholesterol metabolism in the prefrontal cortex may be particularly important in addiction.

Choice of the gene to be targeted

A previous study found that brain-penetrating statins reduce drug seeking to cocaine (Chauvet et al., 2016). Since statins blocks the main enzyme responsible for cholesterol synthesis, these results suggest that decreasing cholesterol in the brain may have beneficial effects in cocaine addiction and relapse. We hypothesized that reducing cholesterol levels in the brain by enhancing its degradation, by overexpressing the CYP46A1, the main enzyme involved brain degradation would also have beneficial effects on relapse to addiction.

CYP46A1 is a microsomal enzyme expressed almost exclusively in the brain in rats, but is also found in low levels in the liver and testes in mice (Lund et al., 1999). In the brain, this enzyme is localized at the membrane of the endoplasmic reticulum in cell bodies and dendrites of neurons, and is absent

from axons (Ramirez et al., 2008). CYP46A1 is strongly expressed in pyramidal neurons of the hippocampus and cortex, in Purkinje cells of the cerebellum, as well as in hippocampal and cerebellar interneurons (Ramirez et al., 2008).

The advantage of choosing CYP46A1 is that this gene has been already targeted in the context of brain disorder and therefore, quite a lot of practical and theoretical information about manipulation of this gene *in vivo* has been gathered. At the cellular level, overexpression of CYP46A1 increases dendritic outgrowth and density in spines and cause an increase in the expression of synaptic proteins in the synaptosomal fraction *in vivo* and *in vitro* (Moutinho et al., 2016). These morphological and molecular modifications are thought to be responsible for the improvement in the cognitive function observed *in vivo* in the CYP46A1 transgenic mouse (Maioli et al., 2013). At the functional level, decreases in CYP46A1 may play a role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Huntington's disease and overexpression of this enzyme has been proposed as a new therapeutic approach for these diseases. Indeed, Burlot et al. have shown that the injection of a viral vector encoding CYP46A1 into the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease (THY-Tau22 mice) is able to rescue cognitive deficits, as well as the alterations of the LTD (such as the attenuated late-phase long term depression) (Burlot et al., 2015). In addition, Boussicault et al. have shown that overexpression of CYP461 in the striatum reduces cholesterol content in lipid rafts in WT animals (Boussicault et al., 2018) and restore cholesterol and lanosterol levels in a murine model of HT (HT mouse). Such treatment produce a reduction of neuronal atrophy as well as of the number and size of mutant HTT aggregate and also an improvement of motor deficits (Boussicault et al., 2016) .

Choice of the time window to be targeted

In our study, we used a self-administration protocol followed by an injection of an AAV virus expressing the CYP46A1 in the anterior cingulate cortex and a 6-week period of abstinence, before rats were tested to relapse (see Figure 1 for schematic representation of the experimental protocol). This period correspond to a period in which incubation of craving is maximal (Lu et al., 2004). This period is also the same abstinence period during which statins where injected in our previous study (Chauvet et al., 2016). In addition, this time frame was expected to allow maximal expression of the gene after viral injection, which we confirmed in pilot experiments (data not shown).

Materials and methods

Animals

Male adult Sprague Dawley rats weighing 300 g at the beginning of the experiment (Janvier labs, France) were used in this study. All experiments were conducted during the light phase and in accordance with the European Union directives (2010/63/EU) for the care of laboratory animals and approved by the local ethics committee (COMETHEA). Upon arrival, rats were housed two by two in a controlled environment under a 12-h light/dark cycle (lights on at 8 a.m.) with food available ad libitum.

Self-administration protocol

After habituation to the animal facility (for one week), rats underwent intra-jugular vein catheterization surgery as previously described (Chauvet et al., 2009). After surgery, rats were housed individually for the rest of the study.

For operant behavior, we used MedAssociates experimental chambers equipped with retractable levers as operanda and controlled by Med PC IV software (MedAssociates Inc, www. med-associates.com). In these cages, retractable levers were placed on the same wall and were separated by a food tray. Illumination was provided by a white house light at all times, except during drug delivery and time-out periods. Rats were allowed to self-administer cocaine according to an FR1 schedule of reinforcement. Upon completion of the FR, rats received immediately intravenous injections of the drugs associated with the retraction of both levers, the light up of the cue light above the active lever, the blinking of the house light for 3s followed by an 8-s time-out. Rats were allowed to self-administer cocaine for 10 sessions (1 session of 6 hours per day).

Stereotaxic injection of AAVrh10- GFP and AAVrh10-CYP46A1

One-two days after the last self-administration session, rats were subjected to stereotaxic surgeries. All AAV vectors were produced and purified by Atlantic Gene therapies (Inserm U1089, Nantes, France). The viral constructs for AAVrh10-GFP and AAVrh10-CYP46A1-HA contained the expression cassette consisting of either the GFP or the human CYP46A1, driven by a CMV/b-actin hybrid promoter (CAG) surrounded by inverted terminal repeats of AAV2. The stereotaxic coordinates for the prefrontal cortex were: 1.2 and 1.7 mm rostral to the bregma, +/- 0.3 mm lateral to midline and 2.7 mm ventral to the skull surface. The overall number of injections was 4 injections, two injections in each hemisphere. The rate of injection was 0.1 microl/min with a total volume of 0.5 microl per injection (equivalent to 0.9 X 10^9 genomic particles/injection).

Test for relapse

After the stereotaxic injections, rats underwent forced abstinence in the animal facility. 6 weeks later, rats were tested for cocaine seeking during an extinction session divided in 6 intervals of 1-h. In this session, active lever presses produced the same stimuli (light and noise of the pump) that were previously associated with cocaine during self-administration sessions but reinforcers were not delivered. The number of active lever presses was used as a measure of cocaine seeking. The timeline of the experiment is represented in **Figure 23**.

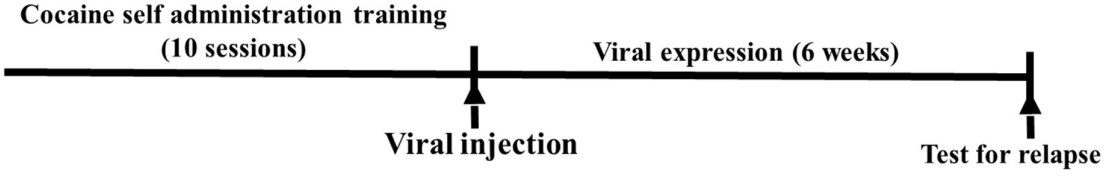


Figure 23 : Timeline of the experiment.

Tissue preparation for immunohistochemistry

One day after the test for relapse, rats were rapidly and deeply anaesthetized with pentobarbital (120 mg/kg, Dolethal® Vetoquinol France). Rats were then transcardially perfused with 4% paraformaldehyde dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). Brains were then removed and stored in 30% sucrose at 4°C until sectioning. All serial brain sections (40 µm) were then cut using a freezing microtome (Leica RM2145, www.leica-microsystems.com) and stored in cryo-protective solution (glycerol 20%, DMSO 2%, NaCl 0.9%, PB 0.1 M) at −20°C until processed for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Free-floating sections obtained from injected rats were processed for HA and GFP protein detection. Sections taken for the prefrontal cortex from +2.7 to +0.2 mm from bregma were submitted to immunolabeling. Sections were initially washed extensively in phosphate buffered saline (PBS) (3×10 minutes), incubated for 30 min with oxygen peroxidase (0,3%) then washed again in phosphate buffered saline (PBS) (3×10 minutes), then incubated for 2 hours in blocking solution (PBS containing 3% bovine serum albumin [Sigma-Aldrich] and 0.3% Triton X-100). Subsequently, sections were incubated for 24 hours at room temperature with primary antibodies diluted in the blocking solution: a rabbit polyclonal anti-HA antibody (1:1000, H6908, Sigma-Aldrich) or a rabbit polyclonal anti-GFP antibody (1:1000, A6455, Thermofisher). For 3,3’ diaminobenzidine staining, the sections were then incubated with goat anti-rabbit biotinylated antibody (1:400, BA1000, Vector Laboratories Inc.) for one hour and visualized by the ABC amplification system (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) and 3,3’-diaminobenzidine tetrahydrochloride (peroxidase substrate kit, DAB, Vector Laboratories) as

the substrate. Finally, sections were mounted onto gelatin-coated slides, dried, and dehydrated before cover slipping.

Immunofluorescence

Free-floating sections obtained from injected rats were processed for HA and GFP protein detection. Sections were initially washed extensively in phosphate buffered saline (PBS) (3×10 minutes) then incubated for 2 hours in blocking solution (PBS containing 3% bovine serum albumin [Sigma-Aldrich] and 0.3% Triton X-100). Subsequently, sections were incubated for 24 hours at room temperature with primary antibodies diluted in the blocking solution: a rat monoclonal anti-HA antibody (1:1000, 11867423001, Roche), a rabbit polyclonal anti-CYP antibody (1:200, 82814, Abcam), a mouse anti-NeuN antibody (1:1000, MAB377, Millipore). Sections were then washed in PBS (3×10 minutes) and incubated for one hour at room temperature with secondary antibodies diluted in the blocking solution: donkey anti-rat coupled to AlexaFluor488 (1:500, A21208, Thermofisher) , donkey anti-rabbit coupled to AlexaFluor 568 (1:500, A10042, Thermofisher), donkey anti-mouse coupled to AlexaFluor 647 (1:500, A31571, Thermofisher). Sections were rinsed in PBS (3×10 minutes) then incubated with DAPI (1/1000, Sigma D09542) for 10 minutes. Sections were rinsed in PBS (2×10 minutes) and with a phosphate buffer (0.1 M, 10 minutes). Finally, sections were mounted onto gelatin-coated slides, dried, and dehydrated before cover slipping.

Image acquisition

Immunofluorescent images were acquired with the Axio Imager M2 microscope with Apotome.2 (Carl Zeiss) (×20). DAB images were acquired with Zeiss Axio Zoom.V16-Stereo Zoom microscope.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5. All data are represented as mean SEM. For behavioral studies, a two-way ANOVA analysis corrected by the post hoc Bonferroni was performed with time and treatment as independent factors. Differences were considered significant when $P<.05$

Results

Cocaine training

During self-administration training, rats increased the number of cocaine injections from 24 at day 1 to 88 injections per session at day 10 **(Figure 24 a-b)**. Active lever presses also increased, whereas inactive lever presses rapidly decreased **(Figure 24 a)**.

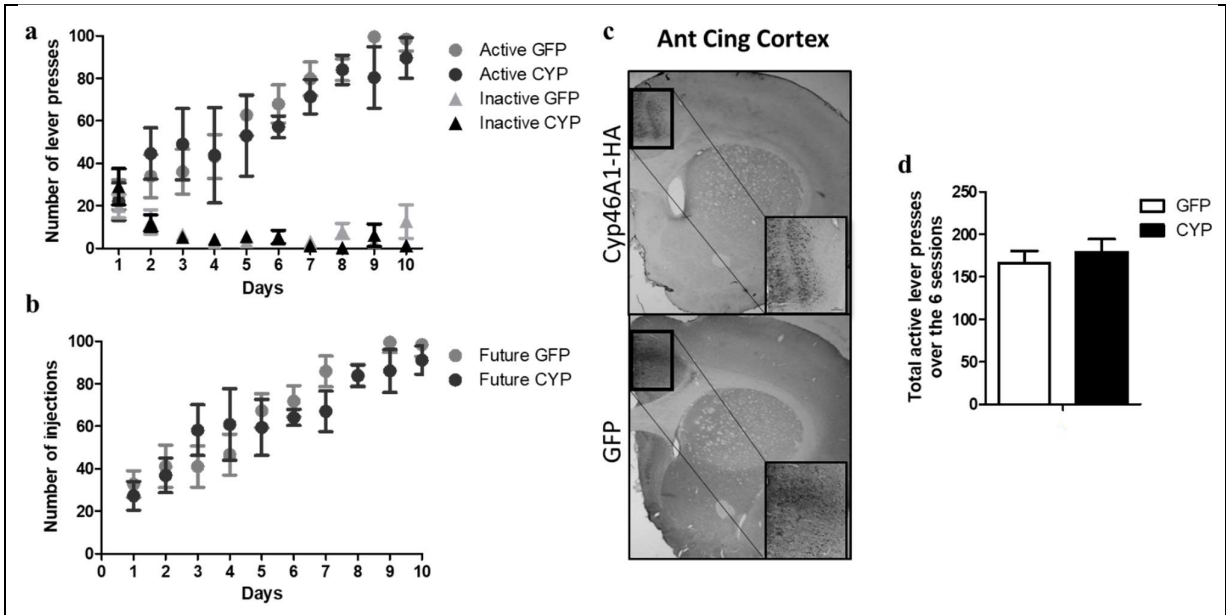


Figure 24 : Injection of AAVrh10-CYP46A1-HA in the Ant Cing cortex during the withdrawal period does not affect cocaine-seeking behavior.

(a) Cocaine self-administration training. Data are expressed as mean±SEM of active lever presses during the 6 h of daily self-administration sessions (N=5). During training, active lever presses were reinforced according to an FR1 schedule. (b) Cocaine self-administration training. Data are expressed as mean±SEM of injections during the 6 h of daily self-administration sessions (N=5). (c) DAB staining from Ant Cing cortex injected with AAVrh10-CYP46A1-HA (top) and AAVrh10-GFP (bottom). (d) Drug seeking after viral injection of AAVrh10-CYP46A1-HA. Tests were performed 6 weeks after viral injection. Data are expressed as mean ±SEM of the total responses on the active lever during the six 1h extinction sessions.

Overexpression of CYP46A1 in the PFC does not affect relapse in rats.

There was no significant difference in the number of injections between the group injected with AAVrh10 encoding CYP46A1-HA and the control GFP group **(Figure 24 a)**. Six weeks after the viral injections, drug seeking was measured as the numbers of active levers presses during the 6h of drug seeking. There was no significant difference between the number of active lever presses in the CYP animals compared to the GFP control animals **(Figure 24 d)**.

Viral expression placement was assessed using DAB immunostaining. As shown in figure 24, the virus encoding CYP or GFP was in the right place in the anterior cingular cortex. Co-labelling of HA (used as a tag for the CYP virus) and NeuN immunostaining shows a co-localization (merge panel) in CYP injected neurons **(Figure 25)**. This shows that the virus is expressed in neurons of the anterior cingular cortex.

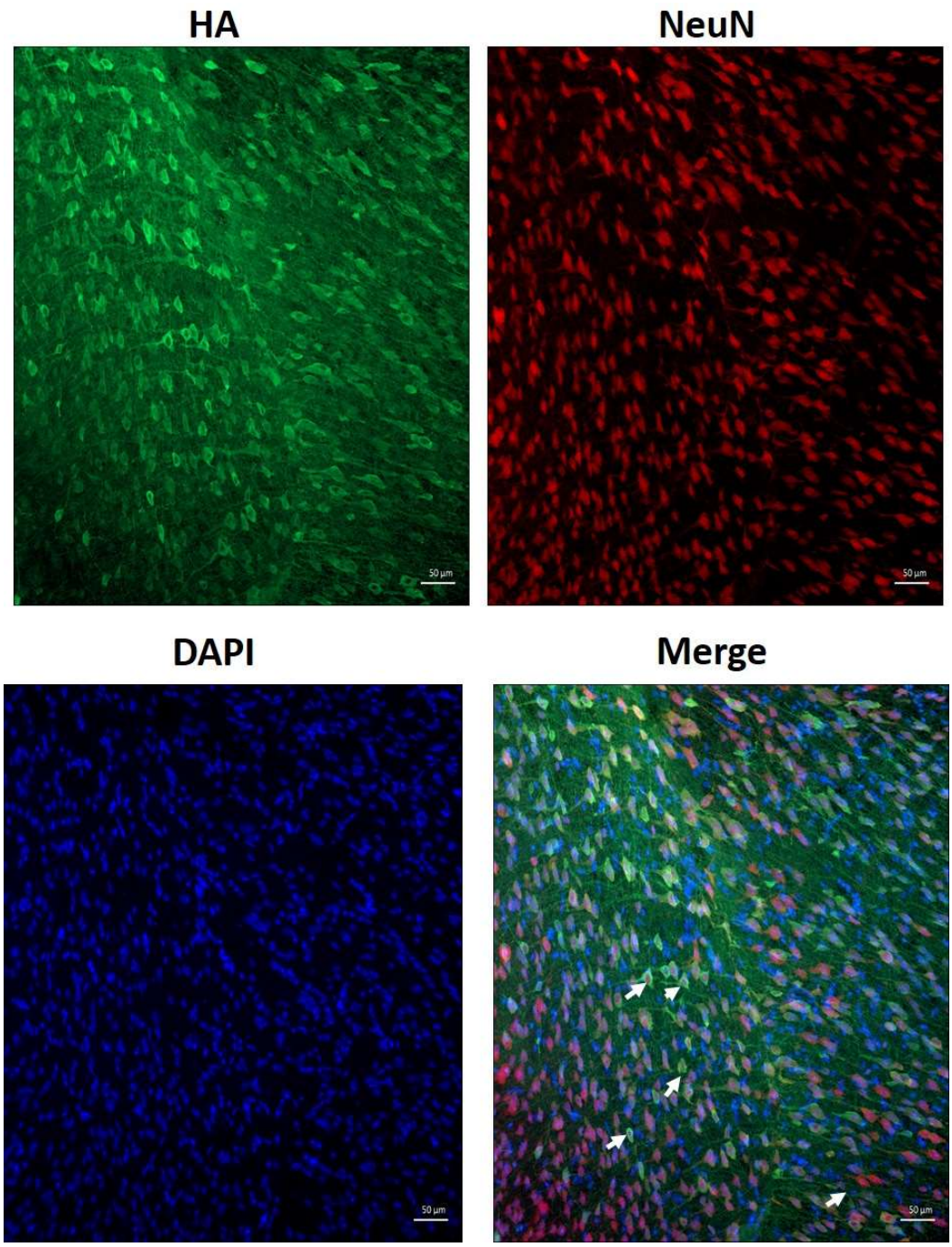


Figure 25:Representative examples of immunostaining obtained at the level of the anterior cingulate cortex of rats injected with the virus AAVrh10-CYP46A1-HA.

HA Immunolabeling (green); NeuN immunolabeling (red), DAPI(blue). White arrows indicate neurons that express both the HA and NeuN. Scale bars = 50 µm.

Discussion

In this work, we investigated the effect of overexpressing CYP46A1 in the anterior cingulate on relapse to cocaine addiction. We found no significant difference in drug seeking between the animals injected with CYP46A1 compared to control GFP animals.

The reasons for the lack of effect of CYP46A1 overexpression on cocaine seeking in a relapse test could be multiple. First of all, the region that we targeted may not be the most relevant. We chose the anterior cingulate cortex (ACC) as the first target of our investigation based on two main elements known in the literature: 1) alterations in genes expressions in cholesterol metabolisms have been shown in this region in human addicts (Lehrmann et al., 2006) and 2) the ACC is one of main regions involved in relapse processes (Lasseter et al., 2010a). Concerning the first point, it should be noted that the study of Lehrmann et al only investigated gene expression in cortical regions (Lehrmann et al., 2006) which leaves it open the possibility that abnormal expression of genes implicated in cholesterol metabolism could also be found in other non-cortical regions. Importantly, we have found that cocaine administration alters the expression of genes involved in cholesterol homeostasis not only in the cortex but also in the NAc (see study 2). Concerning the second point, it should be noticed that relapse depends on the activity of several interconnected regions including other parts of the prefrontal cortex (notably the prelimbic and infralimbic cortex) and other subcortical regions such as the nucleus accumbens (Rebec and Sun, 2005). Therefore, it is possible that cholesterol metabolism in these regions may be more important for relapse. Indeed, we are currently investigating the effects of CYP46A1 overexpression in the NAc to determine whether manipulations of cholesterol metabolism in this limbic area could have anti-craving effects.

Another possibility is that overexpression in CYP46A1 does not alter the levels of cholesterol and its metabolites in a manner that leads to behavioral effects. As a matter of fact, cholesterol homeostasis is very tightly regulated and complex phenomenon and changes in the levels or in the activity of one enzyme could results in different and even opposite effects depending on the initial conditions. For example, Boussicault et al. have shown that overexpression of CYP461 produces different effects on cholesterol levels in the striatum of WT mice and of R6/2 Huntington's disease model mice (Boussicault et al., 2016). Indeed, in WT animals overexpression of CYP461 didn’t reduce cholesterol levels in the striatum (Boussicault et al., 2016), but reduced cholesterol content in lipid rafts (Boussicault et al., 2018). Conversely, in R6/2 Huntington mice (showing increased levels of cholesterol), overexpression of CYP461 normalized cholesterol levels (Boussicault et al., 2016). At the present moment, we do not know whereas levels of cholesterol are actually changed in cocaine exposed rats and we do not know if and how overexpression of CYP461 in the ACC alters the levels

of cholesterol and its metabolites. Indeed, the measures of cholesterol levels are planned in the future. If overexpression of CYP461 does not produce behavioral effects and does not alter cholesterol levels in the brain, we plan to target other genes in cholesterol metabolism.

Whereas we generally speak about cholesterol levels, in reality, functional changes could be obtained without overall changes in cholesterol levels. Indeed, cholesterol redistribution, rearrangement of lipid rafts and levels of active precursors and metabolites could all lead to functional neuroadapations and changes in behavior. For example, the anti-craving effects of statins (Chauvet et al., 2016) could be explained not only by reduction in cholesterol levels but also by reduction in the levels of isoprenoids such as farnesyl-PP and geranyl-PP, whose synthesis depends on the activity of HMGCo-A reductase, which is inhibited by statins. These compounds bind to small GTP-binding proteins and regulate their membrane anchoring and activation, and consequently processes such as cell signaling, receptors activity and spine formation (Hooff et al., 2010). Indeed, knocking out *HmgcoA reductase* in the brain would allow producing a statin-like effect and would allow testing this hypothesis. In addition, the effects of farnesylation could also be tested by using farnesyl transferase inhibitors that have been developed especially for cancer therapy (Appels, 2005). However, the limited information about the safety profile of these compounds may limit their translational interest.

In conclusion, although our first attempt to reduce relapse to cocaine by manipulation of brain cholesterol has failed, there are several experiments that we have planned and will produce a more complete understanding of the role of cholesterol in drug addiction.

Discussion générale

L'addiction est une maladie neuropsychiatrique caractérisée par des neuroadaptations persistantes pouvant être responsable de l'apparition des épisodes de rechute (Shaham and Hope, 2005). Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle du cholestérol dans ces adaptations. Tout d'abord, comme exposé dans l'introduction, un rôle du cholestérol dans les processus neuroadaptatifs cérébraux a été démontré dans plusieurs pathologies cérébrales (Petrov et al., 2016) ou encore dans le cadre de processus de plasticité synaptique (Koudinov and Koudinova, 2001). Dans le cas de l'addiction, notre laboratoire a aussi mis en lumière une potentielle implication du cholestérol. En effet, une étude antérieure utilisant les statines a permis de montrer que ces dernières lorsqu'elles sont administrées pendant l'abstinence, pouvaient prévenir le phénomène de rechute chez des rats rendus dépendants à la cocaïne et à la nicotine (Chauvet et al., 2016). Les statines présentent plusieurs mécanismes d'action mais l'une de leur cible principale est la HMGCoA réductase, qu'elles inhibent (Rozman and Monostory, 2010). L'ensemble de ces résultats nous a conduit à proposer que le cholestérol pourrait jouer un rôle dans les neuroadaptations induites par les drogues et conduisant à l'addiction. Pour étudier cette hypothèse, nous avons développé deux approches. Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche de transcriptomique (RT-PCR) afin de déterminer si des changements d'expression de certaines protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol dans le cerveau pouvaient être induits par deux drogues : l'alcool et la cocaïne. Cette étude a été menée dans plusieurs structures cérébrales impliquées dans l'addiction. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé une approche virale, permettant de sur-exprimer la CYP46A1, et avons étudié l'impact de cette sur-expression dans le cortex préfrontal, et plus précisément dans le cortex cingulaire antérieur (ACC) sur la recherche de drogue et la rechute chez des rats s'étant auto-administrés de la cocaïne.

Notons tout d'abord que, comme détaillé dans l'introduction de cette thèse (cf chapitre 2), l'alcool et la cocaïne ont des mécanismes d'action très différents. L'alcool agit principalement au niveau des systèmes glutamatergiques et gabaergiques, ce qui entrainent des conséquences dans le système dopaminergique, telles qu'une augmentation de la neurotransmission dopaminergique au sein de différentes structures du système mésocorticolimbique (Gilpin and Koob, 2008). L'action indirecte de l'alcool sur le système dopaminergique serait responsable des effets récompensants de cette drogue. La cocaïne, quant à elle, agit directement sur le système dopaminergique en bloquant la recapture de la dopamine (Hall et al., 2004). Cette différence dans leur mécanisme d'action pourrait en partie expliquer les différences d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol obtenues De plus, l'exposition à l'alcool était une exposition volontaire car les rats avaient le choix entre deux bouteilles (alcool et eau), alors que l'exposition chronique à la cocaïne était une exposition imposée par l'expérimentateur (administration répétée par voie intra-péritonéale). Cette différence

dans les protocoles d'exposition pourrait également expliquer les différences obtenus dans les résultats (Jacobs et al., 2003).

Notons également que deux protocoles différents ont été utilisés pour la cocaïne, un traitement aigu d'une part et un traitement chronique d'autre part. Le traitement aigu avait pour but principal d'établir une « time-course » des effets directs et pharmacologiques de la cocaïne. Ainsi, nous avons montré que la cocaïne a des conséquences rapides sur le métabolisme du cholestérol, potentiellement directement stimulées par l'action de la cocaïne au sein des systèmes de neurotransmetteurs (ces aspects ont été discutés dans l'article 2 de la thèse et ne seront pas repris ici). Le traitement chronique associé à une période de sevrage avait pour but quant à lui, d'étudier les effets durables induits par la cocaïne sur ce métabolisme et susceptible de participer à l'addiction et en particulier à la rechute. Ce sont ces derniers qui seront comparés avec ceux de l'alcool et discutés dans ce qui suit.

I. Modulation du métabolisme du cholestérol par les drogues d'abus dans le CPF et implication possible dans l'addiction

1. Régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol par la cocaïne et l'alcool dans le CPF

Au niveau du CPF, une diminution de l'expression du gène du transporteur du cholestérol *Abca1* a été montrée suite à des expositions chroniques à l'alcool et à la cocaïne, chacune suivie de 3 semaines d'abstinence **(Figure 25)**. L'exposition chronique à la cocaïne a aussi induit une diminution de l'expression de l'*ApoE*, une protéine qui lie le cholestérol et le transporte vers les neurones suite à son passage à travers le transporteur ABCA1. Nos résultats indiquent alors que les drogues d'abus diminueraient globalement les échanges cellulaires de cholestérol dans cette structure.

Dans notre étude, l'exposition chronique à l'alcool a aussi augmenté l'expression de la *HmgcoA réductase*, enzyme qui appartient à la voie du mévalonate et a diminué l'expression de l'enzyme de dégradation du cholestérol, la *CYP46A1* **(Figure 26)**. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude post- mortem réalisée chez l'homme, qui montre que l'exposition chronique à plusieurs drogues d'abus tels que la cocaïne, le cannabis et la phencyclidine conduit à des adaptations transcriptionnelles dans le métabolisme du cholestérol dans le cortex (Lehrmann et al., 2006). Notamment, ces travaux ont montré une augmentation de l'expression de la *Fdft1*, l'*Apol2* et la *Scarb1* impliqués respectivement dans la synthèse, le transport et la régulation du cholestérol (Lehrmann et al., 2006). Bien que les gènes spécifiquement altérés chez l'Homme et chez le rat soient différents. Ces résultats confirment l'idée que l'exposition chronique aux drogues d'abus altère l'expression des gènes

impliqués dans la voie du métabolisme cholestérol cérébral au niveau du CPF. Cette altération est spécifique de la drogue en question et peut persister même après une longue période d'abstinence.

2. Rôle potentiel du cholestérol dans les neuroadaptations observées dans le CPF

Le CPF est une structure appartenant au système mésocorticolimbique et recevant des afférences dopaminergiques (Goldstein and Volkow, 2011). Cette structure joue un rôle dans la régulation des processus cognitifs, émotionnels et motivationnels (Granon and Poucet, 2000). En effet, la transition vers l'addiction serait liée à des neuroadaptations induites par les drogues dans cette structure, qui produiraient une perte de contrôle de la consommation de la substance et des déficits dans la prise de décision (Goldstein and Volkow, 2011). Il est important de noter que la rechute dépend de l'activité de plusieurs régions interconnectées, notamment des parties du cortex préfrontal (le cortex pré-limique et infralimbique) et des régions sous-corticales comme le NAc (Rebec and Sun, 2005). Les changements observés dans le cortex peuvent être dus à l'incubation du craving, phénomène qui apparait après le sevrage et responsable de l'apparition d'épisodes de rechute (Grimm et al., 2001). Ce phénomène serait accompagné par une augmentation de l'expression du transporteur DAT dans cette structure après une période d'abstinence faisant suite à une exposition chronique à la cocaïne (Grimm et al., 2002). L'expression du DAT au niveau membranaire est conditionnée par le taux de cholestérol au niveau membrannaire (Jones et al., 2012; Zeppelin et al., 2018). Ceci pourrait alors nous amener à déduire que le cholestérol pourrait jouer un rôle dans l'incubation du craving au niveau de cortex préfrontal observé suite à l'exposition chronique aux drogues d'abus. Par ailleurs, une exposition chronique à l'alcool induit une LTP au niveau du CPFm (Kroener et al., 2012). Une étude de Brachet et al a montré que lors d'une LTP, une perte du cholestérol globalement ou dans la membrane est observée. Cette perte au niveau du cholestérol pourrait activer sa synthèse (Burg and Espenshade, 2011). Dans nos résultats, au niveau du CPFm, une augmentation de l'expression de la *HmgcoA réductase* dans le CPFm est observée suite à une exposition chronique à l'alcool (article 1). Cette augmentation pourrait être l'indicateur de l'activation de la synthèse du cholestérol au niveau de cette structure.

Tous ces résultats montrent que le cholestérol pourrait être impliqué dans les neuroadaptations au niveau du système dopaminergique et glutamatergique observées durant l'abstinence suite à l'exposition chronique aux drogues d'abus.

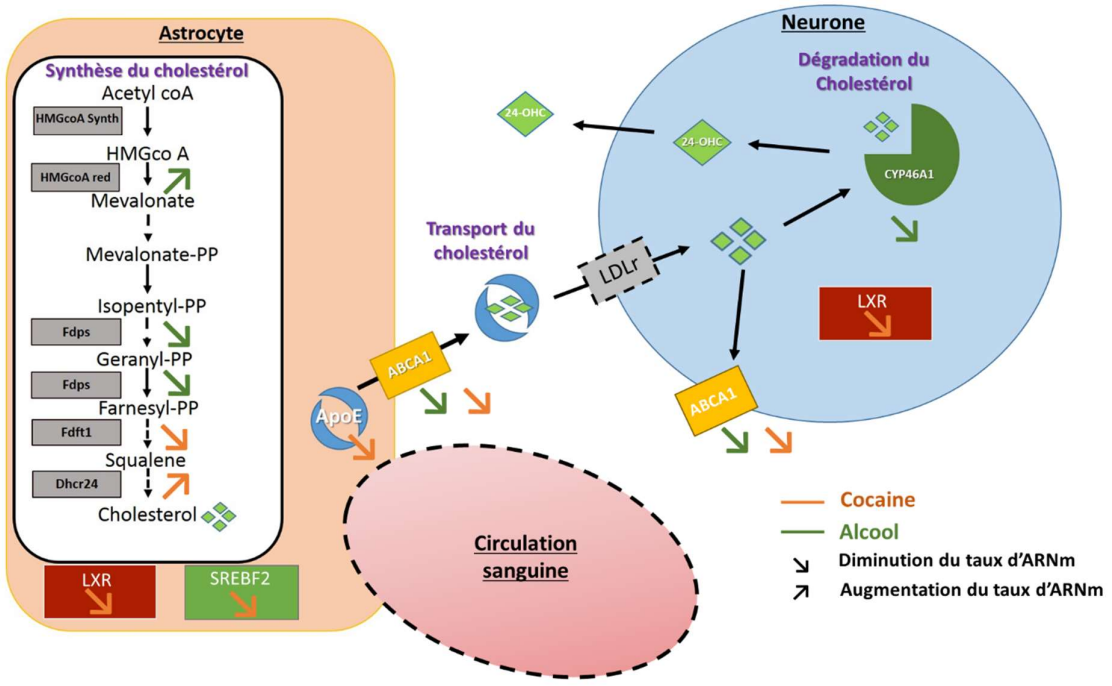


Figure 26 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau du CPF.

L'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne réduit l'expression du transporteur *Abca1* au niveau du CPF. Globalement, l'exposition chronique à ces deux drogues les drogues d'abus diminuent les échanges cellulaires de cholestérol dans cette structure.

3. Effet potentiel de l'altération du métabolisme du cholestérol au niveau du CPF sur l'addiction à la cocaïne et à l'alcool

Comme nous avons observés des adaptations transcriptionnelles au sein du métabolisme du cholestérol, nous avons recherché si la modulation de ce métabolisme pouvait avoir des conséquences sur l'addiction. Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas trouvé d'effet de la surexpression de la CYP46A1 au niveau de l'ACC sur le comportement de recherche de drogues (résultats supplémentaires). Ces résultats étaient discutés en détails dans la partie 3 des résultats de la thèse, donc nous nous focaliserons ici sur les implications potentielles dans l'addiction à l'alcool.

Plusieurs études sont envisagées pour évaluer l'effet de la surexpression de la CYP46A1 sur l'addiction à l'alcool.

a. Est-ce qu'une surexpression de la CYP46A1 avant l'exposition à l'alcool pourrait altérer la prise d'alcool ?

Comme nous avons observés une diminution de l'expression de la CYP46A1 au niveau du CPF en réponse à l'alcool **(Figure 26)**, nous allons étudier le rôle du cholestérol dans l'addiction à l'alcool plus directement. Dans ce but ; nous allons sur-exprimer la CYP46A1 dans l'ACC de rats avant toute exposition à l'alcool, et rechercher l'impact de cette surexpression sur la mise en place de la consommation excessive d'alcool. En effet, nos résultats indiquent que la mise en place de la consommation croissante d'alcool serait associée à une augmentation de la production de cholestérol via une augmentation de l'expression de l'enzyme le synthétisant. Ainsi, la surexpression de la CYP46A1 devrait contre-carrer ces effets en facilitant la dégradation du cholestérol néo-synthétisé.

b. Est-ce qu'une surexpression de la CYP46A1 durant la période d'abstinence pourrait altérer la recherche de la drogue dans un protocole d'AA ?

Comme l'exposition chronique à l'alcool engendre une diminution de l'expression de la *Cyp46A1* dans le CPF, sa surexpression suite à l'exposition à l'alcool devrait ramener son expression à un niveau supérieur. Ainsi, en envisageant un protocole comportant 1) une exposition intermittente à l'alcool, 2) une abstinence pendant laquelle le virus surexprimant la CYP46A1 sera injecté et 3) une administration opérante de l'alcool dans un protocole d'AA, il serait intéressant de déterminer si la modulation de la CYP46A1 et donc du métabolisme du cholestérol pendant l'abstinence pourrait conduire à des comportements de recherche de drogues différents chez les rats CYP par rapport au rats contrôles.

II. Modulation du métabolisme du cholestérol par les drogues dans le NAc et implication possible dans l'addiction

1. Régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol par la cocaïne et l'alcool dans le NAc

Au niveau du NAc, nos résultats obtenus en réponse aux deux drogues sont plus ou moins similaires. En effet, l'exposition chronique à l'alcool suivie de 3 semaines d'abstinence a conduit à une augmentation de l'expression du transporteur *Abca1* ainsi qu'à une diminution de celle de la protéine régulatrice *Srebf2*. Suite à ce traitement, nous avons aussi observé une augmentation de l'expression de la *Fdft1* et de la *Fdps*, codant deux enzymes qui participent à la voie de synthèse du cholestérol. Dans le cas de la cocaïne, nous avons observé une augmentation de l'expression de la *HmgcoA réductase*, étape limitante de la voie de synthèse du cholestérol, et de l'expression de la *Cyp46A1*, responsable de sa dégradation **(Figure 27)**. Une augmentation de l'expression de la *HmgcoA réductase*

a aussi été décrite dans le cadre de l'exposition chronique à l'alcool (Bell et al., 2009) dans le NAc. Globalement, ces études montrent que l'exposition aux drogues d'abus pourrait activer durablement la synthèse du cholestérol dans cette structure.

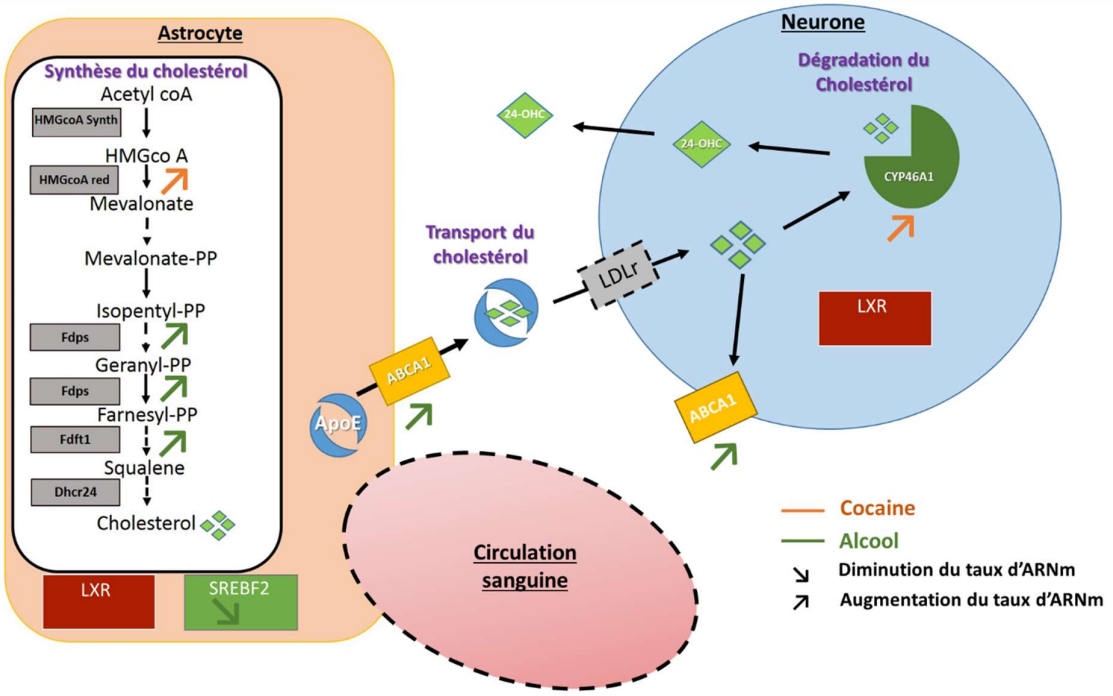


Figure 27 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau du NAc.

De façon globale, l'exposition chronique aux drogues d'abus pourrait activer la synthèse du cholestérol au niveau de cette structure

2. Rôle potentiel du cholestérol dans les neuroadaptations observées dans le NAc

Le NAc intègre les informations des structures corticales et limbiques afin de déclencher les comportements orientés vers un objectif (Di Chiara, 2002). L'exposition chronique à plusieurs classes de drogues d'abus entraine une plasticité dans cette région, permettant aux signaux associés à la drogue d'engendrer une motivation pathologique à rechercher les drogues (cf chapitre 2). Un certain nombre d'altérations de la transmission dopaminergique et glutamatergique ont été décrites dans le Nac après une longue période d'abstinence, comme par exemple une potentialisation de la transmission glutamatergique après des expositions chroniques à l'alcool ou à la cocaïne (Cf chapitre 2)(D'Souza, 2015). Ces neuroadaptations joueraient un rôle crucial dans la vulnérabilité à rechercher la drogue et donc à rechuter.

L'exposition chronique à la cocaïne affecte les niveaux du DAT dans différentes structures du système mésocorticolimbique, dont le NAc (Crits-Christoph et al., 2008). Des études montrent par ailleurs que les altérations au niveau d'expression des protéines du métabolisme du cholestérol pourraient être impliquées dans l'altération de la neurotransmission DA, en agissant sur la conformation et le fonctionnement du DAT (Vaughan and Foster, 2013). Il a ainsi été montré qu'une diminution du taux de cholestérol membrannaire (par traitement à la beta méthyl cyclo dextrine) diminue la capacité du DAT à capter la dopamine (Jones et al., 2012). De plus, une étude de microscopie en super résolution a montré que ce transporteur est séquestré au niveau des domaines riches en cholestérol au niveau pré synaptique et qu'une altération du taux de cholestérol peut affecter le recyclage de ce transporteur (Rahbek-Clemmensen et al., 2017). Une étude plus récente a montré qu'une diminution du cholestérol engendre une inactivation du transporteur par changement de sa conformation spatiale, et en présence du cholestérol, cette inactivation est inhibée (Zeppelin et al., 2018) par la suite affecter la transmission dopaminergique. De telles adaptations impliquant le cholestérol sont susceptibles de participer à la persistance du risque de rechute à la drogue en agissant sur le niveau d'activité du DAT. Toutes ces évidences suggèrent que les altérations de l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol observées dans nos études, pourrait participer à la mise en place des adaptations durables au sein la transmission dopaminergique induites par les drogues d'abus.

Pour ce qui concerne la neurotransmission glutamatergique, suite à des expositions chroniques à la cocaïne couplées une période d'abstinence, une augmentation du ratio AMPA/NMDA a été observée au niveau du NAc (Kourrich et al., 2007). Cette augmentation serait liée à une insertion de récepteurs AMPA du côté post synaptique (Boudreau and Wolf, 2005; Malinow and Malenka, 2002). Brachet et al. ont par ailleurs montré qu'une stimulation de type LTP induit une redistribution du cholestérol au niveau membranaire dans l'hippocampe, et il est envisageable que des mécanismes similaires se produisent dans le Nac. L'augmentation de l'expression du gène de l'*HmgcoA réductase*, que nous avons observée dans le Nac, pourrait être en lien avec une redistribution membranaire du cholestérol dans cette structure, qui conduirait à l'activation de la voie de synthèse par activation de la transcription de cette enzyme clé.

Pour répondre à certaines des questions soulevées par nos résultats, nous envisageons de compléter ce travail par des mesures des taux de cholestérol et ces métabolites dans les différentes structures en réponse à des expositions chroniques à des drogues, comme la cocaïne dans un premier temps. Ces mesures faisaient partie intégrante de mon projet de thèse et devaient être faites dans le cadre d'une collaboration qui n'a malheureusement pas été fructueuse, mais ces analyses devraient être réalisées dans le cadre d'un projet ANR qui sera resoumis dans les mois à venir.

3. Effet de l'altération du métabolisme du cholestérol au niveau du NAc sur l'addiction à la cocaïne et à l'alcool

Comme des expositions aux drogues a conduit à une activation durable de la synthèse du cholestérol, on peut alors se demander si l'altération du métabolisme du cholestérol au niveau du NAc, pourrait affecter l'addiction à la cocaïne. Dans cette étude, j'ai observé une augmentation de l'expression de la *CYP46A1* suite à l'exposition chronique à la cocaïne. Ainsi une surexpression de la CYP46A1 au niveau du NAc pourrait mimer l'effet de l'exposition chronique à la cocaïne sur le métabolisme du cholestérol et potentialiser l'effet de la cocaïne dans un protocole d'auto-administration. Ainsi, nous sommes actuellement en train d'étudier les effets de la surexpression de la CYP46A1 dans le NAc sur la recherche de drogue dans un protocole de rechute afin de déterminer si les manipulations du métabolisme du cholestérol dans cette région limbique pourraient moduler la recherche de drogue et le risque de rechute à la drogue.

III. Modulation du métabolisme du cholestérol dans d'autres structures et implication possible dans l'addiction

1. L'amygdale

L'amygdale est une structure qui participe au contrôle des processus émotionnels comme la peur et l'anxiété (Ressler, 2010). Un état émotionnel négatif de type anxiety-like est souvent décrit durant le sevrage suite à des expositions à la cocaïne et à l'alcool. Par exemple, dans le cas de l'alcool, cet état émotionnel négatif pourrait contribuer à stimuler la rechute de l'alcool chez les alcooliques (Willinger, 2002). L'amygdale joue également un rôle crucial dans la promotion de la consommation d'alcool (Koob, 2004).

Une altération du niveau de cholestérol pourrait jouer un rôle dans l'installation d'un état émotionnel négatif de type anxiety- like (Cartocci et al., 2017). L'anxiété observée durant l'abstinence , suite à des expositions chroniques à la cocaïne, est associée à une altération de la LTP au niveau de cette structure (Pollandt et al., 2006), qui pourrait être causée par une diminution des taux de cholestérol neuronaux. Dans l'amygdale, nos résultats suggèrent que les drogues d'abus diminuent le métabolisme de cholestérol en diminuant la synthèse dans le cas de l'alcool et en diminuant l'internalisation dans le cas de la cocaïne **(Figure 28)**. Ainsi, si les changements que nous avons observés au niveau de ces gènes se traduisent par des modifications au niveau protéique, ils pourraient contribuer au comportement anxieux observé durant l'abstinence suite à l'exposition chronique aux drogues d'abus.

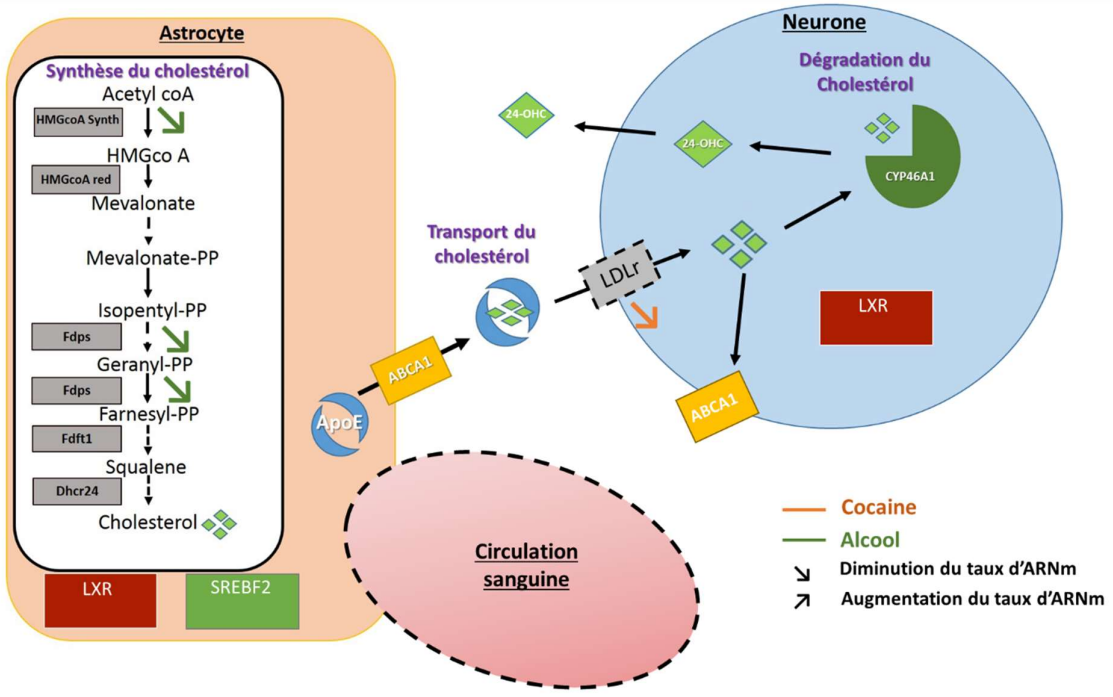


Figure 28 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool et à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'amygdale.

De façon globale, l'exposition chronique à ces deux drogues d'abus diminue le métabolisme du cholestérol au niveau de l'amygdale.

2. L'hippocampe

L'hippocampe a été associé à la fois au craving pour la cocaïne induit par le contexte (cue-induced cocaine craving (Atkins et al., 2008) et à l'acquisition et au traitement ultérieur de mémoires liées à la drogue (Kutlu and Gould, 2016). L'activation répétée de l'hippocampe induite par la cocaïne réduirait son activité et sa connectivité fonctionnelle à la fois en conditions basales, mais aussi lors de régulations cognitives et émotionnelles (Castilla-Ortega et al., 2016). Cette fonction hippocampique altérée pourrait alors contribuer aux altérations cognitives et émotionnelles fréquemment observées suite à l'exposition à la cocaïne, notamment les déficits de mémoire déclaratifs dépendant de l'hippocampe et l'anxiété accrue observée lors de l'abstinence (Castilla-Ortega et al., 2016). L'administration chronique de cocaïne entraîne également une altération de l'apprentissage spatial chez les rongeurs exposés à la cocaïne (Mendez et al., 2008). Les déficits d'apprentissage chroniques induits par la cocaïne semblent également être durables. Des études suggèrent que ces déficits induits par l'exposition chronique à la cocaïne persistent pendant une période de sevrage pouvant aller jusqu'à 3 mois (Kelley et al., 2005; Mendez et al., 2008). Dans la littérature, des études indiquent que, l'altération

du métabolisme cérébral du cholestérol serait associée à une altération des processus cognitifs tels que l'apprentissage (chapitre 3, partie III). En particulier, les processus de LTP impliqueraient des altérations du cholestérol dans cette structure (Brachet et al., 2015). Ceci pourrait indiquer que les changements que nous avons observés au niveau du métabolisme du cholestérol **(Figure 29)** peuvent être impliqués dans les processus cognitifs et surtout l'apprentissage. Tous ces résultats suggèrent que les changements du cholestérol observés peuvent être impliqués dans l'altération de l'apprentissage suite à des expositions chroniques aux drogues d'abus ainsi que durant l'abstinence.

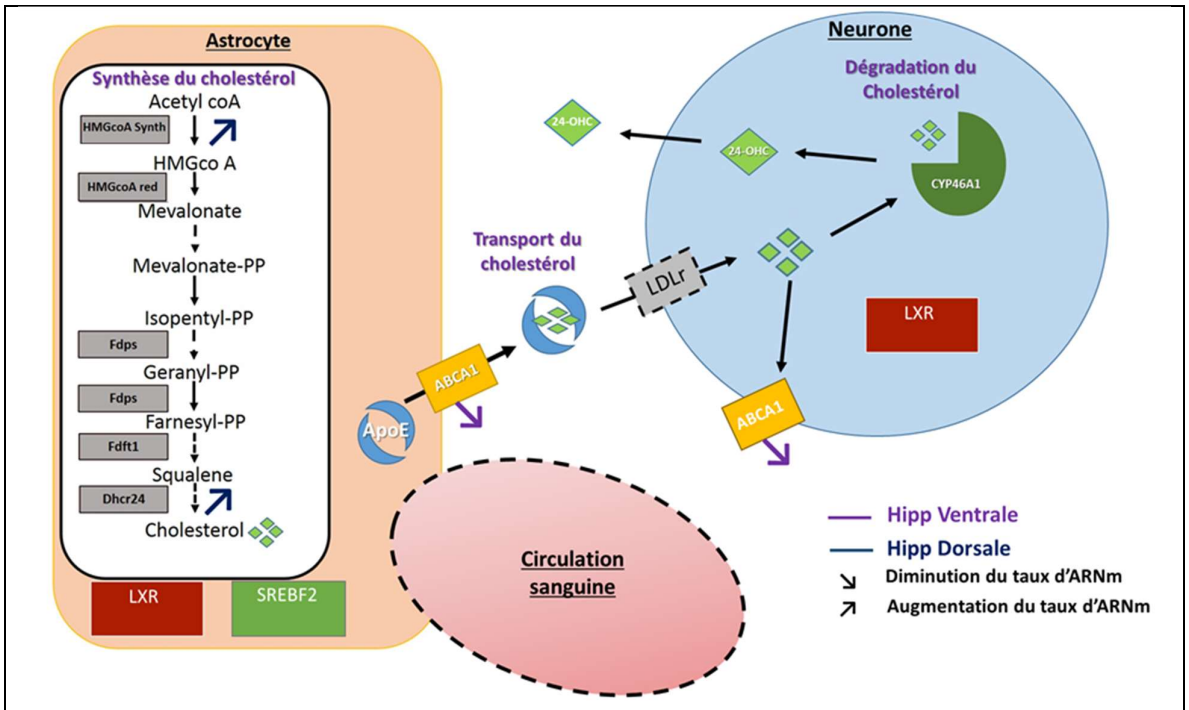


Figure 29 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à la cocaïne sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'hippocampe. Le traitement chronique à la cocaïne cause des altérations persistantes au niveau de l'hippocampe. Ces altérations sont spécifiques de chaque région de l'hippocampe.

3. L'aire tegmentale ventrale

L'ATV est l'aire cérébrale dans laquelle se trouvent les corps cellulaires des neurones DA, dont la stimulation conduirait à déclencher les neuroadaptations induites par les drogues d'abus dans des structures cibles. Cette structure est elle-même la cible d'un certain nombre de processus de la plasticité synaptique après des expositions chroniques à des drogues d'abus. A ce jour, nous n'avons étudié que les changements induits par l'alcool dans cette structure. Nos résultats montrent que l'exposition chronique à l'alcool suivi de 3 semaines d'abstinence produit une augmentation de l'expression des gènes codant deux protéines de la voie de synthèse du cholestérol (*Fdps* et F*dft1*) et une diminution de

l'expression du gène codant l'enzyme de dégradation, la *cyp46A1* **(Figure 30)**. Cela pourrait globalement conduire à une augmentation des taux de cholestérol dans cette structure. En revanche, une diminution dans le métabolisme est observée dans une étude McBride et al, qui ont retrouvé une diminution de l'expression de l' *HmgcoA réductase* et *synthase* suite à une exposition chronique à l'alcool (McBride et al., 2013). Une diminution de l'expression de la *Srebf1* a été observée dans la même étude, ce même effet est observé dans notre étude dans l'expression de la *Srebf2*.

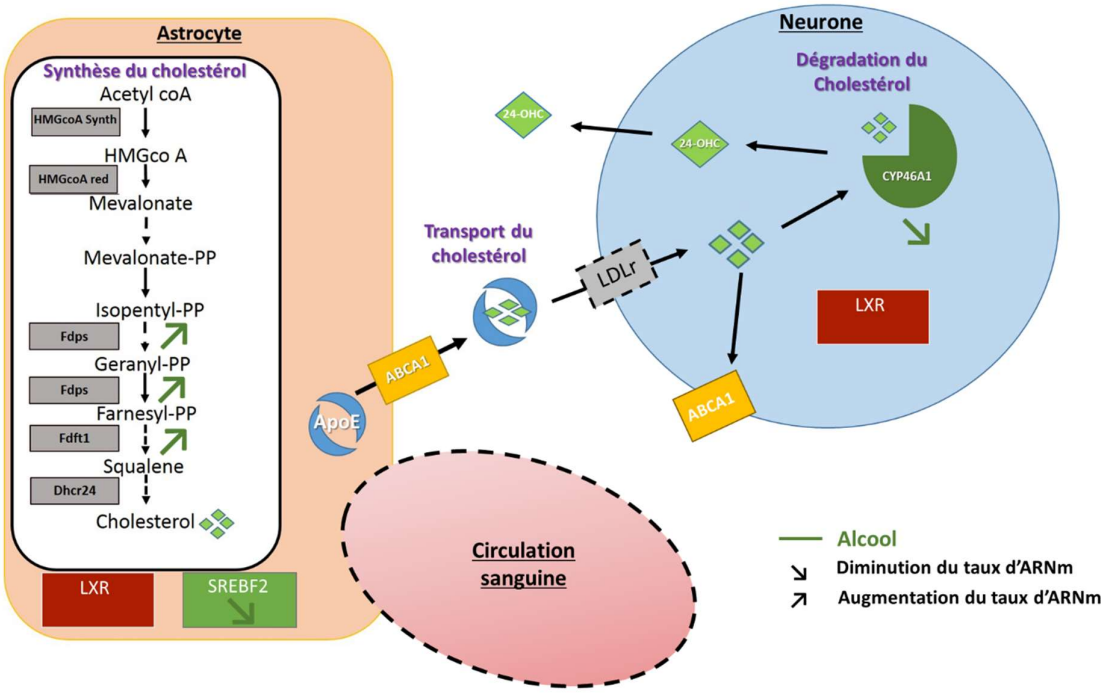


Figure 30 : Schéma résumant les effets de l'exposition chronique à l'alcool sur l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'ATV.

L'exposition chronique à l'alcool engendre une augmentation de la synthèse du cholestérol et une diminution de sa dégradation, qui pourrait engendrer une accumulation du cholestérol au niveau de cette structure.

Encore une fois, ces modifications du métabolisme du cholestérol pourraient contribuer aux adaptations durables induites par les drogues dans cette structure. En effet, l'ATV est la cible de phénomènes de plasticité synaptique, notamment entre les afférences glutamatergiques et les neurones dopaminergiques de l'ATV. Suite à l'exposition chronique à l'alcool, une LTP est observée au niveau de l'ATV (Bernier et al., 2011), qui sera perdue après une période d'abstinence. Ces effets transitoires de la plasticité sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude au niveau du métabolisme du cholestérol. En effet, une exposition chronique à l'alcool engendre une diminution du cholestérol et par la suite sera impliquée dans l'induction de la LTP. Suite à une période d'abstinence, une

augmentation du métabolisme est observée qui pourrait alors être également la disparition de cette LTP, observée au niveau de cette structure après une période d'abstinence.

Conclusion générale

L'exposition aux drogues d'abus, tels que l'alcool et la cocaïne engendre des neuroadaptations dans les structures cérébrales (voir chapitre 2). Dans la 1ère partie de notre étude, nous avons pu montrer que l'alcool et la cocaïne provoquent des altérations au niveau de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol cérébral et cela de façon drogue spécifique et région spécifique. Ces altérations sont persistantes même après une période d'abstinence de 3 semaines, et pourraient être impliquées dans les neuroadpatations fonctionnelles et structurales induites par les drogues d'abus, et responsables de la persistance du risque de rechute aux drogues.

Dans la 2ème partie de la thèse, nous avons étudié l'effet de l'altération de la voie du métabolisme du cholestérol sur la recherche de drogue dans un protocole d'auto-administration permettant de modéliser la rechute chez les rats. La modulation de la dégradation du cholestérol par la sur-expression de la CYP46A1 dans cette structure n'a pas d'effet sur le risque de rechute.

Cette étude est une étude exploratrice s'intéressant au rôle dans l'addiction du métabolisme du cholestérol dans les structures du système mésocorticolimbique. Des travaux supplémentaires sont encore nécessaires pour poursuivre la caractérisation, et aussi pour établir un lien direct entre le métabolisme du cholestérol et l'addiction mais ces recherches consistant à rechercher de nouveaux mécanismes impliqués dans l'addiction permettent de mettre en lumière de nouvelles approches thérapeutiques pour diminuer le taux élevé de rechute.

Bibliographie

Abrahao, K. P., Ariwodola, O. J., Butler, T. R., Rau, A. R., Skelly, M. J., Carter, E., et al. (2013). Locomotor Sensitization to Ethanol Impairs NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens and Increases Ethanol Self-Administration. *J. Neurosci.* 33, 4834–4842. doi:10.1523/JNEUROSCI.5839-11.2013.

Adams, C. M., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10647–10652. doi:10.1073/pnas.1534833100.

Adams, C. M., Reitz, J., De Brabander, J. K., Feramisco, J. D., Li, L., Brown, M. S., et al. (2004). Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and insigs. *J. Biol. Chem.* 279, 52772–52780. doi:10.1074/jbc.M410302200.

Aggarwal, S., and Mortensen, O. V. (2017). Overview of monoamine transporters. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017, 12.16.1-12.16.17. doi:10.1002/cpph.32.

Agís-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., et al. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14602–14607. doi:10.1073/pnas.0606544103.

Ahmadiantehrani, S., Barak, S., and Ron, D. (2014). GDNF is a novel ethanol-responsive gene in the VTA: Implications for the development and persistence of excessive drinking. *Addict. Biol.* 19, 623–633. doi:10.1111/adb.12028.

Alheid, G. F. (2006). Extended Amygdala and Basal Forebrain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 185–205. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07082.x.

Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., and Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 128–140. doi:10.1038/nrn2059.

American Psychiatric Association (2013). *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.)*. doi:10.1016/S0031-9422(00)86656-X.

Anchisi, L., Dessì, S., Pani, A., and Mandas, A. (2013). Cholesterol homeostasis: A key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front. Physiol.* 3 JAN, 1–12. doi:10.3389/fphys.2012.00486.

Anderson, K. W., Mast, N., Hudgens, J. W., Lin, J. B., Turko, I. V., and Pikuleva, I. A. (2016). Mapping of the allosteric site in cholesterol hydroxylase CYP46A1 for efavirenz, a drug that stimulates enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 291, 11876–11886. doi:10.1074/jbc.M116.723577.

Appels, N. M. G. M. (2005). Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *Oncologist* 10, 565–578. doi:10.1634/theoncologist.10-8-565.

Argilli, E., Sibley, D. R., Malenka, R. C., England, P. M., and Bonci, A. (2008). Mechanism and Time Course of Cocaine-Induced Long-Term Potentiation in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 28, 9092–9100. doi:10.1523/JNEUROSCI.1001-08.2008.

Aron, J. L., and Paulus, M. P. (2007). Location, location: Using functional magnetic resonance imaging to pinpoint brain differences relevant to stimulant use. *Addiction* 102, 33–43. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01778.x.

Atkins, A. L., Mashhoon, Y., and Kantak, K. M. (2008). Hippocampal regulation of contextual cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 481–491. doi:10.1016/j.pbb.2008.04.007.

Aylward, E. H. (2007). Change in MRI striatal volumes as a biomarker in preclinical Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 72, 152–158. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.10.028.

Bannerman, D. ., Rawlins, J. N. ., McHugh, S. ., Deacon, R. M. ., Yee, B. ., Bast, T., et al. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–283. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.03.004.

Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 Suppl 7, 31–55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258656.

Barnard, E. a, Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., et al. (1998). Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313. doi:10.1124/pr.108.00505.receptors.

Baur, R., Minier, F., and Sigel, E. (2006). A GABAA receptor of defined subunit composition and positioning: Concatenation of five subunits. *FEBS Lett.* 580, 1616–1620. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.002.

Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217. doi:10.1124/pr.110.002642.

Belelli, D., and Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABAAreceptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565–575. doi:10.1038/nrn1703.

Bell, R. L., Kimpel, M. W., McClintick, J. N., Strother, W. N., Carr, L. G., Liang, T., et al. (2009). Gene expression changes in the nucleus accumbens of alcohol-preferring rats following chronic ethanol consumption. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 131–147. doi:10.1016/j.pbb.2009.07.019.

Bełtowski, J., and Semczuk, A. (2010). Liver X receptor (LXR) and the reproductive system - A potential novel target for therapeutic intervention. *Pharmacol. Reports* 62, 15–27. doi:10.1016/S1734-1140(10)70239-5.

Benarroch, E. E. (2015). The amygdala: Functional organization and involvement in neurologic disorders. *Neurology* 84, 313–324. doi:10.1212/WNL.0000000000001171.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002). "Important Derivatives of Cholesterol Include Bile Salts and Steroid Hormones," in *Biochemistry, 5th Edition* Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22339/.

Berlucchi, G., and Buchtel, H. A. (2009). Neuronal plasticity: Historical roots and evolution of meaning. *Exp. Brain Res.* 192, 307–319. doi:10.1007/s00221-008-1611-6.

Bernier, B. E., Whitaker, L. R., and Morikawa, H. (2011). Previous Ethanol Experience Enhances Synaptic Plasticity of NMDA Receptors in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 31, 5205–5212. doi:10.1523/JNEUROSCI.5282-10.2011.

Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., and Valjent, E. (2010). What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front. Neuroanat.* 4. doi:10.3389/fnana.2010.00136.

Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., and Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Mol. Brain Res.* 33, 174–178. doi:10.1016/0169-328X(95)00097-C.

Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: Oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x.

Björkhem, I., Meaney, S., and Fogelman, A. M. (2004). Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. doi:10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b.

Bock, R., Hoon Shin, J., Kaplan, A. R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P. F., et al. (2013). Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat. Neurosci.* 16, 632–638. doi:10.1038/nn.3369.

Bocklisch, C., Pascoli, V., Wong, J. C. Y., House, D. R. C., Yvon, C., De Roo, M., et al. (2013). Cocaine disinhibits dopamine neurons by potentiation of GABA transmission in the ventral tegmental area. *Science (80-.).* 341, 1521–1525. doi:10.1126/science.1237059.

Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E. G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., et al. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 314, 45–48. doi:10.1016/S0304-3940(01)02277-7.

Boileau, I., Assaad, J. M., Pihl, R. O., Benkelfat, C., Leyton, M., Diksic, M., et al. (2003). Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 49, 226–231. doi:10.1002/syn.10226.

Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Seghers, M. C., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2016). The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of γ-secretase. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.17578.

Bonci, A., and Malenka, R. C. (1999). Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 19, 3723–30. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.022.

Booze, R. M., Welch, M. A., Wood, M. L., Billings, K. A., Apple, S. R., and Mactutus, C. F. (1999). Behavioral sensitization following repeated intravenous nicotine administration: Gender differences and gonadal hormones. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 827–839. doi:10.1016/S0091-3057(99)00169-0.

Borgland, S. L. (2004). Acute and Chronic Cocaine-Induced Potentiation of Synaptic Strength in the Ventral Tegmental Area: Electrophysiological and Behavioral Correlates in Individual Rats. *J. Neurosci.* 24, 7482–7490. doi:10.1523/JNEUROSCI.1312-04.2004.

Bosc, E., Fatséas, M., Alexandre, J.-M., and Auriacombe, M. (2012). [Similarities and differences between pathological gambling and substance dependance: A clarification]. *Encephale.* 38, 433–9. doi:10.1016/j.encep.2012.02.004.

Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., and Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82, 444–459. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.021.

Bosch, M., and Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 383–388. doi:10.1016/j.conb.2011.09.002.

Bossert, J. M., Marchant, N. J., Calu, D. J., and Shaham, Y. (2013). The reinstatement model of drug relapse: Recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology (Berl).* 229, 453–476. doi:10.1007/s00213-013-3120-y.

Boudreau, A. C., and Wolf, M. E. (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 25, 9144–51. doi:10.1523/JNEUROSCI.2252-05.2005.

Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Moumné, L., et al. (2016). CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953–970. doi:10.1093/brain/awv384.

Boussicault, L., Kacher, R., Lamazière, A., Vanhoutte, P., Caboche, J., Betuing, S., et al. (2018). CYP46A1 protects against NMDA-mediated excitotoxicity in Huntington's disease: Analysis of lipid raft content. *Biochimie* 153, 70–79. doi:10.1016/j.biochi.2018.07.019.

Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J. P., Marshall, F., Raiteri, M., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* 54, 247–64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037141.

Boyles, J. K., Pitas, R. E., Wilson, E., Mahley, R. W., and Taylor, J. M. (1985). Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 76, 1501–1513. doi:10.1172/JCI112130.

Brachet, A., Norwood, S., Brouwers, J. F., Palomer, E., Helms, J. B., Dotti, C. G., et al. (2015). LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J. Cell Biol.* 208, 791–806. doi:10.1083/jcb.201407122.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331–340. doi:10.1016/S0092-8674(00)80213-5.

Brown, M. T. C., Tan, K. R., O'Connor, E. C., Nikonenko, I., Muller, D., and Lüscher, C. (2012). Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 492, 452–456. doi:10.1038/nature11657.

Burg, J. S., and Espenshade, P. J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog. Lipid Res.* 50, 403–410. doi:10.1016/j.plipres.2011.07.002.

Burlot, M., Braudeau, J., Michaelsen-Preusse, K., Potier, B., Ayciriex, S., Varin, J., et al. (2015). Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5965–5976. doi:10.1093/hmg/ddv268.

Cadoni, C., Pisanu, A., Solinas, M., Acquas, E., and Di Chiara, G. (2001). Behavioural sensitization after repeated exposure to Δ9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl).* 158, 259–266. doi:10.1007/s002130100875.

Cagetti, E. (2003). Withdrawal from Chronic Intermittent Ethanol Treatment Changes Subunit Composition, Reduces Synaptic Function, and Decreases Behavioral Responses to Positive Allosteric Modulators of

GABAA Receptors. *Mol. Pharmacol.* 63, 53–64. doi:10.1124/mol.63.1.53.

Caine, S. B., Humby, T., Robbins, T. W., and Everitt, B. J. (2001). Behavioral effects of psychomotor stimulants in rats with dorsal or ventral subiculum lesions: Locomotion, cocaine self-administration, and prepulse inhibition of startle. *Behav. Neurosci.* 115, 880–894. doi:10.1037/0735-7044.115.4.880.

Camille, N., Tsuchida, A., and Fellows, L. K. (2011). Double Dissociation of Stimulus-Value and Action-Value Learning in Humans with Orbitofrontal or Anterior Cingulate Cortex Damage. *J. Neurosci.* 31, 15048–15052. doi:10.1523/JNEUROSCI.3164-11.2011.

Carboni, S., Isola, R., Gessa, G. L., and Rossetti, Z. L. (1993). Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-d-aspartate in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 152, 133–136. doi:10.1016/0304-3940(93)90501-B.

Carnicella, S., Amamoto, R., and Ron, D. (2009). Excessive alcohol consumption is blocked by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Alcohol* 43, 35–43. doi:10.1016/j.alcohol.2008.12.001.

Carnicella, S., Kharazia, V., Jeanblanc, J., Janak, P. H., and Ron, D. (2008). GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8114–8119. doi:10.1073/pnas.0711755105.

Carr, D. B., and Sesack, S. R. (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38, 114–123. doi:10.1002/1098-2396(200011)38:2<114::AID-SYN2>3.0.CO;2-R.

Carta, M. (2004). Alcohol Enhances GABAergic Transmission to Cerebellar Granule Cells via an Increase in Golgi Cell Excitability. *J. Neurosci.* 24, 3746–3751. doi:10.1523/JNEUROSCI.0067-04.2004.

Carta, M., Ariwodola, O. J., Weiner, J. L., and Valenzuela, C. F. (2003). Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6813–6818. doi:10.1073/pnas.1137276100.

Carter, A. Y., Letronne, F., Fitz, N. F., Mounier, A., Wolfe, C. M., Nam, K. N., et al. (2017). Liver X receptor agonist treatment significantly affects phenotype and transcriptome of APOE3 and APOE4 Abca1 haplo-deficient mice. *PLoS One* 12, e0172161. doi:10.1371/journal.pone.0172161.

Cartocci, V., Servadio, M., Trezza, V., and Pallottini, V. (2017). Can Cholesterol Metabolism Modulation Affect Brain Function and Behavior? *J. Cell. Physiol.* 232, 281–286. doi:10.1002/jcp.25488.

Cassell, M. D., Gray, T. S., and Kiss, J. Z. (1986). Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: A cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 246, 478–499. doi:10.1002/cne.902460406.

Castilla-Ortega, E., Serrano, A., Blanco, E., Araos, P., Suárez, J., Pavón, F. J., et al. (2016). A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 66, 15–32. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.03.030.

Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C. C. Y., and Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. Metab.* 297, E1–E9. doi:10.1152/ajpendo.90926.2008.

Chauvet, C., Goldberg, S. R., Jaber, M., and Solinas, M. (2012). Effects of environmental enrichment on the

incubation of cocaine craving. *Neuropharmacology* 63, 635–641. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.05.014.

Chauvet, C., Lardeux, V., Goldberg, S. R., Jaber, M., and Solinas, M. (2009). Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 34, 2767–2778. doi:10.1038/npp.2009.127.

Chauvet, C., Nicolas, C., Lafay-Chebassier, C., Jaber, M., Thiriet, N., and Solinas, M. (2016). Statins reduce the risks of relapse to addiction in rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 1588–1597. doi:10.1038/npp.2015.317.

Chebib, M., and Johnston, G. A. (1999). The "ABC" of GABA receptors: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 937–40. doi:10.1046/j.1440-1681.1999.03151.x.

Chen, B. T., Bowers, M. S., Martin, M., Hopf, F. W., Guillory, A. M., Carelli, R. M., et al. (2008). Cocaine but Not Natural Reward Self-Administration nor Passive Cocaine Infusion Produces Persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59, 288–297. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.024.

Chen, R., Tilley, M. R., Wei, H., Zhou, F., Zhou, F.-M., Ching, S., et al. (2006). Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9333–9338. doi:10.1073/pnas.0600905103.

Churchill, L., Swanson, C. J., Urbina, M., and Kalivas, P. W. (1999). Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 72, 2397–2403. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0722397.x.

Citri, A., and Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41. doi:10.1038/sj.npp.1301559.

Connor, J. P., Haber, P. S., and Hall, W. D. (2016). Alcohol use disorders. *Lancet* 387, 988–998. doi:10.1016/S0140-6736(15)00122-1.

Conrad, K. L., Tseng, K. Y., Uejima, J. L., Reimers, J. M., Heng, L. J., Shaham, Y., et al. (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* 454, 118–121. doi:10.1038/nature06995.

Cornish, J. L., Duffy, P., and Kalivas, P. W. (1999). A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* 93, 1359–1367. doi:10.1016/S0306-4522(99)00214-6.

Cotto, B., Natarajaseenivasan, K., Ferrero, K., Wesley, L., Sayre, M., and Langford, D. (2018). Cocaine and HIV-1 Tat disrupt cholesterol homeostasis in astrocytes: Implications for HIV-associated neurocognitive disorders in cocaine user patients. *Glia* 66, 889–902. doi:10.1002/glia.23291.

Courtney, R., and Landreth, G. E. (2016). LXR Regulation of Brain Cholesterol: From Development to Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 404–414. doi:10.1016/j.tem.2016.03.018.

Cremona, M. L., Matthies, H. J. G., Pau, K., Bowton, E., Speed, N., Lute, B. J., et al. (2011). Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat. Neurosci.* 14, 469–477. doi:10.1038/nn.2781.

Crits-Christoph, P., Newberg, A., Wintering, N., Ploessl, K., Gibbons, M. B. C., Ring-Kurtz, S., et al. (2008).

Dopamine transporter levels in cocaine dependent subjects. *Drug Alcohol Depend.* 98, 70–76. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.04.014.

Crowder, T. L., Ariwodola, O. J., and Weiner, J. L. (2006). Kainate receptor activation potentiates GABAergic synaptic transmission in the nucleus accumbens core. *Brain Res.* 1088, 73–82. doi:10.1016/j.brainres.2005.12.133.

Cunningham, C. L., and Noble, D. (1992). Conditioned activation induced by ethanol: Role in sensitization and conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 307–313. doi:10.1016/0091-3057(92)90673-4.

D'Souza, M. S. (2015). Glutamatergic transmission in drug reward: Implications for drug addiction. *Front. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00404.

Dahchour, A., and De Witte, P. (1999). Effect of repeated ethanol withdrawal on glutamate microdialysate in the hippocampus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 1698–1703. doi:10.1111/j.1530-0277.1999.tb04063.x.

Dahchour, A., and De Witte, P. (2003). Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 465–470. doi:10.1097/01.ALC.0000056617.68874.18.

Dahchour, A., De Witte, P., Bolo, N., Nédélec, J. F., Muzet, M., Durbin, P., et al. (1998). Central effects of acamprosate: Part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 82, 107–114. doi:10.1016/S0925-4927(98)00016-X.

Dam, H. (1958). Historical introduction to cholesterol. *Chem. Biochem. Pathol. Acad. Press*, 1–14.

Dawson, P., and Moffatt, J. D. (2012). Cardiovascular toxicity of novel psychoactive drugs: Lessons from the past. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 39, 244–252. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.05.003.

De Ferron, B. S., Bennouar, K. E., Kervern, M., Alaux-Cantin, S., Robert, A., Rabiant, K., et al. (2016). Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: Key role for GLUN2B subunit. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, 1–11. doi:10.1093/ijnp/pyv087.

de Wit, H., and Stewart, J. (1981). Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 75, 134–143. doi:10.1007/BF00432175.

DeBruin, L. S., and Harauz, G. (2007). White Matter Rafting—Membrane Microdomains in Myelin. *Neurochem. Res.* 32, 213–228. doi:10.1007/s11064-006-9137-4.

Delatour, B., and Gisquet-Verrier, P. (2001). Involvement of the dorsal anterior cingulate cortex in temporal behavioral sequencing: subregional analysis of the medial prefrontal cortex in rat. *Behav. Brain Res.* 126, 105–114. doi:10.1016/S0166-4328(01)00251-0.

Demel, R. A., and De Kruyff, B. (1976). The function of sterols in membranes. *BBA - Rev. Biomembr.* 457, 109–132. doi:10.1016/0304-4157(76)90008-3.

Devaud, L. L., Fritschy, J.-M., Sieghart, W., and Morrow, A. L. (2002). Bidirectional Alterations of GABAA Receptor Subunit Peptide Levels in Rat Cortex During Chronic Ethanol Consumption and Withdrawal. *J. Neurochem.* 69, 126–130. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69010126.x.

Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.* 137, 75–114. doi:10.1016/S0166-4328(02)00286-3.

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5274–5278. doi:10.1073/pnas.85.14.5274.

Di Pietro, N. C., Black, Y. D., and Kantak, K. M. (2006). Context-dependent prefrontal cortex regulation of cocaine self-administration and reinstatement behaviors in rats. *Eur. J. Neurosci.* 24, 3285–3298. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05193.x.

Didone, V., Masson, S., Quoilin, C., Seutin, V., and Quertemont, E. (2016). Correlation between ethanol behavioral sensitization and midbrain dopamine neuron reactivity to ethanol. *Addict. Biol.* 21, 387–396. doi:10.1111/adb.12216.

Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* 390, 287–293. doi:10.1515/BC.2009.035.

Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 105–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264981.

Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2004). *Thematic review series: Brain Lipids.* Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397. doi:10.1194/jlr.R400004-JLR200.

Dingledine, R. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 8–51. doi:10.1016/0304-3940(95)11442-Y.

Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., et al. (2015). CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain* 138, 2383–2398. doi:10.1093/brain/awv166.

Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., et al. (2009). Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 259–301. doi:10.1016/j.yfrne.2009.05.006.

Dodd, P. R., Beckmann, A. M., Davidson, M. S., and Wilce, P. A. (2000). Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. *Neurochem. Int.* 37, 509–533. doi:10.1016/S0197-0186(00)00061-9.

Dos Santos, M., Salery, M., Forget, B., Garcia Perez, M. A., Betuing, S., Boudier, T., et al. (2017). Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biol. Psychiatry* 82, 806–818. doi:10.1016/j.biopsych.2017.03.014.

Dumitriu, D., LaPlant, Q., Grossman, Y. S., Dias, C., Janssen, W. G., Russo, S. J., et al. (2012). Subregional, Dendritic Compartment, and Spine Subtype Specificity in Cocaine Regulation of Dendritic Spines in the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 32, 6957–6966. doi:10.1523/JNEUROSCI.5718-11.2012.

Epstein, D. H., Preston, K. L., Stewart, J., and Shaham, Y. (2006). Toward a model of drug relapse: An assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl).* 189, 1–16.

doi:10.1007/s00213-006-0529-6.

Erdozain, A. M., and Callado, L. F. (2014). Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones* 26, 360–70. doi:10.20882/adicciones.40.

Estroff, T. W. (2001). *Manual of adolescent substance abuse treatment.* doi:10.1080/0028825X.2016.1240092.

Fanselow, M. S., and Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65, 7–19. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.031.

Ferguson, S. M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M. J., Phillips, P. E. M., Dong, Y., et al. (2011). Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat. Neurosci.* 14, 22–24. doi:10.1038/nn.2703.

Fernández-Pérez, E. J., Sepúlveda, F. J., Peters, C., Bascuñán, D., Riffo-Lepe, N. O., González-Sanmiguel, J., et al. (2018). Effect of cholesterol on membrane fluidity and association of Aβ oligomers and subsequent neuronal damage: A Double-Edged Sword. *Front. Aging Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnagi.2018.00226.

Ferrer, I., Fábregues, I., Rairiz, J., and Galofré, E. (1986). Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neurosci. Lett.* 69, 115–119. doi:10.1016/0304-3940(86)90425-8.

Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (2004). Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 65–69. doi:10.1042/BST0320065.

Fitzgerald, L. W., Ortiz, J., Hamedani, A. G., and Nestler, E. J. (1996). Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J. Neurosci.* 16, 274–282. doi:0270-6474/95/160274-09$05.00/0.

Floresco, S. B. (2015). The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. *Annu. Rev. Psychol.* 66, 25–52. doi:10.1146/annurev-psych-010213-115159.

Floresco, S. B., and Jentsch, J. D. (2011). Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacology* 36, 227–250. doi:10.1038/npp.2010.158.

Ford, M. M., Yoneyama, N., Strong, M. N., Fretwell, A., Tanchuck, M., and Finn, D. A. (2008). Inhibition of 5α-reduced steroid biosynthesis impedes acquisition of ethanol drinking in male C57BL/6J mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1408–1416. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00718.x.

Francis, T. C., and Lobo, M. K. (2017). Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biol. Psychiatry* 81, 645–653. doi:10.1016/j.biopsych.2016.09.007.

Friesen, J. A., and Rodwell, V. W. (2004). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.* 5, 248. doi:10.1186/gb-2004-5-11-248.

Frye, M. A., Hinton, D. J., Karpyak, V. M., Biernacka, J. M., Gunderson, L. J., Feeder, S. E., et al. (2016). Anterior Cingulate Glutamate Is Reduced by Acamprosate Treatment in Patients with Alcohol Dependence. *J. Clin. Psychopharmacol.* 36, 669–674. doi:10.1097/JCP.0000000000000590.

Fuchs, R. A., Eaddy, J. L., Su, Z. I., and Bell, G. H. (2007). Interactions of the basolateral amygdala with the dorsal hippocampus and dorsomedial prefrontal cortex regulate drug context-induced reinstatement of

cocaine-seeking in rats. *Eur. J. Neurosci.* 26, 487–498. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05674.x.

Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., et al. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 296–309. doi:10.1038/sj.npp.1300579.

Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M. C., Fitzgerald, M. L., and Rebeck, G. W. (2002). Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted A?? levels. *J. Biol. Chem.* 277, 48508–48513. doi:10.1074/jbc.M209085200.

Fuster, J. M. (2001). The Prefrontal Cortex—An Update. *Neuron* 30, 319–333. doi:10.1016/S0896-6273(01)00285-9.

Garavan, H., and Hester, R. (2007). The role of cognitive control in cocaine dependence. *Neuropsychol. Rev.* 17, 337–345. doi:10.1007/s11065-007-9034-x.

Gatto, G. J., McBride, W. J., Murphy, J. M., Lumeng, L., and Li, T. K. (1994). Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* 11, 557–564. doi:10.1016/0741-8329(94)90083-3.

Ghanbarian, E., and Motamedi, F. (2013). Ventral Tegmental Area Inactivation Suppresses the Expression of CA1 Long Term Potentiation in Anesthetized Rat. *PLoS One* 8, e58844. doi:10.1371/journal.pone.0058844.

Gielen, E., Baron, W., Vandeven, M., Steels, P., Hoekstra, D., and Ameloot, M. (2006). Rafts in oligodendrocytes: Evidence and structure-function relationship. *Glia* 54, 499–512. doi:10.1002/glia.20406.

Gil, J. M., and Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2803–20. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06310.x.

Gilpin, N. W., and Koob, G. F. (2008). Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res. Health* 31, 185–95. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10959–10974. doi:10.1021/bi963138w.

Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Shen, H., Reissner, K. J., Thomas, C. A., and Kalivas, P. W. (2013). Relapse induced by cues predicting cocaine depends on rapid, transient synaptic potentiation. *Neuron* 77, 867–872. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.005.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., and Caron, M. G. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379, 606–612. doi:10.1038/379606a0.

Givens, B., and McMahon, K. (1995). Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* 688, 27–33. doi:10.1016/0006-8993(95)00499-G.

Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., and Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–36. doi:10.1016/j.cell.2005.12.022.

Goldstein, J. L., Rawson, R. B., and Brown, M. S. (2002). Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 139–148. doi:10.1006/abbi.2001.2615.

Goldstein, R. Z., and Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: Neuroimaging findings and clinical implications. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 652–669. doi:10.1038/nrn3119.

Golomb, B. A., and Evans, M. A. (2008). Statin adverse effects: A review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 8, 373–418. doi:http://dx.doi.org/10.2165/0129784-200808060-00004.

Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E., and Michaelson, D. M. (1995). Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 199, 1–4. doi:10.1016/0304-3940(95)12006-P.

Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: Use of an in vitro model. *Brain Res.* 1249, 34–42. doi:10.1016/j.brainres.2008.10.036.

Granon, S., and Poucet, B. (1995). Medial Prefrontal Lesions in the Rat and Spatial Navigation: Evidence for Impaired Planning. *Behav. Neurosci.* 109, 474–484. doi:10.1037/0735-7044.109.3.474.

Granon, S., and Poucet, B. (2000). Involvement of the rat prefrontal cortex in cognitive functions : A central role for the prelimbic area. *Psychobiology* 28, 229–237. doi:10.3758/bf03331981.

Griffin, W. C., Haun, H. L., Hazelbaker, C. L., Ramachandra, V. S., and Becker, H. C. (2014). Increased extracellular glutamate in the nucleus accumbens promotes excessive ethanol drinking in ethanol dependent mice. *Neuropsychopharmacology* 39, 707–717. doi:10.1038/npp.2013.256.

Grimm, J. W., Hope, B. T., Wise, R. A., and Shaham, Y. (2001). Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412, 141–142. doi:10.1038/35084134.

Grimm, J. W., Shaham, Y., and Hope, B. T. (2002). Effect of cocaine and sucrose withdrawal period on extinction behavior, cue-induced reinstatement, and protein levels of the dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in limbic and cortical areas in rats. *Behav. Pharmacol.* 13, 379–388. doi:10.1097/00008877-200209000-00011.

Guan, Y. Z., and Ye, J. H. (2010). Ethanol blocks long-term potentiation of gabaergic synapses in the ventral tegmental area involving μ-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology* 35, 1841–1849. doi:10.1038/npp.2010.51.

Guennoun, R., Fiddes, R. J., Gouézou, M., Lombès, M., and Baulieu, E. E. (1995). A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ5-Δ4-isomerase (3β-HSD), is expressed in rat brain. *Mol. Brain Res.* 30, 287–300. doi:10.1016/0169-328X(95)00016-L.

Gunn, B. G., Cunningham, L., Mitchell, S. G., Swinny, J. D., Lambert, J. J., and Belelli, D. (2015). GABAAreceptor-acting neurosteroids: A role in the development and regulation of the stress response. *Front. Neuroendocrinol.* 36, 28–48. doi:10.1016/j.yfrne.2014.06.001.

Hall, F. S., Sora, I., Drgonova, J., Li, X. F., Goeb, M., and Uhl, G. R. (2004). Molecular mechanisms underlying

the rewarding effects of cocaine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025, 47–56. doi:10.1196/annals.1316.006.

Han, D. D., and Gu, H. H. (2006). Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.* 6. doi:10.1186/1471-2210-6-6.

Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., et al. (2013). DSM-5 criteria for substance use disorders: Recommendations and rationale. *Am. J. Psychiatry* 170, 834–851. doi:10.1176/appi.ajp.2013.12060782.

Hayashi-Takagi, A., Takaki, M., Graziane, N., Seshadri, S., Murdoch, H., Dunlop, A. J., et al. (2010). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat. Neurosci.* 13, 327–332. doi:10.1038/nn.2487.

Head, B. P., Patel, H. H., and Insel, P. A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 532–545. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.018.

Hedrick, N. G., Harward, S. C., Hall, C. E., Murakoshi, H., McNamara, J. O., and Yasuda, R. (2016). Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature* 538, 104–108. doi:10.1038/nature19784.

Hering, H., Lin, C., and Sheng, M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23, 3262–3271. doi:23/8/3262 [pii].

Hirsch-Reinshagen, V., Zhou, S., Burgess, B. L., Bernier, L., McIsaac, S. A., Chan, J. Y., et al. (2004). Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J. Biol. Chem.* 279, 41197–41207. doi:10.1074/jbc.M407962200.

Hoffman, P. L., Rabe, C. S., Moses, F., and Tabakoff, B. (1989). N-Methyl-D-Aspartate Receptors and Ethanol: Inhibition of Calcium Flux and Cyclic GMP Production. *J. Neurochem.* 52, 1937–1940. doi:10.1111/j.1471-4159.1989.tb07280.x.

Hoffman, P. L., and Tabakoff, B. (1994). The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS* 71, 61–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8032173.

Hong, C., and Tontonoz, P. (2014). Liver X receptors in lipid metabolism: Opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 433–444. doi:10.1038/nrd4280.

Hooff, G. P., Wood, W. G., Müller, W. E., and Eckert, G. P. (2010). Isoprenoids, small GTPases and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 896–905. doi:10.1016/j.bbalip.2010.03.014.

Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131. doi:10.1172/JCI0215593.

Hou, Q., Huang, Y., Amato, S., Snyder, S. H., Huganir, R. L., and Man, H. Y. (2008). Regulation of AMPA receptor localization in lipid rafts. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 213–223. doi:10.1016/j.mcn.2008.02.010.

Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P. P., Stet, F. S., Ahouansou, O., et al. (2010). Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of alzheimer's disease. *Mol. Ther.* 18, 44–53.

doi:10.1038/mt.2009.175.

Huganir, R. L., and Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* 80, 704–717. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.025.

Hughes, J. R. (2009). Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav.* 15, 92–97. doi:10.1016/j.yebeh.2009.02.037.

Hyman, S. E., and Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 695–703. doi:10.1038/35094560.

Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 125–138. doi:10.1038/nrm2336.

Imperato, A., and Di Chiara, G. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 219–228. doi:0022-3565/86/2391-0219.

Isaac, J. T. R., Ashby, M., and McBain, C. J. (2007). The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* 54, 859–871. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.001.

Isenschmid, D. S. (2002). Cocaine - Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic Sci. Rev.* 14, 61–100. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256487.

Ito, J. I., Nagayasu, Y., Miura, Y., Yokoyama, S., and Michikawa, M. (2014). Astrocyte's endogenous apoE generates HDL-like lipoproteins using previously synthesized cholesterol through interaction with ABCA1. *Brain Res.* 1570, 1–12. doi:10.1016/j.brainres.2014.04.037.

Iuliano, L., Crick, P. J., Zerbinati, C., Tritapepe, L., Abdel-khalik, J., Poirot, M., et al. (2015). Cholesterol metabolites exported from human brain. *Steroids* 99, 189–193. doi:10.1016/j.steroids.2015.01.026.

Izumi, Y., Nagashima, K., Murayama, K., and Zorumski, C. F. (2005). Acute effects of ethanol on hippocampal long-term potentiation and long-term depression are mediated by different mechanisms. *Neuroscience* 136, 509–517. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.002.

Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., and Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35, 1503–1519. doi:10.1016/S0028-3908(96)00100-1.

Jackson, D. M., and Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.* 64, 291–370. doi:10.1016/0163-7258(94)90041-8.

Jackson, H. C., and Nutt, D. J. (1993). A single preexposure produces sensitization to the locomotor effects of cocaine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 733–735. doi:10.1016/0091-3057(93)90533-Y.

Jacobs, E. H., Smit, A. B., De Vries, T. J., and Schoffelmeer, A. N. M. (2003). Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 566–573. doi:10.1016/j.tips.2003.09.006.

Jamroz-Wiśniewska, A., Wójcicka, G., Horoszewicz, K., and Bełtowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 61, 760–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063919.

Jansen, P. J., Lütjohann, D., Thelen, K. M., Von Bergmann, K., Van Leuven, F., Ramaekers, F. C. S., et al. (2009). Absence of ApoE upregulates murine brain ApoD and ABCA1 levels, but does not affect brain

sterol levels, while human ApoE3 and human ApoE4 upregulate brain cholesterol precursor levels. *J. Alzheimer's Dis.* 18, 319–329. doi:10.3233/JAD-2009-1150.

Jeanes, Z. M., Buske, T. R., and Morrisett, R. A. (2011). In Vivo Chronic Intermittent Ethanol Exposure Reverses the Polarity of Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens Shell. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 155–164. doi:10.1124/jpet.110.171009.

Jeitner, T. ., Voloshynna, I., and Reiss, A. . (2011). Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. *Curr. Med. Chem.* 18, 1515–1525. doi:10.2174/092986711795328445.

Jeske, D. J., and Dietschy, J. M. (1980). Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water. *J. Lipid Res.* 21, 364–76. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7189770.

Jiang, Q., Lee, C. Y. D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., et al. (2008). ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ. *Neuron* 58, 681–693. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.010.

Jones, K. T., Zhen, J., and Reith, M. E. A. (2012). Importance of cholesterol in dopamine transporter function. *J. Neurochem.* 123, 700–715. doi:10.1111/jnc.12007.

Kalivas, P. W., and Alesdatter, J. E. (1993). Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 486–95. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229779.

Kalivas, P. W., Churchill, L., and Klitenick, M. A. (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 57, 1047–1060. doi:10.1016/0306-4522(93)90048-K.

Kalivas, P. W., and Duffy, P. (1993). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J. Neurosci.* 13, 266–75. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423473.

Kalivas, P. W., Duffy, P., DuMars, L. A., and Skinner, C. (1988). Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 485–92. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&cmd=Retrieve&list_uids=3130474&dopt=Citation.

Kalivas, P. W., and McFarland, K. (2003). Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl).* 168, 44–56. doi:10.1007/s00213-003-1393-2.

Kalivas, P. W., and O'Brien, C. (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33, 166–180. doi:10.1038/sj.npp.1301564.

Kalivas, P. W., and Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1403.

Kalivas, P. W., Volkow, N., and Seamans, J. (2005). Unmanageable motivation in addiction: A pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45, 647–650. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.005.

Karten, B., Vance, D. E., Campenot, R. B., and Vance, J. E. (2002). Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J. Neurochem.* 83, 1154–1163.

doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01220.x.

Kelley, B. J., Yeager, K. R., Pepper, T. H., and Beversdorf, D. Q. (2005). Cognitive impairment in acute cocaine withdrawal. *Cogn. Behav. Neurol.* 18, 108–112. doi:10.1097/01.wnn.0000160823.61201.20.

Kiianmaa, K. (1980). Alcohol intake and ethanol intoxication in the rat: Effect of a 6-OHDA-induced lesion of the ascending noradrenaline pathways. *Eur. J. Pharmacol.* 64, 9–19. doi:10.1016/0014-2999(80)90364-7.

Kim, W. Y., Gonsiorek, E. A., Barnhart, C., Davare, M. A., Engebose, A. J., Lauridsen, H., et al. (2009). Statins decrease dendritic arborization in rat sympathetic neurons by blocking RhoA activation. *J. Neurochem.* 108, 1057–1071. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05854.x.

Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., and Kaczmarek, L. (2007). Functional Internal Complexity of Amygdala: Focus on Gene Activity Mapping After Behavioral Training and Drugs of Abuse. *Physiol. Rev.* 87, 1113–1173. doi:10.1152/physrev.00037.2006.

Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Ikonomovic, M. D., Skoko, J., Lefterov, P. I., Isanski, B. A., et al. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J. Biol. Chem.* 278, 13244–56. doi:10.1074/jbc.M300044200.

Koldamova, R., Staufenbiel, M., and Lefterov, I. (2005). Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J. Biol. Chem.* 280, 43224–43235. doi:10.1074/jbc.M504513200.

Koob, G. F. (2003). Neuroadaptive mechanisms of addiction: Studies on the extended amygdala. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13, 442–452. doi:10.1016/j.euroneuro.2003.08.005.

Koob, G. F. (2004). A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1515–1525. doi:10.1016/j.bcp.2004.07.031.

Koob, G. F. (2010). The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res.* 1314, 3–14. doi:10.1016/j.brainres.2009.11.008.

Koob, G. F., and Le Moal, M. (1997). Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science (80-.).* 278, 52–58. doi:10.1126/science.278.5335.52.

Koob, G. F., and Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217–238. doi:10.1038/npp.2009.110.

Korade, Z., and Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.02.019.

Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., et al. (2015). Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004. doi:10.1124/pr.115.010967.

Kotti, T. J., Ramirez, D. M. O., Pfeiffer, B. E., Huber, K. M., and Russell, D. W. (2006). Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3869–3874. doi:10.1073/pnas.0600316103.

Koudinov, A. R., and Koudinova, N. V. (2001). Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal

degeneration. *FASEB J.* 15, 1858–1860. doi:10.1096/fj.00-0815fje.

Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., and Thomas, M. J. (2007). Cocaine Experience Controls Bidirectional Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 27, 7921–7928. doi:10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007.

Kreek, M. J., LaForge, K. S., and Butelman, E. (2002). Pharmacotherapy of addictions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 710–726. doi:10.1038/nrd897.

Kreilaus, F., Spiro, A. S., McLean, C. A., Garner, B., and Jenner, A. M. (2016). Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 535–546. doi:10.1111/nan.12286.

Kroener, S., Mulholland, P. J., New, N. N., Gass, J. T., Becker, H. C., and Chandler, L. J. (2012). Chronic Alcohol Exposure Alters Behavioral and Synaptic Plasticity of the Rodent Prefrontal Cortex. *PLoS One* 7, e37541. doi:10.1371/journal.pone.0037541.

Kumar, S., Suryanarayanan, A., Boyd, K. N., Comerford, C. E., Lai, M. A., Ren, Q., et al. (2010). Ethanol reduces GABAA alpha1 subunit receptor surface expression by a protein kinase Cgamma-dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 77, 793–803. doi:10.1124/mol.109.063016.

Kunz, G., Englisch, H. J., and Wenzel, J. (1976). [Spine-distribution of pyramidal neurons of the CAl-region of the rat hippocampus following long-term oral alcohol administration]. *J Hirnforsch* 17, 351–363.

Kurano, M., Iso-O, N., Hara, M., Ishizaka, N., Moriya, K., Koike, K., et al. (2011). LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. *Lipids Health Dis.* 10, 134. doi:10.1186/1476-511X-10-134.

Kutlu, M. G., and Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: Contributions to development and maintenance of addiction. *Learn. Mem.* 23, 515–533. doi:10.1101/lm.042192.116.

Läck, A. K., Diaz, M. R., Chappell, A., DuBois, D. W., and McCool, B. A. (2007). Chronic Ethanol and Withdrawal Differentially Modulate Pre- and Postsynaptic Function at Glutamatergic Synapses in Rat Basolateral Amygdala. *J. Neurophysiol.* 98, 3185–3196. doi:10.1152/jn.00189.2007.

Lamaida, E., Lamaida, N., Caputi, F., Rapanà, A., Pizza, V., Lepore, P., et al. (1997). Ischemic stroke syndromes in childhood. *Minerva Pediatr.* 49, 147–154. doi:10.1007/978-1-4939-6996-8.

Lambert, J. J., Belelli, D., Hill-Venning, C., and Peters, J. A. (1995). Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 295–303. doi:10.3389/fendo.2011.00044.

Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* 57, 760–773. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.022.

Lammel, S., Ion, D. I., Roeper, J., and Malenka, R. C. (2011). Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron* 70, 855–862. doi:10.1016/j.neuron.2011.03.025.

Lammel, S., Lim, B. K., and Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76, 351–359. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.019.

Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., et al. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. doi:10.1038/nature11527.

Lane-Donovan, C., Philips, G. T., and Herz, J. (2014). More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. *Neuron* 83, 771–787. doi:10.1016/j.neuron.2014.08.005.

Lanteri, C., Salomon, L., Torrens, Y., Glowinski, J., and Tassin, J. P. (2008). Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 33, 1724–1734. doi:10.1038/sj.npp.1301548.

Lasseter, H. C., Xie, X., Ramirez, D. R., and Fuchs, R. A. (2010a). Prefrontal cortical regulation of drug seeking in animal models of drug relapse. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 3, 101–117. doi:10.1007/7854_2009_19.

Lasseter, H. C., Xie, X., Ramirez, D. R., and Fuchs, R. A. (2010b). Sub-region specific contribution of the ventral hippocampus to drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Neuroscience* 171, 830–839. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.032.

Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-Soboslay, A., Becker, K. G., Lowe, R., Huestis, M. A., et al. (2006). Transcriptional changes common to human cocaine cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 1. doi:10.1371/journal.pone.0000114.

Lenz, J. D., and Lobo, M. K. (2013). Optogenetic insights into striatal function and behavior. *Behav. Brain Res.* 255, 44–54. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.018.

Levitan, I. (2016). Paradoxical impact of cholesterol on lipid packing and cell stiffness. *Front. Biosci.* 21, 4454. doi:10.2741/4454.

Levone, B. R., Cryan, J. F., and O'Leary, O. F. (2015). Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol. Stress* 1, 147–155. doi:10.1016/j.ynstr.2014.11.003.

Li, L., Cao, D., Kim, H., Lester, R., and Fukuchi, K. I. (2006). Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann. Neurol.* 60, 729–739. doi:10.1002/ana.21053.

Li, Y., Hu, X. T., Berney, T. G., Vartanian, A. J., Stine, C. D., Wolf, M. E., et al. (1999). Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. *Synapse* 34, 169–180. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(19991201)34:3<169::AID-SYN1>3.0.CO;2-C.

Liang, S.-L., Carlson, G. C., and Coulter, D. A. (2006). Dynamic Regulation of Synaptic GABA Release by the Glutamate-Glutamine Cycle in Hippocampal Area CA1. *J. Neurosci.* 26, 8537–8548. doi:10.1523/JNEUROSCI.0329-06.2006.

Liao, F., Yoon, H., and Kim, J. (2017). Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. *Curr Opin Lipidol* 28, 60–67. doi:10.1097/MOL.0000000000000383.

Lindau, M., and Alvarez De Toledo, G. (2003). The fusion pore. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1641, 167–173. doi:10.1016/S0167-4889(03)00085-5.

Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., et al. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Sci.* 123, 595–605. doi:10.1242/jcs.060681.

Liu, Q. S., Pu, L., and Poo, M. M. (2005). Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* 437, 1027–1031. doi:10.1038/nature04050.

Lobo, I. A., and Harris, R. A. (2008). GABAA receptors and alcohol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 90–94. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.006.

Lobo, M. K., Covington, H. E., Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H. S., Damez-Werno, D., et al. (2010). Cell type - Specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science (80-.).* 330, 385–390. doi:10.1126/science.1188472.

Lovinger, D. M., White, G., and Weight, F. F. (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science (80-.).* 243, 1721–1724. doi:10.1126/science.2467382.

Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., et al. (2007). Statins Increase Neurogenesis in the Dentate Gyrus, Reduce Delayed Neuronal Death in the Hippocampal CA3 Region, and Improve Spatial Learning in Rat after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 24, 1132–1146. doi:10.1089/neu.2007.0288.

Lu, L., Grimm, J. W., Hope, B. T., and Shaham, Y. (2004). Incubation of cocaine craving after withdrawal: A review of preclinical data. *Neuropharmacology* 47, 214–226. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.027.

Lund, E. G., Guileyardo, J. M., and Russell, D. W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7238–7243. doi:10.1073/PNAS.96.13.7238.

Lund, E. G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S. D., Dietschy, J. M., and Russell, D. W. (2003). Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J. Biol. Chem.* 278, 22980–22988. doi:10.1074/jbc.M303415200.

Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., and Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: A functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science (80-.).* 333, 353–357. doi:10.1126/science.1204622.

Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., et al. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9799–9804. doi:10.1073/pnas.93.18.9799.

Luu, P., and Malenka, R. C. (2008). Spike Timing-Dependent Long-Term Potentiation in Ventral Tegmental Area Dopamine Cells Requires PKC. *J. Neurophysiol.* 100, 533–538. doi:10.1152/jn.01384.2007.

MacAskill, A. F., Cassel, J. M., and Carter, A. G. (2014). Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 17, 1198–1207. doi:10.1038/nn.3783.

MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983. doi:10.1016/0092-8674(93)90585-E.

MacKenzie, G., and Maguire, J. (2014). The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABAAreceptors in affective disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 231, 3333–3342.

doi:10.1007/s00213-013-3423-z.

Mahler, S. V., Vazey, E. M., Beckley, J. T., Keistler, C. R., Mcglinchey, E. M., Kaufling, J., et al. (2014). Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 17, 577–585. doi:10.1038/nn.3664.

Maioli, S., Båvner, A., Ali, Z., Heverin, M., Ismail, M. A. M., Puerta, E., et al. (2013). Is It Possible to Improve Memory Function by Upregulation of the Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) in the Brain? *PLoS One* 8, 2–9. doi:10.1371/journal.pone.0068534.

Maisonneuve, I. m., Keller, R. W., and Glick, S. D. (1990). Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res.* 535, 221–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1963569.

Maldve, R. E., Zhang, T. A., Ferrani-Kile, K., Schreiber, S. S., Lippmann, M. J., Snyder, G. L., et al. (2002). DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 5, 641–648. doi:10.1038/nn877.

Malinow, R., and Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 25, 103–26. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758.

Mameli, M., Balland, B., Luján, R., and Lüscher, C. (2007). Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area. *Science (80-.).* 317, 530–533. doi:10.1126/science.1142365.

Mameli, M., Halbout, B., Creton, C., Engblom, D., Parkitna, J. R., Spanagel, R., et al. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: Persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat. Neurosci.* 12, 1036–1041. doi:10.1038/nn.2367.

Martin, M. G., Pfrieger, F., and Dotti, C. G. (2014). Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* 15, 1036–1052. doi:10.15252/embr.201439225.

Marty, V. N., and Spigelman, I. (2012). Long-lasting alterations in membrane properties, K+currents, and glutamatergic synaptic currents of nucleus accumbens medium spiny neurons in a rat model of alcohol dependence. *Front. Neurosci.* doi:10.3389/fnins.2012.00086.

Mast, N., Anderson, K. W., Johnson, K. M., Phan, T. T. N., Guengerich, F. P., and Pikuleva, I. A. (2017). In vitro cytochrome P450 46A1 (CYP46A1) activation by neuroactive compounds. *J. Biol. Chem.* 292, 12934–12946. doi:10.1074/jbc.M117.794909.

Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J.-M., Valjent, E., et al. (2009). Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic Mice. *PLoS One* 4, e4770. doi:10.1371/journal.pone.0004770.

Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766. doi:10.1038/nature02617.

Mauch, D. H., Nägier, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., et al. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science (80-.).* 294, 1354–1357. doi:10.1126/science.294.5545.1354.

Mayfield, R. D., Larson, G., and Zahniser, N. R. (1992). Cocaine-induced behavioral sensitization and D1dopamine receptor function in rat nucleus accumbens and striatum. *Brain Res.* 573, 331–335. doi:10.1016/0006-8993(92)90783-6.

McBride, W. J., Kimpel, M. W., McClintick, J. N., Ding, Z. M., Hauser, S. R., Edenberg, H. J., et al. (2013). Changes in gene expression within the ventral tegmental area following repeated excessive binge-like alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 47, 367–380. doi:10.1016/j.alcohol.2013.04.002.

Mcclintick, J. N., Mcbride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2016). Gene Expression Changes in Glutamate and GABA-A Receptors , Neuropeptides , Ion Channels , and Cholesterol Synthesis in the Periaqueductal Gray Following Binge-Like Alcohol Drinking by Adolescent Alcohol-Preferring (P) Rats. 40, 955–968. doi:10.1111/acer.13056.

McClintick, J. N., McBride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2015). Gene expression changes in serotonin, GABA-A receptors, neuropeptides and ion channels in the dorsal raphe nucleus of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 129, 87–96. doi:10.1016/j.pbb.2014.12.007.

McClintick, J. N., McBride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., et al. (2018). Gene expression changes in the ventral hippocampus and medial prefrontal cortex of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Alcohol* 68, 37–47. doi:10.1016/j.alcohol.2017.09.002.

McFarland, K., and Kalivas, P. W. (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J. Neurosci.* 21, 8655–8663. doi:21/21/8655 [pii].

McLaughlin, J., and See, R. E. (2003). Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 168, 57–65. doi:10.1007/s00213-002-1196-x.

Meaney, S., Bodin, K., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2002). On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation. *J. Lipid Res.* 43, 2130–2135. doi:10.1194/jlr.M200293-JLR200.

Meinhardt, M. W., Hansson, A. C., Perreau-Lenz, S., Bauder-Wenz, C., Stahlin, O., Heilig, M., et al. (2013). Rescue of Infralimbic mGluR2 Deficit Restores Control Over Drug-Seeking Behavior in Alcohol Dependence. *J. Neurosci.* 33, 2794–2806. doi:10.1523/JNEUROSCI.4062-12.2013.

Meisch, R. A., and Thompson, T. (1972). Ethanol intake during schedule-induced polydipsia. *Physiol. Behav.* 8, 471–475. doi:10.1016/0031-9384(72)90331-9.

Melchior, C. L., and Ritzmann, R. F. (1994). Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48, 893–897. doi:10.1016/0091-3057(94)90197-X.

Melendez, R. I., Hicks, M. P., Cagle, S. S., and Kalivas, P. W. (2005). Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 326–333. doi:10.1097/01.ALC.0000156086.65665.4D.

Melis, M., Spiga, S., and Diana, M. (2005). The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic

State. *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 101–154. doi:10.1016/S0074-7742(05)63005-X.

Mendez, I. A., Montgomery, K. S., LaSarge, C. L., Simon, N. W., Bizon, J. L., and Setlow, B. (2008). Long-term effects of prior cocaine exposure on Morris water maze performance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 185–191. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.005.

Menzaghi, F., RASSNICK, S., HEINRICHS, S., BALDWIN, H., PICH, E. M., WEISS, F., et al. (1994). The Role of Corticotropin-Releasing Factor in the Anxiogenic Effects of Ethanol Withdrawal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 739, 176–184. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb19819.x.

Miendlarzewska, E. A., Bavelier, D., and Schwartz, S. (2016). Influence of reward motivation on human declarative memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 61, 156–176. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.11.015.

Milagre, I., Nunes, M. J., Gama, M. J., Silva, R. F., Pascussi, J. M., Lechner, M. C., et al. (2008). Transcriptional regulation of the human CYP46A1 brain-specific expression by Sp transcription factors. *J. Neurochem.* 106, 835–849. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05442.x.

Miller, E. K., and Cohen, J. D. (2001). An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 167–202. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.167.

Millhouse, O. E., and DeOlmos, J. (1983). Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience* 10, 1269–1300. doi:10.1016/0306-4522(83)90112-4.

Mohamed, A., Smith, K., and de Chaves, E. P. (2015). "The Mevalonate Pathway in Alzheimer's Disease — Cholesterol and Non-Sterol Isoprenoids," in *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future* (InTech). doi:10.5772/59904.

Morell, P., and Jurevics, H. (1996). Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem. Res.* 21, 463–470. doi:10.1007/BF02527711.

Morrisett, R. A., and Swartzwelder, H. S. (1993). Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J.Neurosci.* 13, 2264–2272. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-05-02264.1993.

Mounier, A., Georgiev, D., Nam, K. N., Fitz, N. F., Castranio, E. L., Wolfe, C. M., et al. (2015). Bexarotene-Activated Retinoid X Receptors Regulate Neuronal Differentiation and Dendritic Complexity. *J. Neurosci.* 35, 11862–11876. doi:10.1523/JNEUROSCI.1001-15.2015.

Moutinho, M., Nunes, M. J., Correia, J. C., Gama, M. J., Castro-caldas, M., Cedazo-minguez, A., et al. (2016). Neuronal cholesterol metabolism increases dendritic outgrowth and synaptic markers via a concerted action of GGTase-I and Trk. 1–18. doi:10.1038/srep30928.

Moutinho, M., Nunes, M. J., and Rodrigues, E. (2017). The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Exp. Cell Res.* 360, 55–60. doi:10.1016/j.yexcr.2017.02.034.

Muñoz-Cuevas, F. J., Athilingam, J., Piscopo, D., and Wilbrecht, L. (2013). Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.* 16, 1367–1369. doi:10.1038/nn.3498.

Murray, E. A., and Baxter, M. G. (2002). The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 563–573. doi:10.1038/nrn875.

Mutka, A. L., Lusa, S., Linder, M. D., Jokitalo, E., Kopra, O., Jauhiainen, M., et al. (2004). Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 48654–48662. doi:10.1074/jbc.M405345200.

Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., and Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152, 1024–1031. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.046.

Neisewander, J. L., Baker, D. A., Fuchs, R. A., Tran-Nguyen, L. T., Palmer, A., and Marshall, J. F. (2000). Fos protein expression and cocaine-seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. *J. Neurosci.* 20, 798–805. doi:10.1038/466194a.

Nie, Z., Madamba, S. G., and Siggins, G. R. (2000). Ethanol Enhances gamma-Aminobutyric Acid Responses in a Subpopulation of Nucleus Accumbens Neurons: Role of Metabotropic Glutamate Receptors 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 654–661. Available at: http://www.jpet.org.

Niehaus, J. L., Murali, M., and Kauer, J. A. (2010). Drugs of abuse and stress impair LTP at inhibitory synapses in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 32, 108–117. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07256.x.

Nieweg, K., Schaller, H., and Pfrieger, F. W. (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* 109, 125–134. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x.

Nimitvilai, S., Lopez, M. F., Mulholland, P. J., and Woodward, J. J. (2016). Chronic Intermittent Ethanol Exposure Enhances the Excitability and Synaptic Plasticity of Lateral Orbitofrontal Cortex Neurons and Induces a Tolerance to the Acute Inhibitory Actions of Ethanol. *Neuropsychopharmacology* 41, 1112–1127. doi:10.1038/npp.2015.250.

Niswender, C. M., and Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 295–322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.

Nnadi, C. U., Mimiko, O. A., McCurtis, H. L., and Cadet, J. L. (2005). Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. *J Natl Med Assoc* 97, 1504–1515. doi:https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.11.017.

Nona, C. N., and Nobrega, J. N. (2018). A role for nucleus accumbens glutamate in the expression but not the induction of behavioural sensitization to ethanol. *Behav. Brain Res.* 336, 269–281. doi:10.1016/j.bbr.2017.09.024.

Nowak, K. L., McBride, W. J., Lumeng, L., Li, T. K., and Murphy, J. M. (2000). Involvement of dopamine D2autoreceptors in the ventral tegmental area on alcohol and saccharin intake of the alcohol-preferring P rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 476–483. doi:10.1111/j.1530-0277.2000.tb02014.x.

O'Brien, C. (2011). Addiction and dependence in DSM-V. *Addiction* 106, 866–867. doi:10.1111/j.1360-0443.2010.03144.x.

O'Connor, E. C., Chapman, K., Butler, P., and Mead, A. N. (2011). The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 912–938. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.012.

Obata, K. (2013). Synaptic inhibition and γ-aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 89, 139–56. doi:10.2183/pjab.89.139.

Oh, D., Han, S., Seo, J., Lee, J.-R., Choi, J., Groffen, J., et al. (2010). Regulation of Synaptic Rac1 Activity, Long-Term Potentiation Maintenance, and Learning and Memory by BCR and ABR Rac GTPase-Activating Proteins. *J. Neurosci.* 30, 14134–14144. doi:10.1523/JNEUROSCI.1711-10.2010.

Ohtsuki, S., Ito, S., Matsuda, A., Hori, S., Abe, T., and Terasaki, T. (2007). Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 103, 1430–1438. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04901.x.

Oitzl, M. S., Mulder, M., Lucassen, P. J., Havekes, L. M., Grootendorst, J., and De Kloet, E. R. (1997). Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res.* 752, 189–196. doi:10.1016/S0006-8993(96)01448-5.

Oram, J. F. (2003). HDL apolipoproteins and ABCA1 partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 720–727. doi:10.1161/01.ATV.0000054662.44688.9A.

Ostrowski, S. M., Johnson, K., Siefert, M., Shank, S., Sironi, L., Wolozin, B., et al. (2016). Simvastatin inhibits protein isoprenylation in the brain. *Neuroscience* 329, 264–274. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.04.053.

Oualian, C., and Gisquet-Verrier, P. (2010). The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn. Mem.* 17, 654–668. doi:10.1101/lm.1858010.

Pandey, S. C., Zhang, H., Ugale, R., Prakash, A., Xu, T., and Misra, K. (2008). Effector Immediate-Early Gene Arc in the Amygdala Plays a Critical Role in Alcoholism. *J. Neurosci.* 28, 2589–2600. doi:10.1523/JNEUROSCI.4752-07.2008.

Panzenboeck, U., Balazs, Z., Sovic, A., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Wintersperger, A., et al. (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 42781–42789. doi:10.1074/jbc.M207601200.

Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'connor, E. C., and Lüscher, C. (2014). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509, 459–464. doi:10.1038/nature13257.

Paulson, P. E., Camp, D. M., and Robinson, T. E. (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 103, 480–492. doi:10.1007/BF02244248.

Pelloux, Y., Murray, J. E., and Everitt, B. J. (2013). Differential roles of the prefrontal cortical subregions and basolateral amygdala in compulsive cocaine seeking and relapse after voluntary abstinence in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3018–3026. doi:10.1111/ejn.12289.

Pereira, R. B., Andrade, P. B., and Valentão, P. (2015). A Comprehensive View of the Neurotoxicity Mechanisms of Cocaine and Ethanol. *Neurotox. Res.* 28, 253–267. doi:10.1007/s12640-015-9536-x.

Perry, J. L., Joseph, J. E., Jiang, Y., Zimmerman, R. S., Kelly, T. H., Darna, M., et al. (2011). Prefrontal cortex

and drug abuse vulnerability: Translation to prevention and treatment interventions. *Brain Res. Rev.* 65, 124–149. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.09.001.

Peters, J., Kalivas, P. W., and Quirk, G. J. (2009). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn. Mem.* 16, 279–288. doi:10.1101/lm.1041309.

Peters, J., LaLumiere, R. T., and Kalivas, P. W. (2008a). Infralimbic Prefrontal Cortex Is Responsible for Inhibiting Cocaine Seeking in Extinguished Rats. *J. Neurosci.* 28, 6046–6053. doi:10.1523/JNEUROSCI.1045-08.2008.

Peters, J., Vallone, J., Laurendi, K., and Kalivas, P. W. (2008b). Opposing roles for the ventral prefrontal cortex and the basolateral amygdala on the spontaneous recovery of cocaine-seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 197, 319–326. doi:10.1007/s00213-007-1034-2.

Petrov, A. M., Kasimov, M. R., and Zefirov, A. L. (2016). Brain cholesterol metabolism and its defects: Linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae* 8, 58–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27099785.

Petrov, A. M., and Zefirov, A. L. (2013). [Cholesterol and lipid rafts in the biological membranes. Role in the release, reception and ion channel functions]. *Usp. Fiziol. Nauk* 44, 17–38. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662472.

Pfrieger, F. W. (2003). Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *BioEssays* 25, 72–78. doi:10.1002/bies.10195.

Pfrieger, F. W., and Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.002.

Pierce, R. C., and Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res. Rev.* 25, 192–216. doi:10.1016/S0165-0173(97)00021-0.

Ping, A., Xi, J., Prasad, B. M., Wang, M. H., and Kruzich, P. J. (2008). Contributions of nucleus accumbens core and shell GluR1 containing AMPA receptors in AMPA- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Brain Res.* 1215, 173–182. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.088.

Pohlkamp, T., Wasser, C. R., and Herz, J. (2017). Functional Roles of the Interaction of APP and Lipoprotein Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnmol.2017.00054.

Pollandt, S., Liu, J., Orozco-Cabal, L., Grigoriadis, D. E., Vale, W. W., Gallagher, J. P., et al. (2006). Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation induced by corticotropin-releasing factor at central amygdala glutamatergic synapses via CRF1, NMDA receptors and PKA. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1733–1743. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05049.x.

Prinz, W. A. (2007). Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog. Lipid Res.* 46, 297–314. doi:10.1016/j.plipres.2007.06.002.

Rahbek-Clemmensen, T., Lycas, M. D., Erlendsson, S., Eriksen, J., Apuschkin, M., Vilhardt, F., et al. (2017). Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nat. Commun.* 8. doi:10.1038/s41467-017-00790-3.

Ramirez, D. M. O., Andersson, S., and Russell, D. W. (2008). Neuronal expression and subcellular localization

of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 507, 1676–1693. doi:10.1002/cne.21605.

Ramstedt, B., and Slotte, J. P. (2002). Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett.* 531, 33–37. doi:10.1016/S0014-5793(02)03406-3.

Rassnick, S., Stinus, L., and Koob, G. F. (1993). The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat. *Brain Res.* 623, 16–24. doi:10.1016/0006-8993(93)90004-7.

Rebec, G. V, and Sun, W. (2005). Neuronal Substrates of Relapse to Cocaine-Seeking Behavior: Role of Prefrontal Cortex. *J. Exp. Anal. Behav.* 84, 653–666. doi:10.1901/jeab.2005.105-04.

Reddy, D. S. (2014). Neurosteroids and their role in sex-specific epilepsies. *Neurobiol. Dis.* 72, 198–209. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.010.

Reddy, D. S., and Estes, W. A. (2016). Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 543–561. doi:10.1016/j.tips.2016.04.003.

Reddy, D. S., and Rogawski, M. A. (2012). Neurosteroids as endogenous regulators of seizure susceptibility and use in the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 51, 84. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02870.x.

Reith, M. E. A., Li, M. Y., and Yan, Q. S. (1997). Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers. *Psychopharmacology (Berl).* 134, 309–317. doi:10.1007/s002130050454.

Ressler, K. J. (2010). Amygdala Activity, Fear, and Anxiety: Modulation by Stress. *Biol. Psychiatry* 67, 1117–1119. doi:10.1016/j.biopsych.2010.04.027.

Rich, E. L., and Shapiro, M. (2009). Rat Prefrontal Cortical Neurons Selectively Code Strategy Switches. *J. Neurosci.* 29, 7208–7219. doi:10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009.

Richter, R. M., and Weiss, F. (1999). In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse* 32, 254–261. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(19990615)32:4<254::AID-SYN2>3.0.CO;2-H.

Ripley, T. L., and Stephens, D. N. (2011). Critical thoughts on current rodent models for evaluating potential treatments of alcohol addiction and withdrawal. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1335–1356. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01406.x.

Roberto, M. (2004). Acute and Chronic Ethanol Alter Glutamatergic Transmission in Rat Central Amygdala: an In Vitro and In Vivo Analysis. *J. Neurosci.* 24, 1594–1603. doi:10.1523/JNEUROSCI.5077-03.2004.

Roberto, M., Madamba, S. G., Moore, S. D., Tallent, M. K., and Siggins, G. R. (2003). Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2053–2058. doi:10.1073/pnas.0437926100.

Robinson, T. E. (1984). Behavioral sensitization: Characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 84, 466–475. doi:10.1007/BF00431451.

Robinson, T. E., Gorny, G., Mitton, E., and Kolb, B. (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39, 257–266. doi:10.1002/1098-2396(20010301)39:3<257::AID-SYN1007>3.0.CO;2-1.

Robinson, T. E., and Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47, 33–46. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.025.

Rocha, B. A. (2003). Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 479, 107–115. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.061.

Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., and Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* 196, 189–201. doi:10.1083/jcb.201103008.

Rosa, P., and Fratangeli, A. (2010). Cholesterol and synaptic vesicle exocytosis. *Commun. Integr. Biol.* 3, 352–3. doi:10.1242/jcs.060681.352.

Roses, A. D. (1996). Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 47, 387–400. doi:10.1146/annurev.med.47.1.387.

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., and Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science (80-.).* 325, 1017–1020. doi:10.1126/science.1172545.

Rossetti, Z. L., and Carboni, S. (1995). Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 283, 177–183. doi:10.1016/0014-2999(95)00344-K.

Rossetti, Z. L., Hmaidan, Y., and Gessa, G. L. (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 227–234. doi:10.1016/0014-2999(92)90706-A.

Rougé-Pont, F., Mayo, W., Marinelli, M., Gingras, M., Le Moal, M., and Piazza, P. V. (2002). The neurosteroid allopregnanolone increases dopamine release and dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 16, 169–173. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02084.x.

Rozman, D., and Monostory, K. (2010). Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol. Ther.* 127, 19–40. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.03.007.

Rushworth, M. F. S., Behrens, T. E. J., Rudebeck, P. H., and Walton, M. E. (2007). Contrasting roles for cingulate and orbitofrontal cortex in decisions and social behaviour. *Trends Cogn. Sci.* 11, 168–176. doi:10.1016/j.tics.2007.01.004.

Rushworth, M. F. S., Noonan, M. A. P., Boorman, E. D., Walton, M. E., and Behrens, T. E. (2011). Frontal Cortex and Reward-Guided Learning and Decision-Making. *Neuron* 70, 1054–1069. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.014.

Russell, D. W., Halford, R. W., Ramirez, D. M. O., Shah, R., and Kotti, T. (2009). Cholesterol 24-Hydroxylase: An Enzyme of Cholesterol Turnover in the Brain. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 1017–1040. doi:10.1146/annurev.biochem.78.072407.103859.

Russo, S. J., and Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609–25. doi:10.1038/nrn3381.

Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., and Malenka, R. C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic

adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37, 577–582. doi:10.1016/S0896-6273(03)00021-7.

Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., and Mahmoudi, J. (2015). Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. *Med. Princ. Pract.* 24, 1–10. doi:10.1159/000369101.

Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R. I., Wehr, M. C., et al. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* 8, 468–475. doi:10.1038/nn1426.

Saher, G., and Stumpf, S. K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 1083–1094. doi:10.1016/j.bbalip.2015.02.010.

Samara, A., Galbiati, M., Luciani, P., Deledda, C., Messi, E., Peri, A., et al. (2014). Altered expression of 3-betahydroxysterol delta-24-reductase/selective Alzheimer's disease indicator-1 gene in Huntington's disease models. *J. Endocrinol. Invest.* 37, 729–737. doi:10.1007/s40618-014-0098-1.

Samson, H. H. (1986). Initiation of Ethanol Reinforcement using a Sucrose-Substitution Procedure in Food- and Water-Sated Rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10, 436–442. doi:10.1111/j.1530-0277.1986.tb05120.x.

Sanna, E. (2004). Brain Steroidogenesis Mediates Ethanol Modulation of GABAA Receptor Activity in Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 6521–6530. doi:10.1523/JNEUROSCI.0075-04.2004.

Sarti, F., Borgland, S. L., Kharazia, V. N., and Bonci, A. (2007). Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 26, 749–756. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05689.x.

Schoenbaum, G., and Shaham, Y. (2008). The Role of Orbitofrontal Cortex in Drug Addiction: A Review of Preclinical Studies. *Biol. Psychiatry* 63, 256–262. doi:10.1016/j.biopsych.2007.06.003.

Schramm-Sapyta, N. L., Olsen, C. M., and Winder, D. G. (2006). Cocaine self-administration reduces excitatory responses in the mouse nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology* 31, 1444–1451. doi:10.1038/sj.npp.1300918.

Schumacher, M. M., Elsabrouty, R., Seemann, J., Jo, Y., and DeBose-Boyd, R. A. (2015). The prenyltransferase UBIAD1 is the target of geranylgeraniol in degradation of HMG CoA reductase. *Elife* 2015. doi:10.7554/eLife.05560.

Seamans, J. K., Gorelova, N., Durstewitz, D., and Yang, C. R. (2001). Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 21, 3628–38. doi:21/10/3628 [pii].

Sebastião, A. M., Colino-Oliveira, M., Assaife-Lopes, N., Dias, R. B., and Ribeiro, J. A. (2013). Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: Impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* 64, 97–107. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.053.

Segatto, M., Manduca, A., Lecis, C., Rosso, P., Jozwiak, A., Swiezewska, E., et al. (2014). Simvastatin treatment highlights a new role for the isoprenoid/cholesterol biosynthetic pathway in the modulation of emotional reactivity and cognitive performance in rats. *Neuropsychopharmacology* 39, 841–54. doi:10.1038/npp.2013.284.

Sesack, S. R., and Grace, A. A. (2010). Cortico-basal ganglia reward network: Microcircuitry.

Neuropsychopharmacology 35, 27–47. doi:10.1038/npp.2009.93.

Shafaati, M., Mast, N., Beck, O., Nayef, R., Heo, G. Y., Lütjohann, D., et al. (2010). The antifungal drug voriconazole is an effi cient inhibitor of brain cholesterol 24S-hydroxylase in vitro and in vivo. 51, 318–323. doi:10.1194/jlr.M900174-JLR200.

Shaham, Y., and Hope, B. T. (2005). The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. *Nat. Neurosci.* 8, 1437–1439. doi:10.1038/nn1105-1437.

Sharpe, L. J., and Brown, A. J. (2013). Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J. Biol. Chem.* 288, 18707–18715. doi:10.1074/jbc.R113.479808.

Shen, H. -w., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D. S., and Kalivas, P. W. (2009). Altered Dendritic Spine Plasticity in Cocaine-Withdrawn Rats. *J. Neurosci.* 29, 2876–2884. doi:10.1523/JNEUROSCI.5638-08.2009.

Silvius, J. R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: Lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1610, 174–183. doi:10.1016/S0005-2736(03)00016-6.

Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., et al. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1816–1823. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x.

Smith, L. N., Penrod, R. D., Taniguchi, M., and Cowan, C. W. (2016). Assessment of Cocaine-induced Behavioral Sensitization and Conditioned Place Preference in Mice. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/53107.

Snell, L. D., Nunley, K. R., Lickteig, R. L., Browning, M. D., Tabakoff, B., and Hoffman, P. L. (1996). Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Mol. Brain Res.* 40, 71–78. doi:10.1016/0169-328X(96)00038-1.

Soccio, R. E., and Breslow, J. L. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1150–1160. doi:10.1161/01.ATV.0000131264.66417.d5.

Sodero, A. O., Vriens, J., Ghosh, D., Stegner, D., Brachet, A., Pallotto, M., et al. (2012). Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J.* 31, 1764–1773. doi:10.1038/emboj.2012.31.

Song, B. L., Javitt, N. B., and DeBose-Boyd, R. A. (2005). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* 1, 179–189. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.001.

Song, S., Cong, W., Zhou, S., Shi, Y., Dai, W., Zhang, H., et al. (2018). Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* doi:10.1016/j.ajps.2018.06.004.

Sorkina, T., Caltagarone, J., and Sorkin, A. (2013). Flotillins Regulate Membrane Mobility of the Dopamine Transporter but Are Not Required for Its Protein Kinase C Dependent Endocytosis. *Traffic* 14, 709–724. doi:10.1111/tra.12059.

Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans [published erratum appears in Psychol Rev 1992 Jul;99(3):582]. *Psychol.Rev.* 99, 195–231. doi:10.1037//0033-295X.99.2.195.

Stankeviciute, N. M., Scofield, M. D., Kalivas, P. W., and Gipson, C. D. (2014). Rapid, transient potentiation

of dendritic spines in context-induced relapse to cocaine seeking. *Addict. Biol.* 19, 972–974. doi:10.1111/adb.12064.

Steffensen, S. C., Svingos, A. L., Pickel, V. M., and Henriksen, S. J. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 18, 8003–8015. doi:10.1109/COGINF.2004.1327483.

Steketee, J. D., and Kalivas, P. W. (2011). Drug Wanting : Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. 63, 348–365. doi:10.1124/pr.109.001933.remains.

Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J. F. (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol. Pharm.* 10, 1473–1491. doi:10.1021/mp300518e.

Ströhle, A., Romeo, E., Hermann, B., Pasini, A., Spalletta, G., Di Michele, F., et al. (1999). Concentrations of 3α-reduced neuroactive steroids and their precursors in plasma of patients with major depression and after clinical recovery. *Biol. Psychiatry* 45, 274–277. doi:10.1016/S0006-3223(98)00328-X.

Stuber, G. D., Britt, J. P., and Bonci, A. (2012). Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking. *Biol. Psychiatry* 71, 1061–1067. doi:10.1016/j.biopsych.2011.11.010.

Stuber, G. D., Hopf, F. W., Hahn, J., Cho, S. L., Guillory, A., and Bonci, A. (2008). Voluntary ethanol intake enhances excitatory synaptic strength in the ventral tegmental area. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1714–1720. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00749.x.

Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* 9, 321–353. doi:10.1016/0361-9230(82)90145-9.

Szalay, J. J., Jordan, C. J., and Kantak, K. M. (2013). Neural regulation of the time course for cocaine-cue extinction consolidation in rats. *Eur. J. Neurosci.* 37, 269–277. doi:10.1111/ejn.12035.

Szalay, J. J., Morin, N. D., and Kantak, K. M. (2011). Involvement of the dorsal subiculum and rostral basolateral amygdala in cocaine cue extinction learning in rats. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1299–1307. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07581.x.

Szumlinski, K. K., Ary, A. W., Lominac, K. D., Klugmann, M., and Kippin, T. E. (2008). Accumbens Homer2 overexpression facilitates alcohol-induced neuroplasticity in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology* 33, 1365–1378. doi:10.1038/sj.npp.1301473.

Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., et al. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron* 73, 1173–1183. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.015.

Tanzi, R. E., and Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 120, 545–555. doi:10.1016/j.cell.2005.02.008.

Tashiro, A. (2000). Regulation of Dendritic Spine Morphology by the Rho Family of Small GTPases: Antagonistic Roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* 10, 927–938. doi:10.1093/cercor/10.10.927.

Tashiro, A., and Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: Evidence for two forms of spine motility. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 429–440.

doi:10.1016/j.mcn.2004.04.001.

Thomas, M. J., Beurrier, C., Bonci, A., and Malenka, R. C. (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: A neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat. Neurosci.* 4, 1217–1223. doi:10.1038/nn757.

Thompson, T., and Schuster, C. R. (1964). MORPHINE SELF-ADMINISTRATION, FOOD-REINFORCED, AND AVOIDANCE BEHAVIORS IN RHESUS MONKEYS. *Psychopharmacologia* 5, 87–94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14137126.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., et al. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. doi:10.1124/pr.109.002451.

Trevisan, L., Fitzgerald, L. W., Brose, N., Gasic, G. P., Heinemann, S. F., Duman, R. S., et al. (2008). Rapid Communication Chronic Ingestion of Ethanol Up-Regulates NMDAR1 Receptor Subunit Immunoreactivity in Rat Hippocampus. *J. Neurochem.* 62, 1635–1638. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62041635.x.

Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25, 412–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127758.

Tulving, E., and Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus* 8, 198–204. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G.

Tzschentke, T. M. (2000). Differential Effects of Discrete Subarea-specific Lesions of the Rat Medial Prefrontal Cortex on Amphetamine- and Cocaine-induced Behavioural Sensitization. *Cereb. Cortex* 10, 488–498. doi:10.1093/cercor/10.5.488.

Tzschentke, T. M., and Schmidt, W. J. (1998). Discrete quinolinic acid lesions of the rat prelimbic medial prefrontal cortex affect cocaine- and MK-801-, but not morphine- and amphetamine- induced reward and psychomotor activation as measured with the place preference conditioning paradigm. *Behav. Brain Res.* 97, 115–127. doi:10.1016/S0166-4328(98)00034-5.

Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C., and Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411, 583–587. doi:10.1038/35079077.

Urano, Y., Ochiai, S., and Noguchi, N. (2013). Suppression of amyloid-β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J.* 27, 4305–4315. doi:10.1096/fj.13-231456.

Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146, 3–17. doi:10.1016/j.bbr.2003.09.028.

Uys, J. D., McGuier, N. S., Gass, J. T., Griffin, W. C., Ball, L. E., and Mulholland, P. J. (2016). Chronic intermittent ethanol exposure and withdrawal leads to adaptations in nucleus accumbens core postsynaptic density proteome and dendritic spines. *Addict. Biol.* 21, 560–574. doi:10.1111/adb.12238.

Valenza, M. (2005). Dysfunction of the Cholesterol Biosynthetic Pathway in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 25, 9932–9939. doi:10.1523/JNEUROSCI.3355-05.2005.

Valenza, M., Leoni, V., Karasinska, J. M., Petricca, L., Fan, J., Carroll, J., et al. (2010). Cholesterol Defect Is Marked across Multiple Rodent Models of Huntington's Disease and Is Manifest in Astrocytes. *J. Neurosci.* 30, 10844–10850. doi:10.1523/JNEUROSCI.0917-10.2010.

Valenza, M., Leoni, V., Tarditi, A., Mariotti, C., Björkhem, I., Di Donato, S., et al. (2007). Progressive dysfunction of the cholesterol biosynthesis pathway in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 28, 133–142. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.004.

Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Aubier, B., Greengard, P., Hervé, D., and Girault, J. A. (2010). Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology* 35, 401–415. doi:10.1038/npp.2009.143.

Vallée, M. (2016). Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 78–87. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.09.030.

Vallée, M., Vitiello, S., Bellocchio, L., Hebert-Chatelain, E., Monlezun, S., Martin-Garcia, E., et al. (2014). Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science (80-.).* 343, 94–98. doi:10.1126/science.1243985.

Van Den Oever, M. C., Spijker, S., and Smit, A. B. (2012). The synaptic pathology of drug addiction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 469–491. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8_21.

van Ree, J. M., Slangen, J. L., and de Wied, D. (1978). Intravenous self-administration of drugs in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204, 547–57. doi:10.1016/j.ecolecon.2007.11.004.

Van Zessen, R., Phillips, J. L., Budygin, E. A., and Stuber, G. D. (2012). Activation of VTA GABA Neurons Disrupts Reward Consumption. *Neuron* 73, 1184–1194. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.016.

Vance, J. E. (2010). Transfer of cholesterol by the NPC team. *Cell Metab.* 12, 105–106. doi:10.1016/j.cmet.2010.07.004.

Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* 5, 746–755. doi:10.1242/dmm.010124.

Vanderschuren, L. J. M. J., and Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: A critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl).* 151, 99–120. doi:10.1007/s002130000493.

Vaughan, R. A., and Foster, J. D. (2013). Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 489–496. doi:10.1016/j.tips.2013.07.005.

Veinbergs, I., Jung, M. W., Young, S. J., Van Uden, E., Groves, P. M., and Masliah, E. (1998). Altered long-term potentiation in the hippocampus of apolipoprotein E- deficient mice. *Neurosci. Lett.* 249, 71–74. doi:10.1016/S0304-3940(98)00399-1.

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., and Spanagel, R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 299–315. doi:10.1038/bjp.2008.30.

Vitali, C., Wellington, C. L., and Calabresi, L. (2014). HDL and cholesterol handling in the brain. *Cardiovasc. Res.* 103, 405–413. doi:10.1093/cvr/cvu148.

Vizi, E. S., and Kiss, J. P. (1998). Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter

systems: Synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 8, 566–607. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<566::AID-HIPO2>3.0.CO;2-W.

Volkow, N. D. (2010). Drugs, Brain and Behaviour. The science of addiction. *Nida reports*, 1–36. doi:10.1037//1091-7527.25.3.347.

Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., and Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 559–577. doi:10.1097/00005072-198511000-00003.

Wang, H. (2014). Lipid rafts: a signaling platform linking cholesterol metabolism to synaptic deficits in autism spectrum disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 1–6. doi:10.3389/fnbeh.2014.00104.

Wang, J., Carnicella, S., Phamluong, K., Jeanblanc, J., Ronesi, J. A., Chaudhri, N., et al. (2007a). Ethanol Induces Long-Term Facilitation of NR2B-NMDA Receptor Activity in the Dorsal Striatum: Implications for Alcohol Drinking Behavior. *J. Neurosci.* 27, 3593–3602. doi:10.1523/JNEUROSCI.4749-06.2007.

Wang, J., Lanfranco, M. F., Gibb, S. L., and Ron, D. (2011). Ethanol-mediated long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum. *Channels* 5. doi:10.4161/chan.5.3.14856.

Wang, M. L., Motamed, M., Infante, R. E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H. J., Brown, M. S., et al. (2010). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab.* 12, 166–173. doi:10.1016/j.cmet.2010.05.016.

Wang, N., Yvan-Charvet, L., Lutjohann, D., Mulder, M., Vanmierlo, T., Kim, T.-W., et al. (2007b). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* 22, 1073–1082. doi:10.1096/fj.07-9944com.

Wang, Y., Rogers, P. M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K. R., and Burris, T. P. (2008). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRα. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339. doi:10.1074/jbc.M804808200.

Washburn, S., and Dingledine, R. (1996). Block of a-Amino--3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Polyamines and Polyamine Toxins. *J Neurosci* 278, 669–78.

Wassum, K. M., and Izquierdo, A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 57, 271–283. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.08.017.

Wayner, M. J., and Greenberg, I. (1972). Effects of hypothalamic stimulation, acclimation and periodic withdrawal on ethanol consumption. *Physiol. Behav.* 9, 737–740. doi:10.1016/0031-9384(72)90043-1.

Weeks, J. R. (1962). Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science* 138, 143–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14005543.

Weiss, F., Maldonado-vlaar, C. S., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Smith, D. L., and Ben-shahar, O. (2000). Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4321–4326. doi:97/8/4321 [pii].

Weitlauf, C. (2004). High-Frequency Stimulation Induces Ethanol-Sensitive Long-Term Potentiation at Glutamatergic Synapses in the Dorsolateral Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *J. Neurosci.* 24, 5741–

5747. doi:10.1523/JNEUROSCI.1181-04.2004.

Weitlauf, C., and Woodward, J. J. (2008). Ethanol selectively attenuates nmdar-mediated synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 690–698. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00625.x.

Wellington, C. L., Walker, E. K. Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., et al. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Investig.* 82, 273–283. doi:10.1038/labinvest.3780421.

Willinger, U. (2002). Anxiety As a Predictor of Relapse in Detoxified Alcohol-Dependent Patients. *Alcohol Alcohol.* 37, 609–612. doi:10.1093/alcalc/37.6.609.

Wise, R. A. (1973). Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia* 29, 203–210. doi:10.1007/BF00414034.

Wolf, M. E., Dahlin, S. L., Hu, X. T., Xue, C. J., and White, K. (1995). Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: Comparison with N-methyl-d-aspartate antagonists. *Neuroscience* 69, 417–439. doi:10.1016/0306-4522(95)00248-H.

Wolf, M. E., and Roth, R. H. (1990). Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 604, 323–43. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb32003.x.

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., et al. (2009). ABCG2 Is Upregulated in Alzheimer's Brain with Cerebral Amyloid Angiopathy and May Act as a Gatekeeper at the Blood-Brain Barrier for A 1-40 Peptides. *J. Neurosci.* 29, 5463–5475. doi:10.1523/JNEUROSCI.5103-08.2009.

Xu, Q. (2006). Profile and Regulation of Apolipoprotein E (ApoE) Expression in the CNS in Mice with Targeting of Green Fluorescent Protein Gene to the ApoE Locus. *J. Neurosci.* 26, 4985–4994. doi:10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006.

Yeh, S. Y., and Haertzen, C. A. (1991). Cocaine-induced locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 723–727. doi:10.1016/0091-3057(91)90154-T.

Yin, H. H., Park, B. S., Adermark, L., and Lovinger, D. M. (2007). Ethanol reverses the direction of long-term synaptic plasticity in the dorsomedial striatum. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3226–3232. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05606.x.

You, C., Zhang, H., Sakharkar, A. J., Teppen, T., and Pandey, S. C. (2014). Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 313–322. doi:10.1017/S1461145713001144.

Záborszky, L., Alheid, G. F., Beinfeld, M. C., Eiden, L. E., Heimer, L., and Palkovits, M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: A morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 14. doi:10.1016/0306-4522(85)90302-1.

Zeppelin, T., Ladefoged, L. K., Sinning, S., Periole, X., and Schiøtt, B. (2018). A direct interaction of cholesterol with the dopamine transporter prevents its out-to-inward transition. *PLoS Comput. Biol.* 14, 1–24. doi:10.1371/journal.pcbi.1005907.

Zhang, F. L., and Casey, P. J. (1996). Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241–269. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.001325.

Zhang, T. A., Hendricson, A. W., and Morrisett, R. A. (2005). Dual synaptic sites of D1-dopaminergic regulation of ethanol sensitivity of NMDA receptors in nucleus accumbens. *Synapse* 58, 30–44. doi:10.1002/syn.20181.

Zhou, F. C., Anthony, B., Dunn, K. W., Lindquist, W. B., Xu, Z. C., and Deng, P. (2007). Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens. *Brain Res.* 1134, 148–161. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.046.