

Le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets comportementaux chez le souris Swiss : effets hypothermiques, sédatifs et aversifs

Auteur : Lespine, Louis-Ferdinand

Promoteur(s) : Quertemont, Etienne

Faculté : Faculté de Psychologie, Logopédie et Sciences de l'Éducation

Diplôme : Master en sciences psychologiques, à finalité spécialisée en neuroscience cognitive et comportementale

Année académique : 2011-2012

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier mon promoteur, le Professeur Etienne Quertemont, pour sa confiance, sa disponibilité, et ses conseils.

Je remercie également mes deux lecteurs, le Professeur Ezio Tirelli et le Professeur Michel Hansenne pour avoir accepté d'évaluer ce travail de fin d'études.

J'adresse ensuite toute ma gratitude à Catherine Closon, pour le temps qu'elle m'a consacré et les nombreuses choses qu'elle m'a apprises. Elle a permis que ce travail se déroule dans des conditions optimales et je l'en remercie vivement.

Je voudrais aussi remercier les doctorants du service, Vincent Didone et Caroline Quoilin notamment, pour leur aide et leurs conseils.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mon parcours académique et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en particulier.

TABLE DES MATIERES

I. Bases théoriques.....	4
1. Introduction	5
2. Métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde	7
2.1. Métabolisation de l'éthanol	7
2.2.2. L'alcool déshydrogénase	8
2.2.2. Le système microsomal d'oxydation de l'éthanol	10
2.2.3. La catalase	11
2.2. Métabolisation de l'acétaldéhyde	13
2.2.2. L'aldéhyde déshydrogénase.....	13
2.2.2. Le système microsomal d'oxydation de l'acétaldéhyde	14
3. Principales stratégies utilisées pour étudier le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets neurocomportementaux de l'éthanol	15
3.1. L'administration aiguë d'acétaldéhyde	15
3.2. La manipulation des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'éthanol	15
3.3. L'inactivation de l'acétaldéhyde	17
3.4. Autres stratégies	18
4. Rôle de l'acétaldéhyde dans les effets comportementaux de l'alcool	19
4.1. Effets hypothermiques	19
4.2. Effets sédatifs	22
4.3. Effets stimulants.....	26
4.4. Effets hédoniques/renforçants.....	29
5. L'aversion gustative conditionnée	32
II. Méthodologie	35
1. Sujets	36
2. Substances	36
3. Dispositifs.....	38
3.1. Mesure de l'hypothermie.....	38
3.2. Mesure de la perte du réflexe de retournement.....	38

3.3. Mesure de l'aversion gustative	38
4. Procédures	39
4.1. Effet de la D-pénicillamine sur l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde	39
4.2. Effet de la D-pénicillamine sur la sédation induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde ...	40
4.3. Effets aversifs de l'éthanol et l'acétaldéhyde et évaluation du rôle du stimulus conditionnel dans ces effets	41
5. Analyses statistiques	43
III. Résultats.....	44
1. Effet de la D-pénicillamine sur l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde	45
1.1. Expérience 1: D-p / Ethanol (1.5 et 3g/kg)	45
1.2. Expérience 2: D-p / Acétaldéhyde (170 et 300mg/kg)	47
2. Effet de la D-pénicillamine sur la sédation induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde	49
2.1. Expériences 3 et 4: D-p / Ethanol (4g/kg) ou Acétaldéhyde (300mg/kg).....	49
3. Investigation des effets aversifs de l'éthanolet de l'acétaldéhyde et rôle du SC	51
3.1. Mise au point.....	51
3.2. Conditionnement.....	52
3.3. Test (two bottle choice)	54
3.4. Rôle du sel.....	55
3.4.1. Test (two bottle choice)	56
IV. Discussion	59
1. Rôle de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques et sédatifs de l'éthanol	60
1.1. Effets hypothermiques	60
1.2. Effets sédatifs	61
2. Rôle de l'acétaldéhyde dans les effets aversifs de l'éthanol.....	64
2.1. Statut du NaCl.....	65
2.2. Statut de la théorie de comparaison des renforçateurs	69
V. Bibliographie	72

I. Bases Théoriques

1. Introduction

Le terme « alcool » désigne une famille de molécules parmi lesquelles se trouve l'éthanol (ou alcool éthylique), présent dans les boissons alcoolisées. Il s'agit d'une molécule simple, psychoactive et produite à partir de la fermentation des sucres. Dans le langage courant, l'appellation « alcool » est majoritaire et fait donc référence à l'éthanol. Son caractère légal ainsi que son utilisation récréative socialement acceptée en fait une substance largement accessible dans la plupart des pays. L'alcool est d'ailleurs le psychotrope le plus consommé au monde après la caféine (Meyer & Quenzer, 2005).

L'intoxication aiguë d'alcool augmente le risque de blessures par accident ou agression. Sa consommation chronique entraîne un certain nombre de pathologies physiques (différentes formes de cancers, maladies hépatiques et pancréatiques, troubles cognitifs) et psychologiques (abus et dépendance), aux conséquences sociale et familiale importantes. Le coût socio-économique associé à l'abus d'alcool et l'alcoolisme est énorme et la recherche scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années à ses effets, sur le comportement notamment.

Malgré une recherche importante dans le domaine, les mécanismes psychopharmacologiques de l'alcool ne sont que partiellement compris. C'est le cas entre autres du rôle de l'acétaldéhyde, premier métabolite de l'éthanol. Ce métabolite actif a été impliqué dans certains effets de l'alcool (Quertemont et al., 2005b). Toutefois, le domaine reste controversé. Alors que certains chercheurs rejettent l'idée d'une implication de l'acétaldéhyde dans les effets de son précurseur, d'autres défendent l'idée qu'il en soit le médiateur, reléguant l'éthanol au statut de pro-drogue. Comme nous le verrons, il est fort probable que la réalité se situe entre ces deux extrêmes.

Ce travail aura pour objectif d'étudier le rôle potentiel de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques, sédatifs et aversifs de l'éthanol.

La première partie abordera le métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde ainsi qu'une brève revue de la littérature concernant l'implication de l'acétaldéhyde dans les effets qui nous intéressent dans le cadre de ce travail.

La deuxième partie détaillera la méthodologie utilisée : sujets, substances, matériel et procédures expérimentales. Les analyses statistiques seront également présentées.

Nous aborderons dans la troisième partie les résultats des expériences, illustrés à l'aide de graphiques.

Enfin, ces résultats seront interprétés et discutés à la lumière des données disponibles dans la littérature scientifique.

2. Métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde

L'éthanol est principalement éliminé par dégradation métabolique (environ 90% de l'alcool ingéré), le reste étant excrété sous forme inchangée par l'air expiré, les urines et la sueur (Lands, 1998).

La métabolisation de l'éthanol se déroule en deux étapes. Il est d'abord métabolisé en acétaldéhyde *via* plusieurs systèmes enzymatiques et non-enzymatiques d'oxydation. L'acétaldéhyde est ensuite métabolisé en acétate (ou acide acétique) par différents systèmes enzymatiques d'oxydation (voir Figure 1.).

2.1. Métabolisation de l'éthanol

La majeure partie du métabolisme de l'éthanol a lieu dans le foie. L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde s'effectue principalement selon trois voies enzymatiques : l'alcool déshydrogénase (ADH), le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS), faisant intervenir le cytochrome P450-2E1 (CYP2E1) et la catalase.

L'acétaldéhyde peut aussi être formé par une voie radicalaire, résultant de la réaction de l'éthanol avec des radicaux hydroxyles (-OH), générés lors du métabolisme de l'éthanol.

L'éthanol peut également former de l'éthyle ester d'acide gras par une voie enzymatique non-oxydative (Lieber, 1997). Cette réaction s'observe surtout au niveau des tissus ou d'organes dépourvus de propriétés oxydatives de l'éthanol, comme le cœur (Beckmeier & Bora, 1998).

Enfin, à noter que deux autres métabolites de l'éthanol ont été identifiés : l'éthyle glucuronide et le phosphatidyléthanol, également formés par voie non-oxydative (Aradottir et al., 2004 ; Wurst et al., 2003).

Nous allons décrire de manière plus détaillée les trois systèmes oxydatifs de l'éthanol, ainsi que certains polymorphismes génétiques, parfois associés à différents types de consommation.

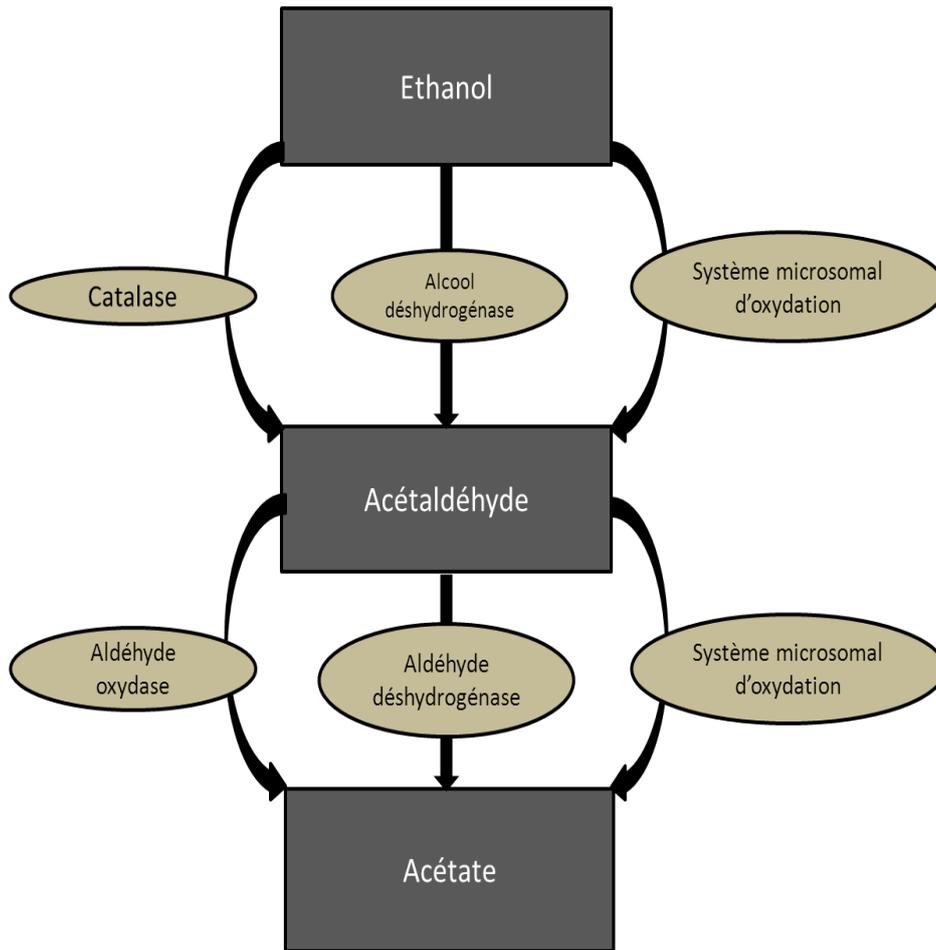


Figure 1. Principales voies métaboliques de l'éthanol et de l'acétaldéhyde.

2.1.1. L'alcool déshydrogénase (ADH)

Il s'agit d'une enzyme cytosolique, représentant la voie principale du métabolisme de l'éthanol dans le foie et utilisant le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) comme cofacteur (Quertemont, 2004).

Six classes d'ADH ont été identifiées chez les mammifères et catégorisées selon leurs séquences d'alignement des acides aminés, leurs propriétés catalytiques et leurs modes d'expression génique (Duester et al., 1999 ; Jörnvall et al., 1997). Chez l'homme, seules les classes I, II, III, IV et V ont été décrites même si, dans des conditions physiologiques normales, les classes I, II et IV semblent être les isoformes les plus impliquées dans le métabolisme de l'éthanol (Quertemont, 2004). Chez la souris, seules les classes I, II, III et IV

ont été rapportées. Enfin, la classe VI a seulement été observée chez le rat et la souris sylvestre (ou « souris du soir ») (Höög & Brandt, 1995).

Les enzymes de la classe I sont les plus impliquées dans le métabolisme hépatique de l'éthanol. Elles se trouvent principalement dans le foie et possèdent une forte affinité pour l'éthanol (K_m ou constante de Michaelis¹ < 5mM). Elles jouent donc un rôle majeur dans son métabolisme. Il existe plusieurs variants génétiques : *ADH1A*, *ADH1B* et *ADH1C* dont les enzymes diffèrent quant à leur efficacité oxydative (Duester et al., 1999). Chez l'homme ont été identifiés des polymorphismes génétiques, avec trois allèles pour l'ADH1B : *ADH1B*1*, *ADH1B*2* et *ADH1B*3* et deux allèles pour l'ADH1C : *ADH1C*1* et *ADH1C*2*.

Les enzymes ADH1B2, ADH1B3 et ADH1C1 possèdent une activité enzymatique plus importante (Edenberg, 2000), ce qui suggère une oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde plus rapide.

La fréquence des allèles codant pour l'ADH de la classe I diffère selon les ethnies et différentes études ont pu établir certains liens entre ces polymorphismes et les habitudes de consommation (pour revue, voir Quertemont, 2004). Dans la plupart des populations, l'allèle *ADH1B*1* est prédominant, alors que l'*ADH1B*2* est le plus courant chez les Asiatiques. Par ailleurs, les Caucasiens partagent à fréquence égale les allèles *ADH1C*1* et *ADH1C*2* alors que l'*ADH1C*1* prédomine chez les Asiatiques. Cette population est d'ailleurs connue pour sa moindre susceptibilité à l'abus d'alcool et l'alcoolisme. Comme mentionné plus haut, l'allèle *ADH1B*2* code pour une enzyme très active et est associé à une diminution du risque de consommation excessive d'alcool. Le fait que l'*ADH1B*2* soit « protecteur » contre l'abus d'alcool et l'alcoolisme s'observe dans toutes les ethnies pour lesquelles cet allèle est prévalent. Selon certains, cette « protection » serait due aux effets désagréables associés à l'accumulation systémique d'acétaldéhyde après une consommation d'alcool (Yin, 1994).

Les ADHs de la classe II possèdent une affinité moindre pour l'éthanol par rapport aux ADH1. Par conséquent, elles jouent un rôle moins important dans son métabolisme. Chez les rongeurs, ces enzymes possèdent une faible efficacité oxydative de l'éthanol (Höög et al., 2001).

¹ Constante de Michaelis : représente la concentration de substrat à laquelle la vitesse de réaction enzymatique est à la moitié de sa vitesse maximale et se mesure en millimole (mmol). Une enzyme possédant un K_m faible pour un substrat possède une affinité forte pour celui-ci.

Les enzymes de la classe III ont été détectés dans tous les tissus, y compris le cerveau. Elles représenteraient les « ancêtres » de l'ADH. Elles possèdent un Km élevé pour l'éthanol, d'où une faible affinité pour ce dernier. Elles pourraient néanmoins participer au métabolisme de premier passage digestif² (Lee et al., 2003) et expliquer les différences entre hommes et femmes à ce niveau, ces dernières possédant une activité ADH3 plus faible (Baraona et al., 2001).

Les enzymes de la classe IV montrent également une faible affinité pour l'éthanol (Quertemont, 2004) mais contribueraient aussi au métabolisme de premier passage digestif.

Les enzymes de la classe V, présentes chez l'homme, et la classe VI chez le rat sont encore mal caractérisées. Chez l'homme, l'ARNmessenger a été identifié dans le foie et l'estomac mais la protéine n'a pas été purifiée. Leurs propriétés ainsi que leurs implications dans le métabolisme de l'éthanol restent à déterminer.

2.1.2. Le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS)

Bien que l'alcool déshydrogénase constitue la voie d'oxydation principale de l'éthanol, d'autres systèmes oxydatifs ont été identifiés, comme le système microsomal d'oxydation de l'éthanol, faisant principalement intervenir le cytochrome P450-2E1 (CYP2E1) (Lieber & Decarli, 1968).

Le CYP2E1 se retrouve dans le foie mais aussi dans les tissus extra-hépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau, lymphocytes). Ces enzymes membranaires sont localisées dans le réticulum endoplasmique lisse et utilisent le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH) et l'oxygène (O₂) comme cofacteurs. Dans le foie, ce système est responsable du métabolisme de l'éthanol n'étant pas pris en charge par la voie de l'ADH (Lieber, 1997). Néanmoins, le CYP2E1 possède une efficacité catalytique faible (Km de 10 mM) et n'est donc responsable que d'une faible partie du métabolisme total (Quertemont, 2004).

² Une métabolisation peut se produire lors de l'absorption intestinale

Contrairement à l'ADH, cette enzyme est inductible par l'éthanol. Cette induction s'observe à la suite de l'administration d'une dose forte d'éthanol (4 g/kg chez le rat) (Petersen et al., 1982), ou au cours d'une alcoolisation chronique (Roberts et al., 1994), induisant dans les deux cas une augmentation de l'activité du cytochrome. En favorisant ainsi la dégradation de l'éthanol, l'inductibilité du CYP2E1 participe fortement à la tolérance métabolique à l'éthanol (Lieber, 1999). Différentes études indiquent que cette voie participe à la formation d'acétaldéhyde dans le cerveau (Yadav et al., 2006 ; Zitmakin et al., 2006). Néanmoins, la catalase constitue la voie oxydative cérébrale principale de l'éthanol.

Les études montrent que dans le cerveau, la catalase participe environ à 50-70% de l'acétaldéhyde formé et 20 à 30% pour le CYP2E1 (Zitmakin, 2006). Le CYP2E1 joue donc un rôle moins important et constituerait notamment une source de peroxyde d'hydrogène (Vasiliou et al., 2006). Toutefois, à l'instar du CYP2E1 hépatique, celui-ci est aussi inductible dans le cerveau par une administration chronique d'éthanol (Anandatheerthavarada et al., 1993). Une des conséquences notables de ce mécanisme est l'augmentation des concentrations d'acétaldéhyde ; conséquence importante lorsque nous traiterons des effets centraux du métabolite.

Certains polymorphismes génétiques ont été décrits chez l'homme (Hu et al., 1997), mais leurs effets sur la susceptibilité à développer un alcoolisme restent controversés. Rares sont les études établissant un lien entre ces variants génétiques et des types de consommation particuliers.

2.1.3. La catalase

Cette enzyme est localisée au niveau des peroxysomes (Oshino et al., 1973) et constitue la troisième voie enzymatique d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde.

Cette réaction est dépendante du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans des conditions physiologiques normales, la présence de peroxyde d'hydrogène étant limitée, la catalase ne joue qu'un rôle mineur dans le métabolisme de l'éthanol (Lieber, 1999). Sa contribution

s'accroît néanmoins lorsque la quantité de peroxyde d'hydrogène augmente (Handler & Thurman, 1985).

Alors qu'elle représente une voie enzymatique hépatique mineure, elle constitue la voie dominante du métabolisme cérébral de l'éthanol (Jamal et al., 2007 ; Zitmakin, 2006). En effet, dans le cerveau, l'ADH ne semble pas physiologiquement active (Zimatkin & Deitrich 1997) et le CYP2E1 ne participe que dans une moindre mesure (Zakhari, 2006). A noter que d'autres processus du métabolisme de l'éthanol dans le cerveau restent à identifier.

A la fin des années 70, on pensait qu'il n'existait pas dans le cerveau de système d'oxydation de l'éthanol, et que par conséquent, les concentrations d'acétaldéhyde étaient trop faibles pour diffuser dans le cerveau, dont la microvascularité contient de surcroît de l'aldéhyde déshydrogénase (métabolisant l'acétaldéhyde en acétate). Dans cette perspective, l'acétaldéhyde ne pouvait pas induire d'effets neuropharmacologiques et comportementaux significatifs.

La découverte de ces propriétés d'oxydation de l'éthanol dans le cerveau a légitimé l'étude du rôle de l'acétaldéhyde dans les effets centraux de l'éthanol.

Un certain nombre de preuves indique que des quantités significatives d'acétaldéhyde sont formées dans le cerveau après administration d'alcool (Aragon et al., 1991b ; Jamal et al., 2007 ; Zimatkin & Deitrich, 1997 ; Zimatkin et al., 1998) et que le métabolite participe à certains effets comportementaux de l'éthanol (Quertemont et al., 2005a; Quertemont et al., 2005b).

2.2. Métabolisation de l'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde, métabolite de l'éthanol, est principalement produit dans le foie par l'alcool déshydrogénase. Il est rapidement métabolisé en acétate via trois systèmes enzymatiques : l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), le système microsomal d'oxydation de l'acétaldéhyde et l'aldéhyde oxydase. L'acétate peut ensuite être incorporé dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl coenzyme A, pouvant être oxydée en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau (H₂O).

L'acétaldéhyde est une substance très réactive et peut former des adduits en réagissant avec un certain nombre de molécules. Ces produits peuvent alors exercer différents effets. Par exemple, les adduits issus de la réaction de l'acétaldéhyde avec certaines catécholamines semblent impliqués dans les effets renforçants (Quertemont & Didone, 2006).

Représentant la voie enzymatique principale oxydant l'acétaldéhyde en acétate, nous décrirons plus en détails l'aldéhyde déshydrogénase.

2.2.1. L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH)

Comme l'ADH, cette enzyme utilise le NAD comme cofacteur (Quertemont, 2004). Elle est localisée dans le cytosol et les mitochondries des hépatocytes, mais se retrouve aussi dans la microvascularité du cerveau (Zimatkin, 1991). Chez l'homme, cette famille d'enzymes se divise en neuf classes majeures (Vasiliou et al., 1999), chaque classe comprenant une ou plusieurs isoformes. Toutefois, seules certaines d'entre elles semblent être responsables de manière significative du métabolisme de l'acétaldéhyde ; les autres prenant en charge la métabolisation d'autres substrats. Les trois enzymes les plus importantes sont l'ALDH1A1, l'ALDH1B1 et l'ADLH2 (Vasiliou & Pappa, 2000).

L'ALDH1A1, cytosolique, possède une affinité plutôt élevée pour l'acétaldéhyde (Vasiliou et al., 2004) chez l'homme et le rongeur. L'ALDH1B1 est mitochondriale, possède un Km

faible et semble donc jouer un rôle important. Elle a été localisée au niveau du foie, du cœur et des reins notamment (Vasiliou et al., 2000)

L'ALDH2 est mitochondriale et montre une affinité très importante pour l'acétaldéhyde ($K_m < 1 \mu\text{m}$). Elle est en effet responsable de la majeure partie de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. Elle est très présente dans le foie et l'estomac mais aussi dans d'autres tissus comme le cerveau (Yoshida et al., 1998).

Un polymorphisme génétique a principalement été mis en évidence pour l'ALDH2 : l'allèle *ALDH2*1* code pour une enzyme très active, présent chez tous les Caucasiens, alors que l'*ALDH2*2* code pour une enzyme inactive et se retrouve chez 50% des Asiatiques (Goedde et al., 1992). Chez ces derniers, la consommation d'alcool induit une accumulation d'acétaldéhyde, associée à un afflux de sang (« flush ») facial et des signes d'intolérance à l'alcool (maux de tête, hypotension, tachycardie et nausée notamment). Ces symptômes sont semblables à ceux observés après l'administration de disulfirame (inhibiteur de l'ALDH) chez les patients alcooliques. Ces effets périphériques provoquent une aversion pour l'alcool chez les porteurs de l'*ALDH2*2*, les protégeant contre l'abus d'alcool et l'alcoolisme (Harada et al., 1982).

2.2.2. Système microsomal d'oxydation de l'acétaldehyde (MAOS)

Le système microsomal d'oxydation intervient également dans l'oxydation hépatique de l'acétaldéhyde en acétate chez l'homme et le rat (Kunitoh et al., 1996). Les cytochromes P-450 sont aussi impliqués, le CYP2E1 notamment. A l'instar du MEOS, le MAOS est inductible par un traitement chronique d'alcool.

3. Principales stratégies utilisées pour étudier le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets neurocomportementaux de l'éthanol

3.1. L'administration aiguë d'acétaldéhyde

Si l'acétaldéhyde participe aux effets comportementaux de l'éthanol, il doit pouvoir exercer en soi des effets similaires à ceux de son précurseur. Etant donné son importante toxicité, la plupart des études utilisant l'administration directe d'acétaldéhyde sont réalisées sur les animaux de laboratoires, principalement les rongeurs. Les effets de l'administration aiguë d'acétaldéhyde peuvent être étudiés via différentes voies : intrapéritonéale, intraveineuse et intracérébrale.

Toutefois, en ce qui concerne les injections périphériques, la question des concentrations cérébrales d'acétaldéhyde fut l'objet de controverses pendant plusieurs années. Etant donné sa rapide oxydation dans le foie par l'ALDH, ainsi que la présence de cette dernière dans les capillaires cérébraux, l'acétaldéhyde systémique n'atteint que difficilement le cerveau après l'administration d'alcool (Eriksson, 1977). La participation du métabolite aux effets centraux de l'éthanol semble donc être limitée à la formation locale d'acétaldéhyde via les systèmes catalase/H₂O₂ et CYP2E1 (Zitmakin, 2006).

Néanmoins, des doses suffisantes injectées en périphérie peuvent conduire à la saturation de l'ALDH cérébrale et permettre au métabolite de traverser la barrière hémato-encéphalique (Quertemont & Tambour, 2004), légitimant la stratégie.

3.2. La manipulation des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de l'éthanol

- A l'aide d'outils pharmacologiques

La plupart des études investiguant le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets comportementaux de l'éthanol utilisent des substances pouvant moduler l'activité enzymatique impliquée dans le métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. L'objectif est

d'altérer les concentrations cérébrales et/ou périphériques d'acétaldéhyde après l'administration d'alcool et d'en évaluer les conséquences (Quertemont et al., 2005b). Si l'acétaldéhyde participe à un effet donné de l'éthanol, alors l'augmentation ou la diminution des concentrations du métabolite devraient augmenter ou réduire l'effet en question.

Plusieurs substances sont utilisées pour modifier le métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde (voir figure 2.). Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que la plupart de ces substances manque de spécificité et exerce des fonctions externes au métabolisme de l'éthanol (Quertemont et al., 2005b).

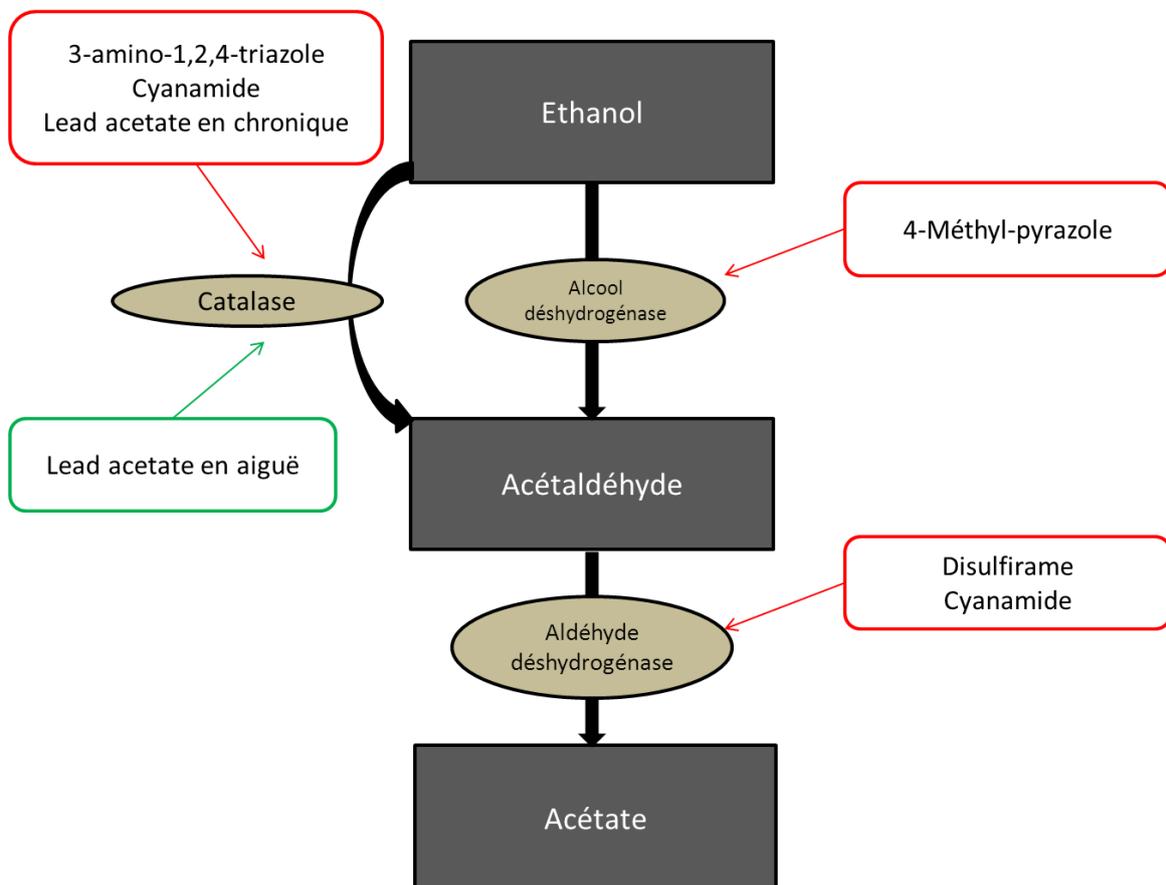


Figure 2. Principales substances utilisées pour moduler l'activité enzymatique des voies mentionnées (Quertemont et al., 2005b). Les substances encadrées en rouge inhibent l'activité des voies désignées. Les substances encadrées en vert les potentialisent.

- A l'aide d'outils issus des méthodes de la thérapie génique

Cette stratégie est la plus récente et n'est que très peu utilisée dans ce domaine. La méthode consiste à faire pénétrer la nouvelle information génétique dans l'organisme de l'individu. L'utilisation de virus modifiés pour transporter un gène thérapeutique repose sur le constat d'efficacité des virus pour transférer leur propre matériel génétique dans les cellules. Pour produire des vecteurs viraux, on utilise des virus modifiés génétiquement, dits « sécurisés ».

Les vecteurs lentiviraux, dérivés d'un virus humain mais totalement sécurisés, peuvent incorporer de façon permanente les gènes qu'ils portent dans le génome des cellules-cibles (Hu & Pathak, 2000), notamment les neurones. Par exemple, Karahanian et ses collaborateurs en 2011 ont injecté des vecteurs lentiviraux dans l'aire tegmentale ventrale³ (ATV) de rats sélectionnés pour leur préférence pour l'alcool. Ces vecteurs lentiviraux empêchaient la synthèse de la catalase ou stimulaient la production d'alcool déshydrogénase (ADH) dans l'ATV. La consommation volontaire d'alcool fut abolie dans le premier cas et stimulée dans le deuxième, indiquant l'effet renforçant de l'acétaldéhyde dans le cerveau et l'aire tegmentale ventrale notamment.

3.3. L'inactivation de l'acétaldéhyde

Depuis quelques années, certains laboratoires utilisent un nouvel outil pharmacologique : la D-pénicillamine. Cette substance est un dérivé de la pénicilline. Chez le rongeur, ce thiol (composé possédant un groupement thiol ou sulfhydryle -SH), interagit avec l'acétaldéhyde (Nagasawa et al., 1977). Cette interaction est attribuée à une forte réactivité du groupement carbonyle de l'aldéhyde, réagissant de manière non-enzymatique pour former des adduits stables (Nagasawa et al., 1980 ; Serrano et al., 2007). Ces thiols ont donc été identifiés comme des agents « séquestrant » l'acétaldéhyde généré lors de l'oxydation de l'éthanol *in vivo* (Nagasawa, 1978). Le produit de condensation est l'acide 2,5,5-triméthylthiazolidine-4-carboxylique (Nagasawa et al., 1987), assez stable pour être excrété par les urines.

³ L'aire tegmentale ventrale fait partie du système mésocorticolimbique dopaminergique, impliqué dans les processus motivationnels, et l'addiction notamment.

L'administration systémique de D-pénicillamine conduit à une diminution des niveaux sanguins d'acétaldéhyde généré après administration systémique d'éthanol, sans altérer les concentrations de ce dernier (Nagasawa et al., 1980, 1987).

3.4. Autres stratégies

Il existe évidemment d'autres outils ou stratégies pour mieux comprendre les propriétés de l'acétaldéhyde. L'observation des porteurs de l'allèle *ALDH2**2, chez qui la consommation d'alcool induit des concentrations élevées d'acétaldéhyde, l'étude des patients traités au disulfirame (inhibiteur de l'ALDH), l'utilisation de souris knockout, l'étude des corrélations entre les concentrations d'acétaldéhyde et les effets comportementaux de l'éthanol constituent des approches complémentaires.

Il est évident que chacune de ces méthodes possèdent certaines faiblesses. Néanmoins, l'importance réside dans la convergence des résultats issus de différentes études, utilisant divers outils, permettant d'affiner les supports explicatifs du rôle de l'acétaldéhyde dans les effets neurocomportementaux de l'éthanol.

Dans ce mémoire, nous utiliserons l'administration directe d'acétaldéhyde ainsi que la D-pénicillamine pour étudier son rôle dans les effets hypothermiques, sédatifs et aversifs de l'éthanol.

4. Rôle de l'acétaldéhyde dans les effets comportementaux de l'éthanol

Nous décrivons brièvement les données de la littérature disponibles concernant les effets d'intérêt par rapport à l'objet de ce travail, à savoir les effets hypothermiques, stimulants et sédatifs ainsi que les effets hédoniques (renforçants). Les effets aversifs seront présentés au chapitre suivant (point 5.). Évidemment, l'éthanol exerce d'autres effets, mnésiques, ataxiques et anxiolytiques entre autres. Certains laboratoires se sont intéressés au rôle de l'acétaldéhyde dans ces effets (pour revue, voir Quertemont et al., 2005b).

4.1. Effets hypothermiques

L'intoxication aiguë d'alcool est connue pour produire une hypothermie significative chez l'homme et le rongeur (Freud, 1973 ; Ritzmann & Tabakoff, 1976). L'ampleur de cet effet est dépendante de la dose d'éthanol administrée, avec une hypothermie marquée à fortes doses. Cet effet dépend également de la température ambiante : l'exposition à un environnement froid ou chaud potentialise et atténue respectivement l'effet hypothermique de l'éthanol (Lomax & Lee, 1982 ; Malcom & Alkana, 1981).

Il est intéressant de constater que les effets de l'éthanol sur la thermorégulation semblent modifier les effets motivationnels de ce dernier (Cunningham, 1994). Chez le rongeur, la préférence ou l'aversion pour le psychotrope sont associés au degré d'hypothermie induite par l'administration d'alcool. Plus l'hypothermie est importante et plus les effets hédoniques sont de nature aversive. Dans une de ces études, des rats maintenus dans un environnement à température élevée, atténuant donc les effets hypothermiques de l'éthanol, consomment de plus grande quantité d'alcool que les animaux contrôles, exposés à une température ambiante normale (Cunningham & Niehus, 1989). De plus, certains chercheurs ont mis en évidence une aversion gustative conditionnée atténuée lors de températures élevées et potentialisée lors de températures faibles (Cunningham et al., 1988), soulignant la contribution potentielle de l'effet hypothermique de l'éthanol dans ses effets aversifs.

Globalement, peu d'études ont été réalisées sur les effets hypothermiques de l'éthanol et plus particulièrement sur le rôle de l'acétaldéhyde dans ces effets. Si l'acétaldéhyde produit

des effets hypothermiques, ceux-ci pourraient jouer un rôle dans l'aversion manifeste induite par la consommation d'alcool chez les individus pour qui cette consommation provoque une accumulation systémique d'acétaldéhyde. Pour rappel, il s'agit des individus porteurs d'un allèle codant pour une enzyme ALDH2 inactive, ainsi que les patients alcooliques traités à l'aide d'inhibiteurs de l'ALDH.

Chez le rat, Myers et ses collègues (1987) ont montré que l'administration d'acétaldéhyde provoque une hypothermie dépendante de la dose. Cet effet ne s'observe que pour des doses importantes (entre 100 et 300 mg/kg), provoquant une diminution de 2 à 3°C, 20 minutes après une injection intra-péritonéale de la substance. En termes d'intensité, cet effet est comparable à ce que l'on peut observer après l'injection de doses élevées d'éthanol (3 g/kg).

Par ailleurs, certaines études ont montré chez le rat que des inhibiteurs de l'ALDH provoquent une potentialisation de l'hypothermie induite par l'éthanol (Jensen & Faiman, 1986). L'inhibition de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est connue pour augmenter les taux cérébraux et périphériques d'acétaldéhyde. Ces études indiquent donc que le métabolite participe aux effets hypothermiques de l'éthanol.

Néanmoins, d'autres études rapportent des résultats contradictoires. L'inhibition de la catalase par l'amino-triazole semble potentialiser les effets hypothermiques de l'éthanol, suggérant un effet hyperthermique de l'acétaldéhyde (Aragon et al., 1991a). Toutefois, ce résultat n'a pas été répliqué par Tampier et Quintanilla en 1991. Les conclusions de ces études doivent donc être interprétées avec prudence dû notamment au manque de spécificité potentiel de l'amino-triazole.

Chez la souris, Closon et ses collaborateurs (2009) ont comparé les effets hypothermiques de différentes doses d'acétaldéhyde avec une dose d'éthanol de référence (3 g/kg), connue pour induire une hypothermie significative chez ce rongeur (Crabbe et al., 1979). Comme attendu, ces auteurs ont observé une hypothermie significative induite par l'éthanol, jusqu'à deux heures après l'injection intra-péritonéale. Ils ont également montré que l'acétaldéhyde possède des propriétés hypothermiques à doses élevées (170 et 300 mg/kg), comparables à l'éthanol en terme d'ampleur mais beaucoup plus courts. Cette différence serait due aux propriétés pharmacocinétiques des deux substances. En effet, l'acétaldéhyde est rapidement métabolisé en acétate par l'ALDH alors que l'alcool déshydrogénase (ADH) est rapidement saturée suite à l'administration d'une telle dose d'éthanol.

Par ailleurs, ils ont montré qu'un prétraitement au cyanamide potentialise l'effet hypothermique de l'éthanol, même aux doses qui n'induisent pas d'hypothermie, supportant l'idée que le métabolite participe aux effets hypothermiques de son précurseur. En effet, une dose faible d'1 g/kg, combinée au cyanamide induit une perte de 4 à 5°C. Il est donc possible que l'inhibition ou la déficience en ALDH chez l'homme conduisent à une hypothermie significative après l'administration d'une faible quantité d'alcool et contribuent à l'aversion observée dans ces populations après consommation d'alcool.

Enfin, ces auteurs ont mis en évidence que l'inhibition de l'ADH par le 4-méthyl-pyrazole (4-MP) bloque l'augmentation des effets hypothermiques induite par l'inhibition de l'ALDH par le cyanamide. L'inhibition de l'ADH bloque la formation périphérique d'acétaldéhyde, ce qui empêche l'accumulation du métabolite par le cyanamide et donc la potentialisation de l'hypothermie induite par la combinaison cyanamide-éthanol. Ce résultat renforce l'idée du rôle déterminant de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques de l'éthanol, en montrant que les effets du cyanamide sont bien dus à une accumulation d'acétaldéhyde.

Dans ce mémoire nous étudierons le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques de l'éthanol en utilisant la D-pénicillamine, permettant de « séquestrer » l'acétaldéhyde sans modifier les concentrations d'éthanol. Si l'acétaldéhyde participe aux effets hypothermiques de l'éthanol, la D-pénicillamine devrait diminuer les effets hypothermiques induits par l'administration d'éthanol et d'acétaldéhyde.

4.2. Effets sédatifs

L'éthanol se classe parmi les psycholeptiques ou déprimeurs centraux (non sélectifs en l'occurrence).

Chez l'homme, à fortes doses, l'alcool induit une sédation pouvant mener à la perte de conscience et au coma éthylique dans les cas extrêmes. Chez le rongeur, ces effets sédatifs s'étudient à l'aide du dispositif de perte du réflexe de retournement⁴ ou « Lost Of Righting Reflex » (LORR). De fortes doses d'éthanol (4 g/kg et plus) provoquent une perte rapide du réflexe de retournement durant plus d'une heure chez la souris (Correa et al., 2001a ; Zitmakin et al., 2001a ; Tambour et al., 2007). Ce pattern s'observe également chez le rat à des doses plus faibles (3-3,5g/kg) (Webb et al., 2002 ; Zitmakin et al., 2001b). Enfin, cet effet est dépendant de la dose : plus celle-ci est élevée et plus la durée de la perte du réflexe de retournement est importante.

Certains laboratoires se sont intéressés au rôle de l'acétaldéhyde dans ces effets. L'acétaldéhyde injecté par voie intra-péritonéale aux doses comprises entre 100 et 300 mg/kg est rapidement absorbé dans le sang et atteint une concentration significative dans le cerveau (Quertemont et al., 2004). A noter que ces concentrations cérébrales sont plus faibles que les concentrations périphériques, ce qui indique que la barrière hémato-encéphalique limite la diffusion de l'acétaldéhyde dans le cerveau même lors de fortes concentrations. Par ailleurs, ces concentrations cérébrales sont peu susceptibles d'apparaître en conditions physiologiques normales après consommation d'alcool mais elles sont proches de celles observées lorsque les rongeurs sont prétraités avec un inhibiteur de l'ALDH avant l'administration d'éthanol (Quertemont et al., 2004).

Chez les rongeurs non sélectionnés, une perte significative du réflexe de retournement n'apparaît pas en deçà de 150 mg/kg (Quertemont et al., 2004). Certains chercheurs ont pu mettre en évidence une perte du réflexe de retournement significative à faible dose (50 mg/kg) chez des rats UchA⁵, possédant une faible activité de l'ALDH pour lesquels on observe une

⁴ Après l'injection, les animaux sont replacés dans leur cage jusqu'à ce que le réflexe de retournement soit perdu. Ils sont alors placés sur le dos dans un dispositif en forme de V jusqu'à ce que le retournement soit recouvré. La durée de la perte du réflexe est mesurée et le recouvrement se définit comme la capacité de l'animal à se retourner trois fois en une minute.

⁵ UchA : University of Chile Abstainer (faibles consommateurs d'alcool)

accumulation d'acétaldéhyde plus importante (Tampier & Quintanilla, 2002). On peut également remarquer que les souris sélectionnées pour leur sensibilité aux effets sédatifs de l'éthanol présentent une perte du retournement plus longue après l'administration de 350 mg/kg d'acétaldéhyde (Dudek et al., 1984), suggérant que les effets sédatifs des deux substances soient sous-tendus par des mécanismes communs. Enfin, il existe une corrélation positive entre l'accumulation cérébrale d'acétaldéhyde et la durée de la perte du réflexe induite par l'éthanol (Zitmakin et al., 2001a, 2001b), ce qui renforce l'hypothèse d'une contribution du métabolite dans les effets sédatifs de son précurseur.

Néanmoins, la durée des effets sédatifs de l'acétaldéhyde comparé à ceux de l'éthanol est très brève. Après l'administration de 300 mg/kg⁶, les souris perdent leur réflexe de retournement pendant 6 minutes en moyenne contre plus d'une heure pour les plus fortes doses d'éthanol (4-5 g/kg) (Correa et al., 2001a ; Quertemont et al., 2004 ; Zitmakin et al., 2001b). Cet écart s'explique par des différences d'ordre cinétique, déjà mentionnées, mais n'exclue pas l'implication potentielle du métabolite dans les effets sédatifs de l'éthanol. En effet, après l'administration d'éthanol, l'acétaldéhyde est graduellement produit à partir de son métabolisme et s'accumule lentement. Les effets de son accumulation locale peuvent durer jusqu'à ce que l'éthanol soit complètement dégradé. En revanche, lorsque l'acétaldéhyde est directement administré, il est rapidement métabolisé, ce qui explique la courte durée de ses effets.

Les résultats issus des études dans lesquelles des outils pharmacologiques ont été utilisés semblent plutôt conflictuels. Les études qui se sont penchées sur l'activité de la catalase montrent des divergences selon l'espèce. Celles-ci suggèrent que chez la souris, l'acétaldéhyde issu du métabolisme cérébral de l'alcool ne contribue pas aux effets sédatifs de ce dernier. En effet, l'administration aiguë de lead acetate⁷ augmente la latence de la perte du réflexe et diminue sa durée après l'administration d'éthanol (Correa et al., 2001a). Par ailleurs, l'administration chronique de lead acetate et l'administration d' amino-triazole même remarque que pour le lead acetate induisent une augmentation de l'effet sédatif (Correa et al.,

⁶ Dose la plus élevée recommandée car il semble que la dose létale médiane (LD50) se situe entre 300 mg/kg et 560 mg/kg (Quertemont et al., 2004)

⁷ L'administration aiguë de lead acetate a pour effet d'augmenter l'activité de la catalase

2001a). Ces résultats sont consistants avec ceux obtenus avec des souris acatalasémiques chez qui l'administration d'éthanol augmente la durée de la perte du réflexe de retournement par rapport aux souris contrôles (Aragon & Amit, 1993). A l'inverse, chez le rat, l'inhibition de la catalase par l'acéto-triazole induit une diminution de la perte du réflexe de retournement induite par l'éthanol (Aragon et al., 1991). Ces données inconsistantes suggèrent que l'acétaldéhyde soit préférentiellement impliqué dans les effets sédatifs de l'éthanol chez le rat et dans les effets stimulants chez la souris qui diminueraient les effets sédatifs de l'éthanol. C'est ce que suggèrent Correa et ses collaborateurs en 2001 en observant que l'augmentation de l'activité de la catalase est associée à une augmentation et une diminution respective des effets stimulants et sédatifs induits par l'alcool. Ils montrent qu'il existe également une différence dans l'ampleur de l'effet de ces traitements: l'impact de l'administration chronique de lead acetate et/ou de l'acéto-triazole sur l'effet sédatif est plus faible que pour la stimulation locomotrice, ce qui indique un rôle différentiel de l'activité de la catalase dans les effets de l'éthanol chez la souris. Cela suggère également un rôle plus important de l'acétaldéhyde dans les effets locomoteurs de l'éthanol que dans ses effets sédatifs (Correa et al., 2001b), du moins chez la souris.

En revanche, les études ayant modulé l'activité de l'ALDH suggèrent que l'acétaldéhyde contribue aux effets sédatifs de son précurseur. Il a été montré que le cyanamide⁸ prévient l'effet stimulant de l'éthanol et potentialise la perte du réflexe de retournement provoquée par ce dernier (Tambour et al., 2007). En outre, dans cette même étude, l'administration de 4-MP bloque totalement la prolongation de l'effet sédatif induite par le cyanamide. Le 4-MP inhibe l'ADH, empêchant la formation d'acétaldéhyde dans le foie, mais pas dans le cerveau. Les effets du cyanamide sur les comportements induits par l'éthanol seraient donc liés à l'accumulation systémique d'acétaldéhyde. Comme cette forte concentration périphérique s'accompagne subséquemment d'une diffusion cérébrale facilitée⁹ et que l'administration intracérébrale d'acétaldéhyde induit une perte de conscience à fortes doses (Tambour et al., 2006), on ne peut exclure la possibilité que la potentialisation des effets sédatifs soit due à l'action cérébrale de l'acétaldéhyde.

Pour tenter d'éclaircir le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets sédatifs de l'éthanol, nous utiliserons comme outil pharmacologique la D-penicillamine, censée séquestrer

⁸ Augmente les niveaux d'acétaldéhyde périphérique en inhibant l'aldéhyde déshydrogénase

⁹ En inhibant l'ALDH présente dans les capillaires cérébraux

l'acétaldéhyde, sans modifier les concentrations d'éthanol. Si l'acétaldéhyde participe aux effets sédatifs de l'éthanol, un prétraitement avec cette substance devrait amener à une diminution des effets sédatifs induits par l'éthanol et l'acétaldéhyde.

4.3. Effets stimulants

Les effets stimulants de l'éthanol ont été utilisés chez la souris comme modèle animal des effets euphoriques induits par l'alcool chez l'homme (Phillips & Shen, 1996). En effet, les propriétés stimulantes et renforçantes des drogues d'abus semblent être sous-tendues par un mécanisme neurobiologique commun : l'activation du système mésocorticolimbique dopaminergique, dont la sensibilisation favorise les comportements d'approche (Arias et al., 2009). En outre, chez l'homme, et notamment chez l'adolescent, les effets stimulants de l'alcool sont souvent recherchés (Stacy et al., 1991).

Chez le rongeur de laboratoire, l'étude des effets locomoteurs est relativement simple. A l'aide de différents types d'« arène », les chercheurs évaluent, sur une période de temps définie, la locomotion de l'animal en termes de « distance » parcourue.

L'effet locomoteur de l'éthanol dépend de la dose, de la voie d'administration, de l'espèce ou encore de la souche de l'animal (Quertemont et al., 2005). Chez certaines souches de souris, comme la Swiss, l'administration intra-péritonéale d'éthanol produit un effet locomoteur biphasique : stimulant aux doses faibles à modérées (1,5-2,5 g/kg) et dépressant à fortes doses ($\geq 3-4$ g/kg) (Frye & Breese, 1981; Tambour et al., 2005; Tambour et al., 2006). Ce pattern s'observe également lors d'injections intracérébrales (Tambour et al., 2006). Par contre, chez la C57BL/6, les effets stimulants de l'éthanol ne s'observent pas à doses faibles ou modérées, excepté sous conditions expérimentales particulières (Frye & Breese, 1981). A la différence des effets stimulants, de fortes doses d'éthanol induisent systématiquement une hypolocomotion et une sédation chez les deux souches.

Lors d'injections périphériques, seuls certains rats sélectionnés pour leur appétence envers le psychotrope sont stimulés à faibles doses (Waller et al., 1986), ce qui supporte l'idée d'un lien entre propriétés renforçantes et stimulantes. Par ailleurs, il semble que l'âge constitue un facteur critique. A la différence des adultes, chez les jeunes non sevrés, l'éthanol induit un effet locomoteur biphasique, coïncidant avec un effet motivationnel de même nature (Nizhnikov et al., 2007). Ce pattern a également été mis en évidence chez la souris. Quoilin et ses collaborateurs en 2010 ont montré que la sensibilité aux effets stimulants de l'éthanol diminue graduellement avec l'âge. Ils ont montré parallèlement une diminution de la tolérance initiale aux effets sédatifs de l'éthanol entre la période de sevrage jusqu'à l'âge adulte (Quoilin et al., 2010).

Certains laboratoires se sont ainsi intéressés au rôle de l'acétaldéhyde dans ces effets stimulants. L'effet locomoteur de l'administration aiguë d'acétaldéhyde dépend également de la dose, de la voie d'administration et de l'espèce. L'administration périphérique d'acétaldéhyde produit un effet dépressant chez le rat et la souris aux doses supérieures à 100 mg/kg (Holtzman & Schneider, 1974; Myers et al., 1987; Quertemont et al., 2004). Néanmoins, certains chercheurs ont montré qu'il possédait des propriétés stimulantes chez le rat lorsqu'il était administré dans les ventricules cérébraux (Arizzi et al., 2003; Arizzi-LaFrance et al., 2006 ; Correa et al., 2003), mais pas chez la souris (Tambour et al., 2006).

Les études dans lesquelles l'activité de la catalase a été modulée soutiennent l'hypothèse d'une participation de l'acétaldéhyde aux effets stimulants de l'éthanol. L'inhibition et l'induction de la catalase atténuent (Correa et al., 2001b) et augmentent (Correa et al., 1999a) respectivement l'effet stimulant de l'éthanol.

Les études utilisant la D-pénicillamine vont dans le même sens. Font et ses collaborateurs en 2005 montrent que la D-pénicillamine atténue la dépression locomotrice induite par l'administration intra-péritonéale d'acétaldéhyde et bloque l'activation locomotrice provoquée par l'éthanol chez la souris de manière dose-dépendante (Font et al., 2005).

Des études plus récentes montrent que l'inactivation de l'acétaldéhyde (par la D-pénicillamine) bloque l'effet stimulant de l'éthanol lorsque ce dernier est injecté directement dans l'aire tegmentale ventrale (AVT) chez le rat (Marti-Prats et al., 2010). Ce résultat suggère que l'acétaldéhyde, issu du métabolisme cérébral de l'éthanol participe de manière importante aux effets stimulants de celui-ci.

Enfin, les études neurochimiques tendent à souligner le rôle excitateur de l'acétaldéhyde. Celui-ci provoque une excitation des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et l'administration systémique et intra-ATV d'acétaldéhyde (Enrico et al., 2009 ; Foddai et al., 2004 ; Melis et al., 2007) augmente les niveaux de dopamine dans le noyau accumbens. Ces résultats montrent que la contribution de l'acétaldéhyde dans les effets stimulants de l'alcool est d'origine centrale.

Néanmoins, les études portant sur l'inhibition de l'ALDH fournissent des résultats conflictuels. Certaines études ont montré que le diethyldithiocarbamate, précurseur d'un métabolite actif du disulfirame potentialise l'effet stimulant de l'éthanol (Escarabajal &

Aragon, 2002b) et que cet effet n'est pas contrecarré par le 4-MP, ce qui supporte l'hypothèse d'une action centrale de l'acétaldéhyde.

Au contraire, l'inhibition de l'ALDH par le cyanamide bloque de manière consistante les effets stimulants de l'éthanol (Escarabajal & Aragon, 2002a ; Tambour et al., 2007). Pour rappel, les effets du cyanamide sont considérés comme étant sous-tendus par une accumulation périphérique d'acétaldéhyde. Des études de microdialyse montrent que l'administration d'éthanol chez des rongeurs prétraités au cyanamide provoque une augmentation des concentrations cérébrales d'acétaldéhyde (Jamal et al., 2003). Des concentrations cérébrales similaires induisent des effets sédatifs et hypolocomoteurs (Quertemont et al., 2004 ; Tambour et al., 2006) suggérant que l'accumulation d'acétaldéhyde, provoquée par le cyanamide, potentialiserait l'effet sédatif de l'éthanol et masquerait les effets stimulants de 2 g/kg d'éthanol.

Selon les outils pharmacologiques utilisés, les résultats diffèrent. Il est possible que cela soit dû à un manque de spécificité de certaines de ces substances. D'autres études sont donc nécessaires afin de clarifier le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets stimulants de l'éthanol. Néanmoins, une contribution relative du métabolite dans ces effets est supportée par un ensemble convergent de données.

4.4. Effets hédoniques/renforçants

Sa forte toxicité ainsi que l'observation des individus porteurs d'allèles « protecteurs » et/ou des patients traités au disulfirame, conduit généralement à considérer l'acétaldéhyde comme une substance hautement aversive.

Supportant cette hypothèse, certaines études animales ont mise en évidence une corrélation négative entre les taux sanguins d'acétaldéhyde et la préférence pour l'alcool (Eriksson, 1980). Par exemple, les rongeurs montrant une activité ALDH hépatique faible évitent l'alcool (Isse et al., 2002 ; Koivisto & Eriksson, 1994). L'inhibition de l'ALDH induit une diminution de la consommation d'alcool chez le rat (Sinclair & Lindros, 1981), de la même manière que le disulfirame conduit dans la grande majorité des cas à une diminution de la consommation d'alcool chez l'homme.

Toutefois, il semble évident que l'acétaldéhyde exerce aussi des effets renforçants. Ces effets opposés pourraient en partie dépendre de la localisation de son accumulation (Quertemont, 2004). En effet, il a été proposé qu'en périphérie, l'acétaldéhyde soit principalement aversif alors que dans le cerveau le métabolite puisse exercer des effets opposés; qu'il participe, voire sous-tende les effets renforçants de l'éthanol (Deng & Dietrich, 2008).

Chez le rongeur, deux procédures expérimentales sont particulièrement utilisées pour étudier les propriétés toxicomanogènes des drogues: les protocoles d'auto-administration¹⁰ et de préférence conditionnée de lieu¹¹.

Certaines études ont montré que le rat s'auto-administrait l'acétaldéhyde dans les ventricules cérébraux (Amit et al., 1977) ainsi que dans l'aire tegmentale ventrale, et ce avec une plus grande intensité que l'éthanol (Rodd-Henricks, 2002). Cette région cérébrale est

¹⁰ Auto-administration : se base sur le conditionnement opérant. Une réponse particulière (appuyer sur un levier ou introduire son museau dans un orifice) déclenche la délivrance du psychotrope. Si celui-ci possède des effets positifs, la réponse est renforcée.

¹¹ Préférence de lieu conditionnée (CPP pour l'appellation anglo-saxonne « conditioned place preference ») : se base sur le conditionnement pavlovien. Un environnement particulier (stimulus conditionnel) est associé de manière répétée à une substance (stimulus inconditionnel). Un environnement différent est associé à une substance contrôle. Lors du test, le choix est donné à l'animal d'explorer ces deux environnements. Les effets renforçants d'une substance se manifestera par un temps passé dans l'environnement précédemment associé aux effets de la substance plus important par rapport à au temps passé dans l'environnement contrôle.

particulièrement impliquée dans les effets renforçants du psychotrope (Rodd et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'acétaldéhyde au niveau cérébral possède des propriétés hédoniques positives plus importantes que l'éthanol.

Les études utilisant le paradigme de CPP viennent supporter cette hypothèse. En effet, il est souvent difficile d'établir une CPP pour l'éthanol chez le rat naïf. Chez ce rongeur, on observe généralement des aversions conditionnées de lieu pour l'éthanol, bien qu'une exposition prolongée puisse induire une CPP (Reid et al., 1985).

Ce type de données contraste avec les CPPs observées pour l'acétaldéhyde. Certains chercheurs ont rapporté une préférence de lieu associé à l'administration d'acétaldéhyde dans les ventricules cérébraux (Smith et al., 1984). D'autres auteurs ont mis en évidence une préférence pour un stimulus associé aux injections intrapéritonéales d'acétaldéhyde de 20 à 50 mg/kg (Quertemont & De Witte, 2001). Quintanilla et Tampier en 2003 ont observé une forte CPP pour l'acétaldéhyde chez les rats UchB¹², sélectionnés pour leur préférence pour l'alcool, indiquant un lien entre l'effet renforçant de l'acétaldéhyde et l'appétence pour l'éthanol.

Plus récemment, certaines études ont montré que l'administration systémique de D-pénicillamine bloquait la CPP pour l'éthanol chez la souris (Font et al., 2006a) et le rat (Peana et al., 2008). L'inactivation de l'acétaldéhyde par la D-pénicillamine prévient également la consommation d'alcool chez la souris (Font et al., 2006b).

A une échelle neurobiologique, il a été montré que l'acétaldéhyde, comme l'éthanol, augmente le taux de décharge des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Foddai et al., 2004). Il est intéressant de constater que cette libération accrue de dopamine, induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde, peut être bloquée par un prétraitement de D-pénicillamine (Enrico et al., 2009).

Les différents résultats impliquant la catalase, revus par Quertemont et al., en 2005b montrent que l'étude de son implication dans les effets renforçants de l'acétaldéhyde donne lieu à des résultats contradictoires. Néanmoins, des études récentes, utilisant les méthodes de thérapie génique, montrent que l'inactivation de la synthèse de la catalase au niveau de l'aire

¹² University of Chile Bibulous (gros consommateurs d'alcool)

tegmentale ventrale provoque une diminution importante de la consommation d'éthanol chez des rats UchB. Dans cette expérience, les auteurs ont également observé une diminution significative de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Karahanian et al., 2011), composante majeure du système mésolimbique impliqué dans les processus motivationnels.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'acétaldéhyde exerce des effets hédoniques de nature positive, et en particulier au niveau cérébral.

5. L'aversion gustative conditionnée¹³

Les premières démonstrations de CTA datent des années 50. Dans leur étude, Garcia et ses collaborateurs (1955) ont observé chez des rats une diminution de la consommation de saccharine lorsque celle-ci est associée à des radiations. Les rats recevant ces mêmes radiations mais de manière non pairée avec la saccharine, ainsi que ceux non soumis à ces radiations continuent à la consommer. Ces auteurs en conclurent que pour le premier groupe, la saccharine fut associée aux effets des radiations (effets aversifs), ce qui conduisit au développement d'une aversion pour la saccharine et donc à une diminution de sa consommation.

Ce protocole est généralement considéré comme permettant d'étudier les effets potentiellement aversifs d'une substance donnée. Dans ce protocole, un goût nouveau et discriminatif (traditionnellement de la saccharine) est associé de manière répétée à l'administration d'une substance. Une aversion conditionnée pour le goût, exprimée par une diminution de la consommation de saccharine, est généralement considérée comme révélatrice des propriétés aversives de la substance testée.

Cet apprentissage pavlovien possède des caractéristiques bien particulières. D'abord, cette aversion peut s'observer après une seule association. Ensuite, ces aversions peuvent être acquises même avec des délais importants entre l'exposition au goût (stimulus conditionnel) et les effets aversifs (stimulus inconditionnel). Enfin, ces aversions conditionnées sont spécifiques aux stimuli gustatifs. Les stimuli audiovisuels, présents durant l'expérience des effets aversifs, ne sont pas facilement associés à ceux-ci (pour revue voir Davis & Riley, 2010).

Il a été proposé que l'aversion gustative conditionnée soit donc une forme d'apprentissage spécialisée qui facilite l'association entre un goût et un état interne désagréable ou une maladie. Cette capacité serait essentielle à la survie de l'animal. En effet, si les toxines sont majoritairement présentes dans l'environnement alimentaire, il est fortement adaptatif de pouvoir rapidement associer un aliment et son effet aversif potentiel, afin de prévenir l'ingestion future de cette même toxine.

Les premières investigations se sont focalisées sur les effets aversifs des radiations, du chlorure de lithium (LiCl) et d'autres substances connues pour leurs effets toxiques. Les

¹³ Nous utiliserons l'abréviation CTA en référence à l'appellation anglo-saxonne « conditioned taste aversion »

chercheurs ont progressivement porté leur attention sur les drogues d'abus et utilisent encore ce protocole pour étudier les effets aversifs de ces substances. Les premières investigations ont montré des CTA avec des drogues aux propriétés renforçantes (la cocaïne par exemple) suggérant qu'elles possèdent également des effets aversifs. Ce constat n'est pas surprenant puisque l'effet d'une drogue dépend souvent de la dose avec, à des doses élevées, une toxicité et une aversion potentielle marquée.

Un certain nombre d'études rapportent une CTA induite par l'éthanol, chez le rat et la souris (Broadbent et al., 2002; Escarabajal et al., 2003), suggérant que l'éthanol soit initialement aversif chez des rongeurs naïfs.

Une CTA dose-dépendante pour l'acétaldéhyde a aussi été rapportée (Aragon et al., 1986; Escarabajal et al., 2003; Quintanilla et al., 2002), amenant certains auteurs à conclure que le métabolite sous-tende ou participe aux effets aversifs de l'éthanol (Aragon et al., 1986).

Néanmoins, ces résultats restent difficiles à interpréter. En effet, les drogues d'abus connues pour leurs propriétés toxicomanogènes induisent une CTA à des doses qui sont, par ailleurs, auto-administrées (Grigson & Twining, 2002), ce qui semble contre-intuitif. Dès lors, certains chercheurs ont suggéré que ces drogues d'abus induisent une réduction de la consommation de saccharine par un mécanisme de « comparaison des renforçateurs » (Grigson, 1997). Selon cette hypothèse, on observera une diminution de la consommation de saccharine (ou autre renforçateur) lorsque celle-ci prédit l'accès à une récompense plus importante, comme une drogue toxicomanogène. Supportant cette hypothèse, Grigson montre que ces drogues ne provoquent pas de CTA lorsque le stimulus conditionnel ne possède pas de propriétés intrinsèques renforçantes, comme du chlorure de sodium (NaCl) (Grigson, 1997).

Néanmoins, dans le cas de l'éthanol, et contrairement à d'autres drogues d'abus, on observe une CTA même lorsqu'une solution neutre (NaCl) est utilisée (Risinger and Boyce, 2002). De plus, les CTA induites par l'éthanol sont corrélées négativement avec la préférence pour celui-ci, parmi différentes lignées de rats et de souris (Broadbent et al., 2002; Brunetti et al., 2002). Ce constat indique que l'ampleur des CTA induites par l'éthanol n'est pas liée à ses propriétés renforçantes.

Par contre, on ne sait toujours pas si la CTA induite par l'acétaldéhyde est sous-tendue par ses effets positifs ou aversifs. En effet, la plupart des études réalisées ont utilisé de la saccharine comme stimulus gustatif (Aragon et al., 1986; Escarabajal et al., 2003). Seule Quintanilla et ses collaborateurs en 2002 ont utilisé une solution parfumée à la banane non préférée à l'eau. Dans cette étude, une CTA était observée uniquement chez des rats UChA¹⁴ (faible appétence pour l'alcool) et non chez des rats UChB (forte préférence pour l'alcool), indiquant des effets aversifs de l'acétaldéhyde uniquement pour les premiers. Par ailleurs, les rats UChB montrent une préférence de lieu associé à l'acétaldéhyde alors qu'une aversion est observée chez les rats UChA. (Quintanilla & Tampier, 2003). Il est donc possible que les injections périphériques d'acétaldéhyde pourraient être aversives chez certains rongeurs mais renforçantes chez d'autres.

Comme l'acétaldéhyde est une substance très toxique, on considère souvent qu'elle induit une véritable aversion. Mais de très fortes doses d'acétaldéhyde (200-300 mg/kg) sont nécessaires afin d'observer une CTA significative, qui reste malgré cela moins importante que celle induite par l'éthanol (Escarabajal et al., 2003). De plus, aucune étude n'a montré d'aversion de lieu associé à des injections intrapéritonéales d'acétaldéhyde, chez le rat (Quertemont & De Witte, 2001) ou la souris (Tambour & Quertemont, données non publiées), excepté chez les rats UChA (Quintanilla & Tampier, 2003). Il est à l'inverse très facile d'établir des aversions de lieu avec l'éthanol, même à des doses modérées (Cunningham, 1981).

Dans ce mémoire, nous comparerons les effets aversifs des doses-référence de cocaïne, de lithium, d'éthanol et d'acétaldéhyde, connues pour induire une CTA. Surtout, nous étudierons l'impact de la valeur du stimulus conditionnel dans ces effets afin de clarifier quel mécanisme sous-tend ces aversions. L'injection intrapéritonéale des différentes substances citées plus haut sera précédée d'une exposition à la saccharine, traditionnellement utilisée, ou de NaCl, supposé être neutre d'un point de vue hédonistique.

¹⁴ UChA : pour rappel, ces rats ont une faible appétence pour l'alcool contrairement aux rats UChB.

II. Méthodologie

1. Sujets

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé 295 souris femelles de souche Swiss, issues de l'élevage de l'université de Liège ainsi que de l'élevage Janvier (France). L'ensemble des souris, naïves de toute expérimentation, sont âgées de 8 à 10 semaines lors des expériences.

Une semaine avant le début de chaque expérience, les souris sont placées en cages individuelles en plastique transparent (33 x 15 x 13,5 cm) dont le sol est recouvert de sciure de bois. Elles ont accès *ad libitum* à la nourriture (Pellet standard, Carfil Quality BVDA, Oud-Turnhout, Belgique) et à l'eau. L'animalerie est maintenue à une température constante ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures dont la phase éclairée débute à 8h00 et se termine à 20h00.

L'ensemble des procédures expérimentales sont réalisées en accord avec la directive européenne pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire (86/609/EEC). Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité de protection des animaux de l'université de Liège.

2. Substances

L'injection des substances s'est effectuée par voie intrapéritonéale. L'éthanol (99,99% ; Merck, Darmstadt, Allemagne) est dissous dans de la solution saline (NaCl 0,9%) afin d'atteindre une concentration de 20%. Selon les expériences, les doses étaient de 1,5, 3 ou 4 g/kg. L'acétaldéhyde (99% ; Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) est dissous dans de la solution saline (NaCl 0,9%) afin d'obtenir une concentration de 1%. Les doses étaient de 170 et 300 mg/kg. La D-pénicillamine (freebase, pharmacie du CHU de Liège) est dissoute dans de la solution saline (NaCl 0,9%) et injectée avec un volume de 0.01 ml/kg et une concentration de 75 mg/kg (Font et al., 2006). Le chlorure de lithium (Sigma-Aldrich) est dissous dans de la solution saline (NaCl 0,9%) et injecté avec un volume de 0,01 ml/g et une concentration de 3 mg/kg (Risinget & Boyce, 2002). L'hydrochlorate de cocaïne (Sigma-Aldrich) est dissous dans de la solution saline (NaCl 0,9%) et injecté avec un volume de 0,01 ml/g et une concentration de 20 mg/kg.

De la saccharine (Sigma-Aldrich) à 0,1% avec une concentration de 0,10% w/v diluée dans de l'eau du robinet (Risinger & Boyce, 2002 ; Blendov et al., 2008) a été utilisée comme stimulus conditionnel dans le protocole d'aversion gustative conditionnée. Enfin, du chlorure de sodium (NaCl) à 0,1M ou 0,2M dilué dans de l'eau du robinet a été utilisé comme stimulus conditionnel dans le protocole d'aversion gustative conditionnée. Dans ce protocole, ces deux substances étaient consommées par voie orale *via* des pipettes graduées.

3. Dispositifs

3.1. Mesure de l'hypothermie

Un thermomètre digital muni d'une sonde permettant de mesurer la température rectale (au dixième de degré près) a été utilisé pour étudier les effets hypothermiques de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. La sonde doit être enfoncée de deux centimètres dans le rectum de l'animal et maintenue pendant environ 30 secondes.

3.2. Mesure de la perte du réflexe de retournement

Les effets sédatifs sont mesurés par un dispositif en forme de « V » sur lequel l'animal est placé après la perte du réflexe de retournement. Le temps écoulé entre la perte du réflexe de retournement et sa récupération est enregistré et est utilisé comme indice de sédation. La récupération est avérée lorsque l'animal se retourne trois fois en une minute.

3.3. Mesure de l'aversion gustative

Des pipettes graduées de 9,5 ml ont été utilisées pour mesurer la consommation des stimuli conditionnels utilisés lors de cette expérience. Ces pipettes étaient positionnées dans la grille des cages individuelles et sont dotées d'un mécanisme permettant de limiter des pertes de liquides lors de la consommation.

4. Procédures

Une semaine avant les tests, les souris sont placées en cages individuelles. Durant cette période, elles sont manipulées à plusieurs reprises, l'objectif étant de les habituer aux injections afin de diminuer le stress lors des tests expérimentaux.

4.1. Effet de la D-pénicillamine sur l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde (expériences 1 et 2)

Ces deux expériences ont pour but d'évaluer le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques de l'éthanol au moyen d'un prétraitement à la D-pénicillamine.

Tableau 1. Récapitulatif des différents groupes utilisés dans l'expérience 1. N=72

Groupe	Pré-traitement	Traitement
1 (n=12)	Salin	Salin
2 (n=12)	D-pénicillamine	Salin
3 (n=12)	Salin	Ethanol 1,5g/kg
4 (n=12)	D-pénicillamine	Ethanol 1,5g/kg
5 (n=12)	Salin	Ethanol 3g/kg
6 (n=12)	D-pénicillamine	Ethanol 3g/kg

Tableau 2. Récapitulatif des différents groupes utilisés dans l'expérience 2. N=65

Groupe	Pré-traitement	Traitement
1 (n=10)	Salin	Salin
2 (n=11)	D-pénicillamine	Salin
3 (n=11)	Salin	Acétaldéhyde 170mg/kg
4 (n=11)	D-pénicillamine	Acétaldéhyde 170mg/kg
5 (n=11)	Salin	Acétaldéhyde 300mg/kg
6 (n=11)	D-pénicillamine	Acétaldéhyde 300mg/kg

Les animaux sont amenés dans le laboratoire et reçoivent une injection de solution saline ou de D-pénicillamine (75 mg/kg). Après 30 minutes, la température basale de l'animal est prise, suivie de l'injection d'une dose d'éthanol (1,5 ou 3 g/kg), d'acétaldéhyde (170 ou 300 mg/kg) ou de solution saline. Le prétraitement et le traitement dépendent du groupe expérimental d'appartenance. Par ailleurs, ce délai de 30 minutes a été sélectionné d'après l'étude de Font et al., 2005, comme étant le délai optimal pour observer une interaction entre l'éthanol/acétaldéhyde et la D-pénicillamine. Ce délai permet aussi aux souris de s'habituer à la température du laboratoire.

La température de chaque souris est mesurée toutes les 15 minutes pendant 3 heures puis toutes les demi-heures pendant une heure. Etant donné un retour rapide vers des températures de base après l'administration d'acétaldéhyde, le relevé pour les groupes expérimentaux concernés s'arrêtent après 3 heures. La température ambiante est également relevée avant chacune de ces mesures afin de contrôler son influence sur la température rectale.

4.2. Effet de la D-pénicillamine sur la sédation induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde (expériences 3 et 4)

Ces deux expériences ont pour but d'évaluer le rôle de l'acétaldéhyde dans les effets sédatifs de l'éthanol au moyen d'un prétraitement à la D-pénicillamine.

Tableau 3. Récapitulatif des différents groupes utilisés dans l'expérience 3. N=20

Groupe	Prétraitement	Traitement
1 (n=10)	Salin	Ethanol 4g/kg
2 (n=10)	D-pénicillamine	Ethanol 4g/kg

Tableau 4. Récapitulatif des différents groupes utilisés dans l'expérience 4. N=20

Groupe	Prétraitement	Traitement
1 (n=10)	Salin	Acétaldéhyde 300mg/kg
2 (n=10)	D-pénicillamine	Acétaldéhyde 300mg/kg

Les animaux sont amenés dans le laboratoire et reçoivent une injection de solution saline ou de D-pénicillamine (75 mg/kg). Après 30 minutes, les animaux reçoivent une dose d'éthanol (4 g/kg) ou d'acétaldéhyde (300 mg/kg), connues pour induire un effet sédatif significatif. Le prétraitement et le traitement dépendent du groupe expérimental d'appartenance. Directement après l'injection, les souris sont placées dans leur cage jusqu'à ce qu'elles perdent leur réflexe de retournement. Elles sont alors placées en position supine sur le dispositif en forme de V jusqu'à ce que le réflexe soit recouvré. La durée de cette perte est enregistrée et utilisée comme indice de sédation.

4.3. Effets aversifs de l'éthanol et de l'acétaldéhyde et évaluation du rôle du SC dans ces effets (Expériences 5 et 6)

Cette expérience a pour but de comparer les effets aversifs de différentes substances et d'évaluer l'influence du stimulus conditionnel dans ces effets.

Tableau 5. Récapitulatif des différents groupes utilisés pour l'expérience 5. LiCl=3mg/kg – Cocaïne=20mg/kg – Ethanol=4g/kg – Acétaldéhyde=300mg/kg. N=80

	Lithium	Cocaïne	Salin	Ethanol	Acétaldéhyde
Saccharine	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
NaCl	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8

Une mise au point des paramètres de consommation a tout d'abord été effectuée. Il s'agissait d'établir les concentrations de saccharine et de NaCl optimales ainsi que la position des pipettes dans les cages.

Dans une phase préliminaire, les animaux étaient soumis à une procédure de restriction d'eau durant 7 jours. Le matin, les animaux sont pesés et ont accès à 2 pipettes d'eau pendant 2 heures. Cette procédure permet aux animaux de stabiliser leur consommation d'eau.

Durant la phase expérimentale¹⁵, 5 essais de conditionnement, séparés de 48 heures, ont lieu entre 8h00 et 12h00. Les animaux ont alors accès pendant 1 heure à une pipette contenant une solution salée (0,2 M dans de l'eau du robinet) ou sucrée (0,10% w/v dans de l'eau du robinet). Après 1 heure, la consommation est enregistrée et les animaux sont injectés d'une des substances reprises dans le tableau 5. Le stimulus conditionnel et la substance administrée dépendent du groupe expérimental d'appartenance. Cinq heures après les essais de conditionnement, les souris ont accès à de l'eau pendant 30 minutes afin de les réhydrater. A noter qu'entre ces essais de conditionnement, les animaux ont accès à de l'eau pendant 2 heures.

La phase de test a lieu après le dernier essai de conditionnement. Les souris ont accès pendant 24 heures à de l'eau, puis ont accès pendant 12 heures à une pipette d'eau et une pipette contenant la saveur de conditionnement (« two bottle choice »).

¹⁵ N.B : l'emplacement des pipettes est contrebalancé entre les sujets. Par ailleurs, une mesure d'évaporation est réalisée en plaçant une pipette dans une cage vide.

5. Analyses statistiques

L'influence du prétraitement à la D-pénicillamine sur les effets hypothermiques de l'éthanol et de l'acétaldéhyde est évaluée à l'aide d'ANOVA triple mixte 2 (prétraitement) X 3 (traitement) X 15 ou 13 (temps pour l'acétaldéhyde). A la suite de ces analyses, des tests post hoc de type Newman Keuls sont réalisés.

L'influence du prétraitement à la D-pénicillamine sur les effets sédatifs de l'éthanol et de l'acétaldéhyde est évaluée à l'aide de tests t pour échantillons indépendants.

La comparaison des effets aversifs des différentes substances utilisées ainsi que le rôle du stimulus conditionnel dans ces effets a été effectuée à l'aide d'une ANOVA triple mixte 2 (stimulus conditionnel) X 5 (substance) X 6 (sessions) pour la phase de conditionnement. Des analyses post hoc ont été réalisées pour comparer chaque groupe avec le groupe contrôle.

Les données du test de choix pour l'expérience 5 a été analysée à l'aide d'une ANOVA factorielle 2 (SC) X 5 (substance).

Les données du test de choix pour l'expérience 6 a été analysée à l'aide d'une ANOVA factorielle 3 (SC) X 2 (groupe).

Pour chaque analyse, la significativité est avérée à $p < 0.05$.

III. Résultats

1. Effet de la D-pénicillamine sur l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde

1.1. Expérience 1 : D-pénicillamine / Ethanol (1,5 et 3 g/kg)

L'ANOVA triple mixte réalisée sur la température rectale relevée lors de 15 temps (T0 à T240) montre un effet principal du traitement [$F_{2,66} = 89,0$; $p = 0,000000$], un effet principal du temps [$F_{14,924} = 103,0$; $p = 0,000000$], ainsi qu'un effet d'interaction entre ces deux variables [$F_{28,924} = 71,9$; $p = 0,000000$]. Tous les autres effets testés ne sont pas significatifs et notamment celui du prétraitement [$F_{1,66} = 0,4$; $p = 0,520389$].

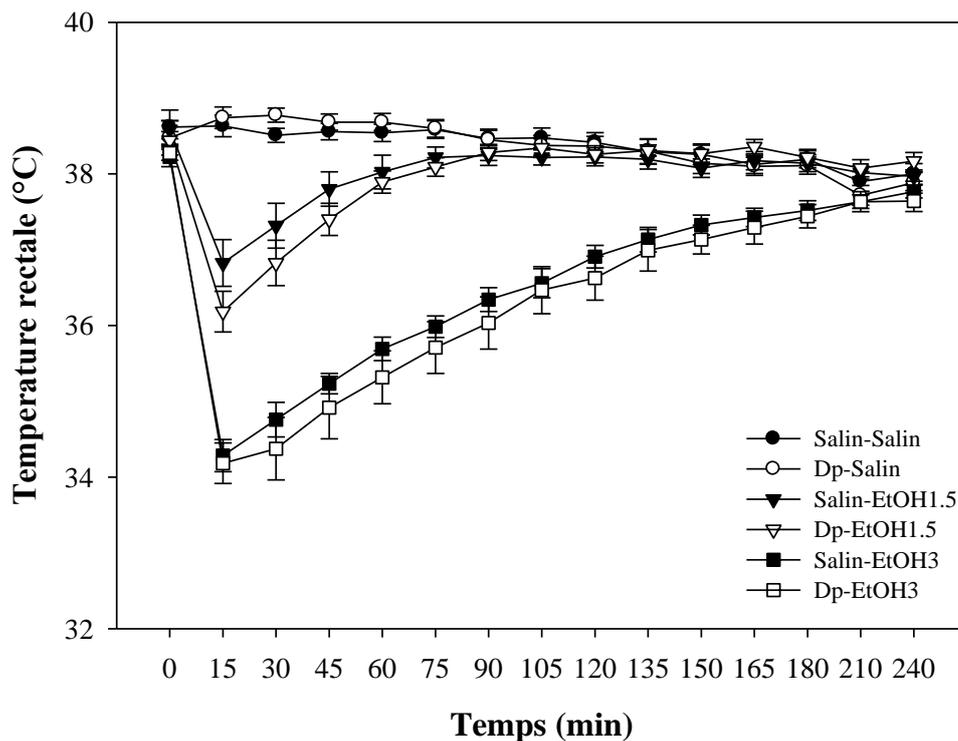


Figure 1. Température rectale moyenne (\pm ESM) des souris prétraitées avec une solution saline ou de la D-pénicillamine (75 mg/kg) et traitées avec une solution saline, une dose de 1,5g/kg ou 3g/kg d'éthanol (EtOH).

Les tests post hoc de Newman Keuls révèlent que la température des souris ne diffère pas au temps zéro selon le groupe (30 minutes après l'administration du prétraitement). Cela

signifie que les animaux ont une température de base similaire et que la D-pénicillamine n'a pas d'effet en soi sur la température (Tableau 1).

Tableau 1. Moyennes et erreurs-type au temps zéro.

Groupes	Moyennes	Erreur-type
Salin-Salin	38,61667	0,139037
Salin-1,5g/kg	38,50000	0,139037
Salin-3g/kg	38,32857	0,182043
Dp-Salin	38,45833	0,139037
Dp-1,5g/kg	38,44167	0,139037
Dp-3g/kg	38,24118	0,116815

Les analyses post hoc réalisées sur l'interaction temps*traitement révèlent que l'administration d'1,5 g/kg d'éthanol exerce un effet hypothermique significatif jusqu'à 60 minutes. A 3 g/kg, le psychotrope exerce un effet hypothermique jusqu'à 180 minutes après l'injection (Figure 2.). Cette dernière dose induit une hypothermie significativement supérieure à celle observée avec 1,5 g/kg.

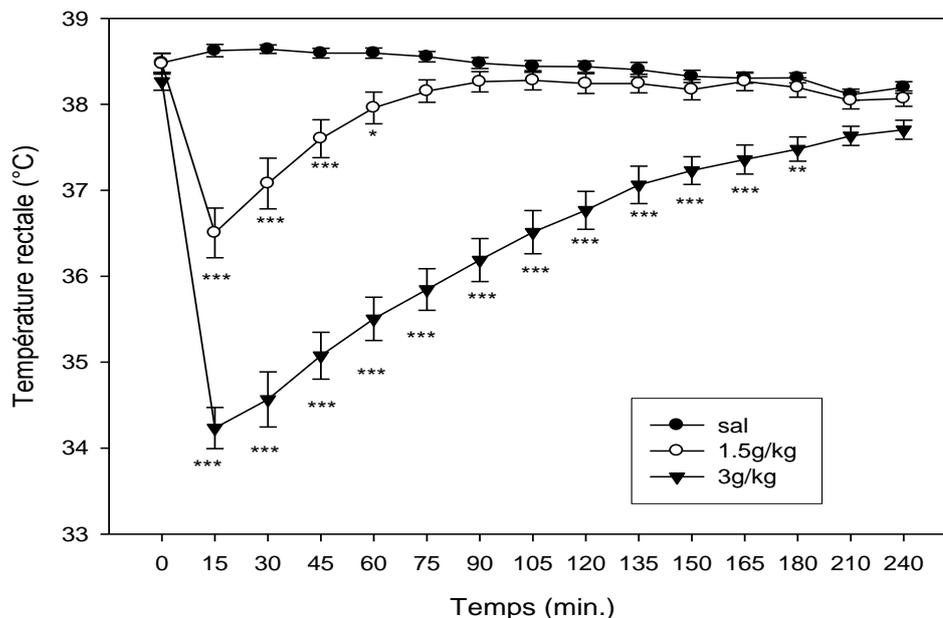


Figure 2. Température rectale moyenne (\pm ESM) des souris traitées avec une solution saline, une dose de 1,5g/kg ou 3g/kg d'éthanol, indépendamment du prétraitement. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$ et (*) $p < 0,05$ significativement différent du groupe contrôle.

1.2. Expérience 2 : D-pénicillamine / Acétaldéhyde (170 et 300 mg/kg)

Trois souris ont été retirées de l'analyse pour comportement atypique ne permettant pas de réaliser l'expérimentation dans des conditions standards (Tableau 2.).

Tableau 2. Effectif final repris dans l'analyse statistique. N=62

Groupe	Pré-traitement	Traitement
1 (n=10)	Salin	Salin
2 (n=11)	D-pénicillamine	Salin
3 (n=10)	Salin	Acétaldéhyde 170mg/kg
4 (n=10)	D-pénicillamine	Acétaldéhyde 170mg/kg
5 (n=11)	Salin	Acétaldéhyde 300mg/kg
6 (n=10)	D-pénicillamine	Acétaldéhyde 300mg/kg

L'ANOVA triple mixte réalisée sur la température rectale relevée lors de 13 temps (T0 à T180) montre un effet principal du traitement [$F_{2,56} = 14,10$; $p = 0,000011$], un effet principal du temps [$F_{12,672} = 88,92$; $p = 0,000000$], ainsi qu'un effet d'interaction entre ces deux variables [$F_{24,672} = 34,75$; $p = 0,000000$]. Tous les autres effets testés ne sont pas significatifs et notamment celui du prétraitement [$F_{1,56} = 1,27$; $p = 0,265296$].

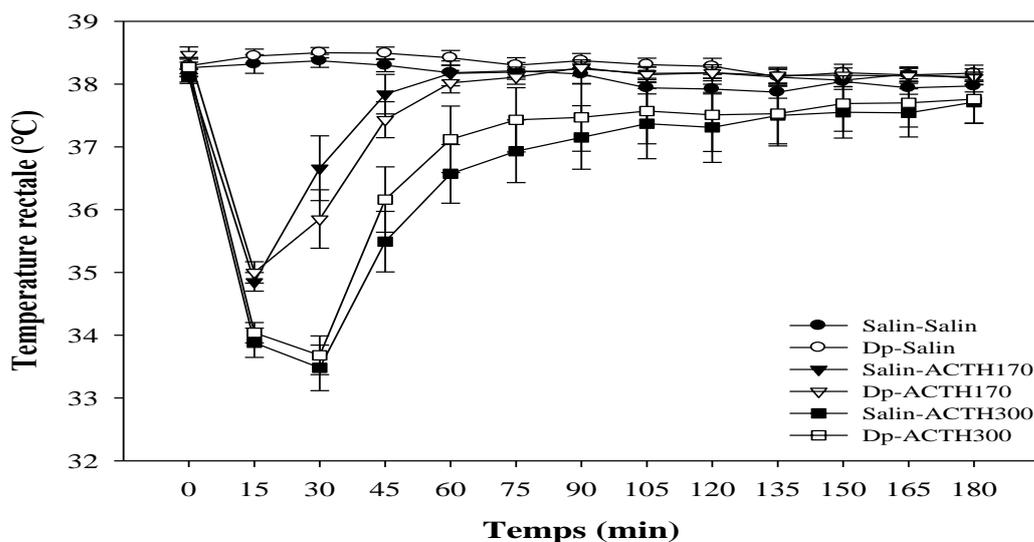


Figure 3. Température rectale moyenne (\pm ESM) des souris prétraitées avec une solution saline ou de la D-pénicillamine (75 mg/kg) et traitées avec une solution saline, une dose de 170 mg/kg ou 300 mg/kg d'acétaldéhyde (ACTH).

Les tests post hoc de Newman Keuls révèlent comme dans l'expérience précédente que la D-pénicillamine n'a pas d'effet en soi sur la température rectale des animaux (Tableau 3.).

Tableau 3. Moyennes et erreurs-type au temps zéro

Groupes	Moyennes	Erreur-type
Salin-Salin	38,26000	0,128092
Salin-170mg/kg	38,14000	0,128092
Salin-300mg/kg	38,10909	0,122131
Dp-Salin	38,29091	0,122131
Dp-170mg/kg	38,47000	0,128092
Dp-300mg/kg	38,27000	0,128092

Par ailleurs, ces mêmes analyses montrent que l'acétaldéhyde induit un effet hypothermique significatif, jusqu'à 30 minutes avec une dose de 170 mg/kg et 60 minutes pour une dose de 300 mg/kg (Figure 4.). Comme pour l'éthanol, l'effet hypothermique dépend significativement de la dose administrée, avec une hypothermie plus marquée à 300 mg/kg.

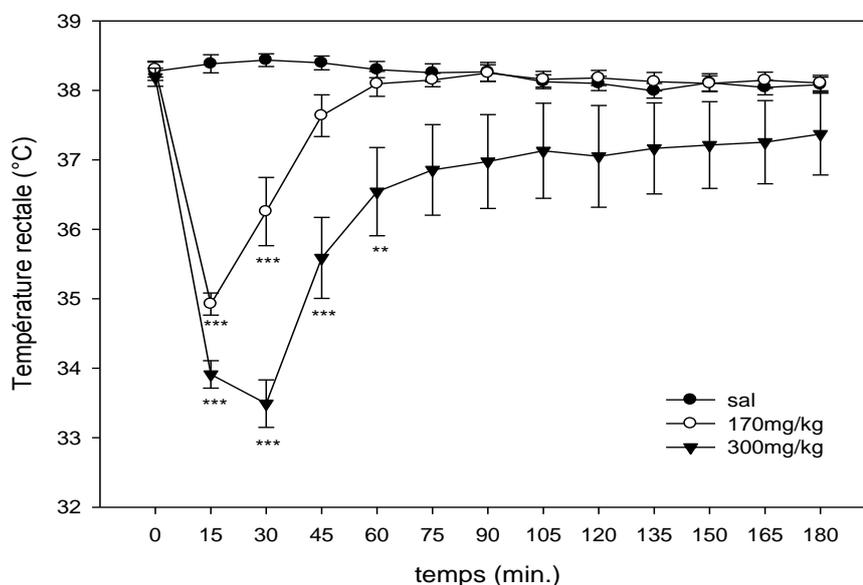


Figure 4. Température rectale moyenne (\pm ESM) des souris traitées avec une solution saline, une dose de 170 mg/kg ou 300 mg/kg d'acétaldéhyde (ACTH). (***) $p < 0,001$ et (*) $p < 0,05$ significativement différent du groupe contrôle.

2. Effet de la D-pénicillamine sur la sédation induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde

2.1. Expérience 3 et 4: D-pénicillamine / Ethanol (4 g/kg) ou Acétaldéhyde (300 mg/kg)

Le test t de Student pour échantillons indépendants révèle une absence d'effet significatif de la D-pénicillamine sur la sédation induite par 4 g/kg d'éthanol [$t_{18} = 1,889587$; $p = 0,075030$]. La même conclusion s'impose en ce qui concerne l'acétaldéhyde [$t_{18} = 0,344114$; $p = 0,712690$] (Figure 5.).

Néanmoins, compte tenu du fait que la probabilité obtenue dans l'expérience 3 (éthanol) est proche de la valeur seuil de significativité (0,05), la même expérience a été répliquée, afin de clarifier la tendance observée.

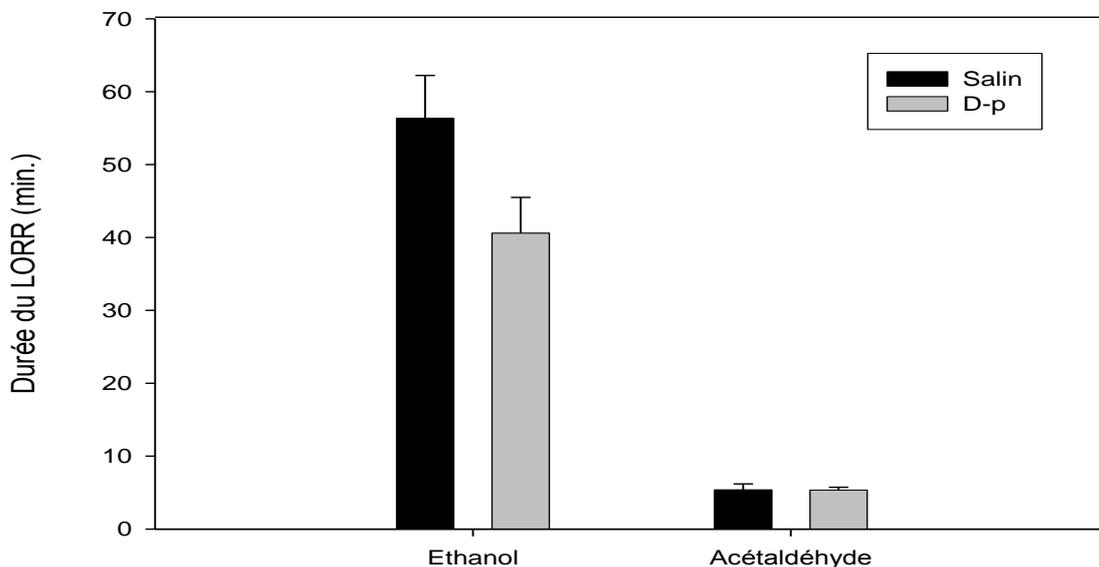


Figure 5. Durée moyenne (\pm ESM) de la perte du réflexe de retournement des souris prétraitées avec une solution saline ou de la D-pénicillamine (75 mg/kg) et traitées avec une dose de 4 g/kg d'éthanol (expérience 3) ou de 300 mg/kg d'acétaldéhyde (expérience 4).

Une souris a été retirée de l'analyse pour cause de perte de substance durant l'injection.
(Voir tableau 4.)

Tableau 4. Effectif final repris dans l'analyse. N=19

Groupe	Prétraitement	Traitement
1 (n=10)	Salin	Ethanol 4g/kg
2 (n=9)	D-pénicillamine	Ethanol 4g/kg

Le test t effectué conduit à tolérer l'hypothèse d'une absence d'effet de la D-pénicillamine sur la sédation induite par 4 g/kg d'éthanol [$t_{17} = 0,312380$; $p = 0,758551$] (Figure 6.).

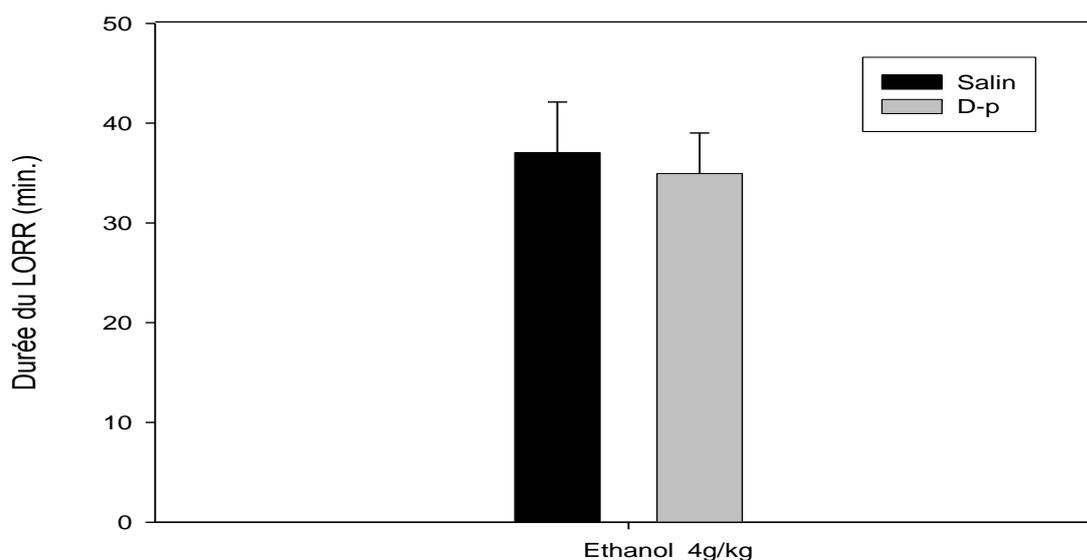


Figure 6. Réplication de l'étude 3 : Durée moyenne (\pm ESM) de la perte du réflexe de retournement des souris prétraitées avec une solution saline ou de la D-pénicillamine (75 mg/kg) et traitées avec une dose de 4 g/kg d'éthanol.

3. Investigation des effets aversifs de l'éthanol et de l'acétaldéhyde et rôle du SC

3.1. Mise au point

Par souci de légèreté, seuls les résultats finaux sont présentés (Figure 7.). Nous avons réalisé plusieurs micro-expériences afin de déterminer les concentrations optimales de chlorure de sodium (sel) et de saccharine ainsi que la position des pipettes dans la cage. Comme attendu, nous avons observé une nette préférence pour la saccharine, suffisamment renforçant à une concentration de 10% w/v. Nous avons également constaté une absence de préférence pour une solution de chlorure de sodium à 0,2M, par ailleurs discriminatif. Cette solution peut donc *a priori* être considérée comme neutre du point hédonistique.

Enfin, à noter qu'une préférence de position était présente lorsque le sel était disponible conjointement avec l'eau, (la préférence pour la saccharine masque cette préférence de position). Cette préférence est certainement due à la position habituelle des biberons d'eau. Nous avons alors inversé la position des pipettes et les avons placées dans le sens opposé de la cage, afin de modifier la configuration spatiale associée au comportement consommatoire. Ajouté au contrebalancement de la position des pipettes entre les animaux, cela permet d'annuler cette préférence.

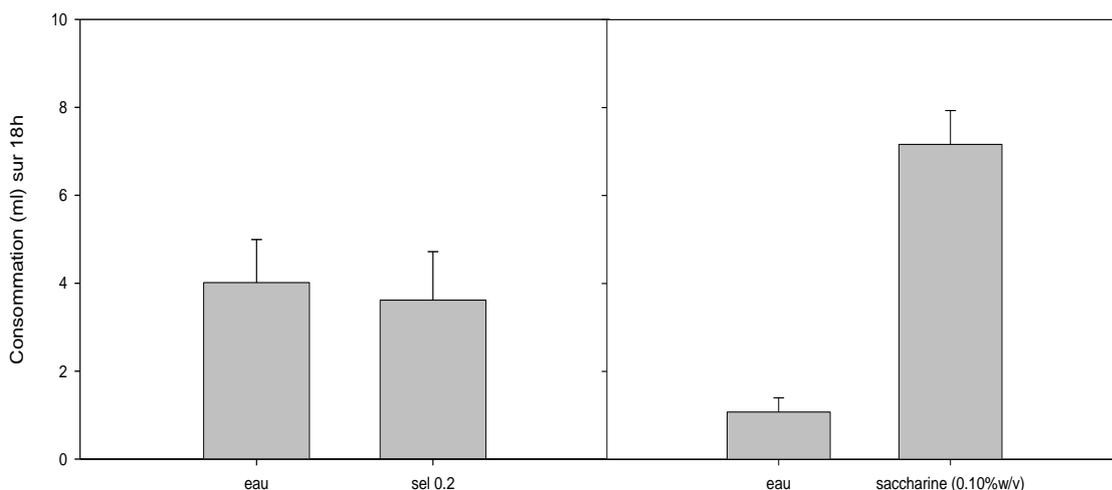


Figure 7. Consommation moyenne (\pm ESM) sur 18h lorsqu'une solution de chlorure de sodium à 0,2M ou une solution de saccharine (0,10% w/v) est disponible conjointement à une pipette d'eau.

3.2. Conditionnement

L'ANOVA triple mixte révèle un effet principal de la substance administrée [$F_{4,70} = 10,7428$; $p = 0,000001$] et un effet principal de la session [$F_{3,210} = 103,2156$; $p = 0,000000$]. Des effets d'interaction sont également ressortis de l'analyse, session*drogue [$F_{12,210} = 12,0039$; $p = 0,000000$], session*SC [$F_{3,210} = 7,3993$; $p = 0,000098$] et session*drogue*SC [$F_{12,210} = 12,0622$; $p = 0,020713$].

Les analyses post hoc de Dunnett ont été utilisées car elles permettent de comparer chaque modalité à la modalité contrôle correspondante (groupe salin) (Figure 8.).

L'ensemble des analyses montrent une absence d'aversion gustative conditionnée pour le groupe « salin », quel que soit le stimulus conditionnel. Pour la cocaïne, nous observons une légère diminution de la consommation de sel à la session 4, le groupe recevant la saccharine ne diffère pas du groupe contrôle correspondant.

Une aversion gustative se développe dès la session 3 dans le groupe « lithium », uniquement pour le sel, la diminution de consommation de saccharine n'étant pas significative.

Enfin on observe une diminution marquée de la consommation de sel et de saccharine dans le groupe « éthanol ». Dès la session 2, la consommation de sel est significativement plus faible que dans le groupe contrôle correspondant. Ce pattern se retrouve dans une moindre mesure pour le groupe de souris recevant de l'acétaldéhyde, bien que l'aversion soit plus manifeste lorsque le sel constitue le SC.

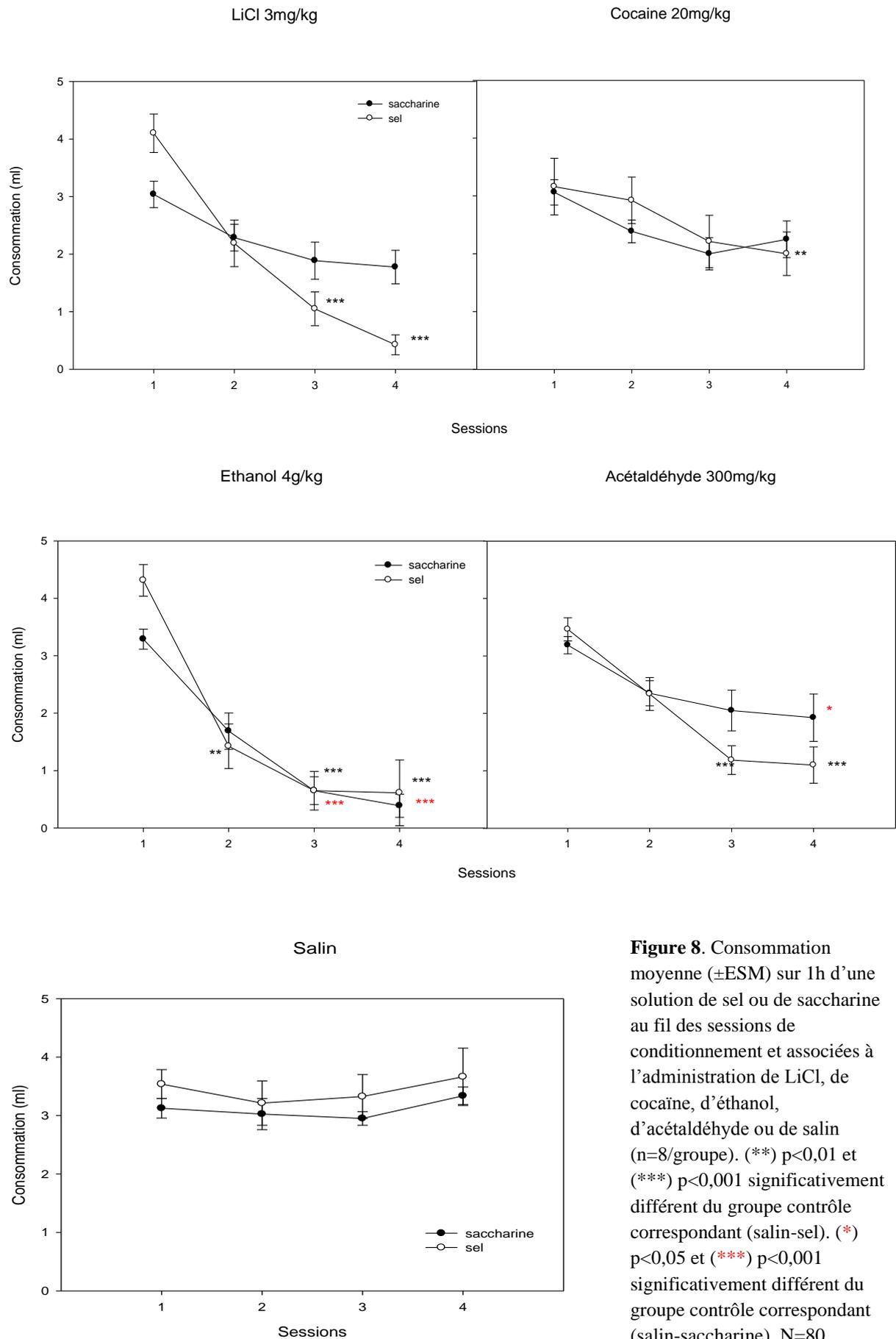


Figure 8. Consommation moyenne (\pm ESM) sur 1h d'une solution de sel ou de saccharine au fil des sessions de conditionnement et associées à l'administration de LiCl, de cocaïne, d'éthanol, d'acétaldéhyde ou de salin (n=8/groupe). (***) p<0,001 significativement différent du groupe contrôle correspondant (salin-sel). (*) p<0,05 et (***) p<0,001 significativement différent du groupe contrôle correspondant (salin-saccharine). N=80.

3.3. Test du “Two Bottle Choice”

Après la session 4, deux souris du groupe « sel-acétaldéhyde » sont mortes. L’effectif du groupe est donc réduit à six sujets. Après la dernière session de conditionnement et une phase de réhydratation, les souris ont accès conjointement à de l’eau et le stimulus conditionnel utilisé lors de la phase de pairage.

L’ANOVA factorielle réalisée sur les données du « Two Bottle Choice Test » révèle un effet principal de la substance injectée [$F_{4,68} = 38,76028$; $p = 0,000000$], un effet principal du SC [$F_{1,68} = 41,64553$; $p = 0,000000$] ainsi qu’un effet d’interaction entre ces deux variables [$F_{4,68} = 20,96759$; $p = 0,000000$] (voir Figure 9.). Des analyses post hoc de Dunnet ont été réalisées.

Les souris ayant reçu du LiCl, de l’éthanol ou de l’acétaldéhyde montrent une aversion manifeste pour le stimulus conditionnel, qu’il s’agisse de saccharine ou de sel.

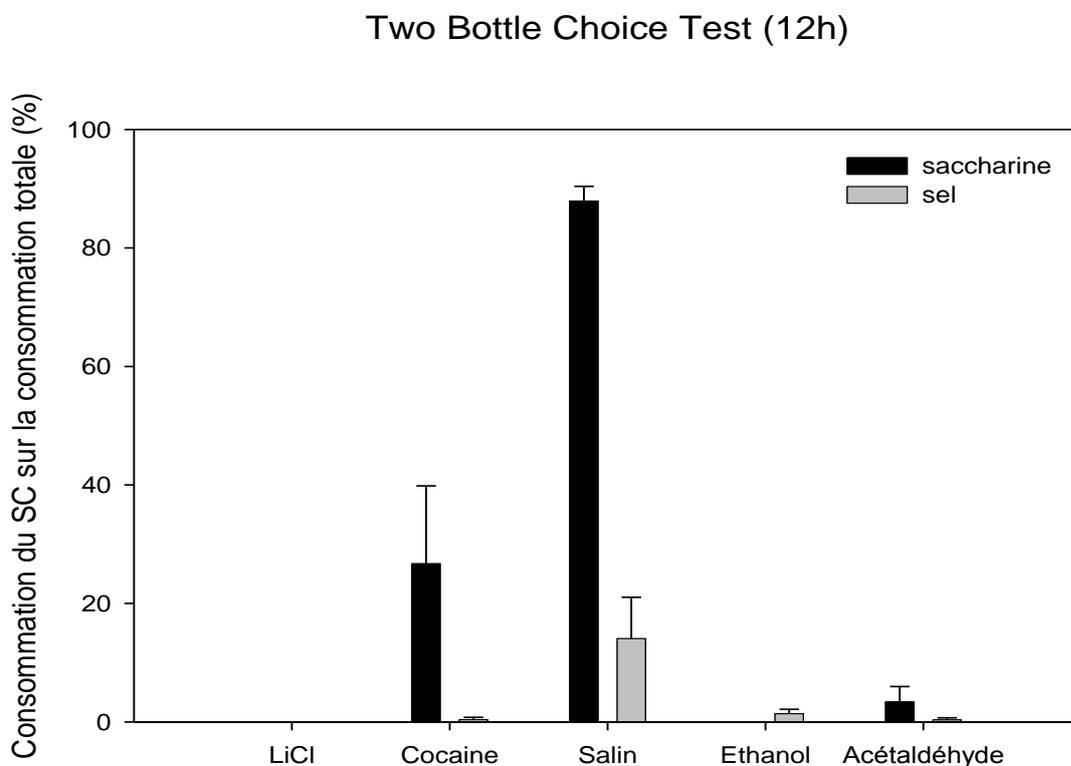


Figure 9. Pourcentage moyen (\pm ESM) de consommation du SC sur la consommation totale. Test sur 12 heures après 24 heures de réhydratation. Dix groupes ($n=8$ /groupe, excepté pour le groupe « sel-acth » ($n=6$). $N=78$

Les souris du groupe « cocaïne-saccharine » montrent une aversion modérée pour celle-ci, significativement plus faible que celle observée pour le sel du groupe « cocaïne-sel ».

Comme attendu, les souris du groupe « salin-saccharine » consomment de grande quantité de saccharine, largement préférée à l'eau comme cela avait été observé dans la mise au point.

Enfin, on observe que les souris du groupe « salin-sel » évitent ce dernier et préfèrent consommer de l'eau. Ce résultat est très différent de ce que l'on observait dans la mise au point durant laquelle les souris consommaient de manière équivalente les deux liquides.

3.4. Rôle du sel

Afin de clarifier le rôle du sel dans ces effets, une seconde expérience a été réalisée sur 48 souris femelles, naïves de toute expérimentation. La même procédure a été utilisée, excepté que trois stimuli conditionnels ont été utilisés : une solution de chlorure de sodium à 0.1M ou 0.2 M et une solution de saccharine à 10% w/v. L'exposition aux SC était suivie d'une injection de solution saline (aucune drogue n'a été utilisée). Enfin, seule la moitié des sujets a été soumise à la procédure de restriction d'eau. L'autre moitié des sujets avait accès continuellement à l'eau, excepté évidemment pendant l'heure d'exposition au stimulus conditionnel.

Tableau 5. Récapitulatif des différents groupes. N=48

SC	Déshydratées	Hydratées
sel 0,1M	n=8	n=8
sel 0,2M	n=8	n=8
saccharine	n=8	n=8

L'ANOVA triple mixte 3(SC) X 2(Groupe) X 4(Session) révèle une effet principal du groupe [$F_{1,42} = 14,3895$; $p = 0,0047$], un effet d'interaction groupe*SC [$F_{2,42} = 3,2509$; $p = 0,048676$] et un effet d'interaction session*groupe [$F_{3,126} = 42,505$; $p = 0,006746$].

Les souris consomment donc de manière équivalente les trois SC. Etant donné la restriction d'eau, les souris déshydratées boivent en moyenne de plus grande quantité. Enfin, comme attendu, aucune aversion particulière n'est constatée : l'analyse ne révèle pas d'effet de la session [$F_{3,26} = 0,4857$; $p = 0,692832$] (Figure 10.)

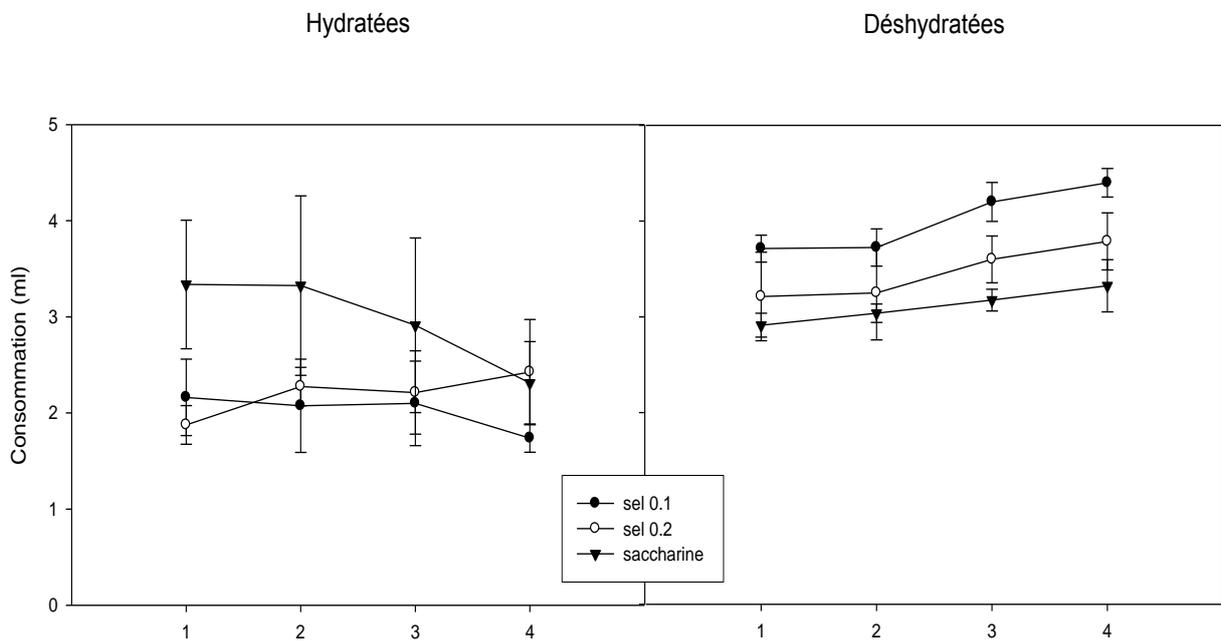


Figure 10. Consommation moyenne (\pm ESM) sur 1h d'une solution de sel, 0.1M, 0.2M, ou de saccharine au fil des sessions de conditionnement (injection de salin) pour deux groupes de souris (hydratées vs déshydratées) ($n=8$ /groupe).

3.4.1. « Two bottle choice test »

Après la dernière session de conditionnement, les souris ont accès conjointement à de l'eau et le stimulus conditionnel utilisé lors de la phase de pairage.

L'ANOVA factorielle réalisée sur les données du « Two Bottle Choice Test » révèle un effet principal du groupe [$F_{1,42} = 39,3432$; $p = 0,000000$], un effet principal du SC [$F_{2,42} =$

36,9718 ; $p = 0,000000$] ainsi qu'un effet d'interaction entre ces deux variables [$F_{2,42} = 7,9543$; $p = 0,001177$] (voir Figure 11.).

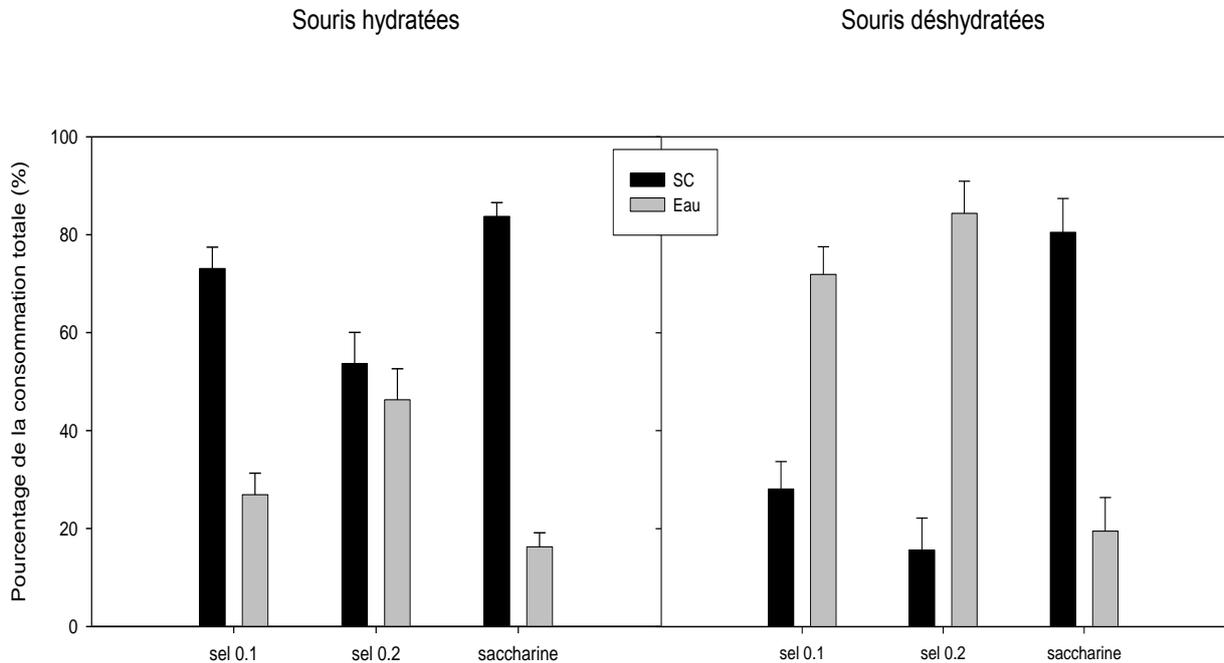


Figure 11. Pourcentage moyen (\pm ESM) de consommation du SC sur la consommation totale. Test sur 1h. La consommation d'eau est également représentée.

Les deux groupes ne diffèrent pas quant à leur consommation de saccharine, toujours préférée à l'eau.

Par contre, en ce qui concerne le sel, les deux groupes montrent un pattern quasi inverse. Chez les souris hydratées, le sel à 0.1 M semble renforçant (préférée à l'eau). Comme nous l'avons observé lors de la mise au point, on remarque une équivalence de consommation pour le sel 0,2 M et l'eau. A l'inverse, dans le groupe des souris « déshydratées » (soumises au protocole de restriction d'eau), on observe un évitement du sel, quel que soit la concentration.

Après 24 heures d'hydratation, nous avons ré-effectué le test « two bottle choice » pendant 12 heures, uniquement chez les souris déshydratés et constatons que le pattern de consommation reste sensiblement le même (Figure 12.).

Two bottle choice souris déshydratées 12h

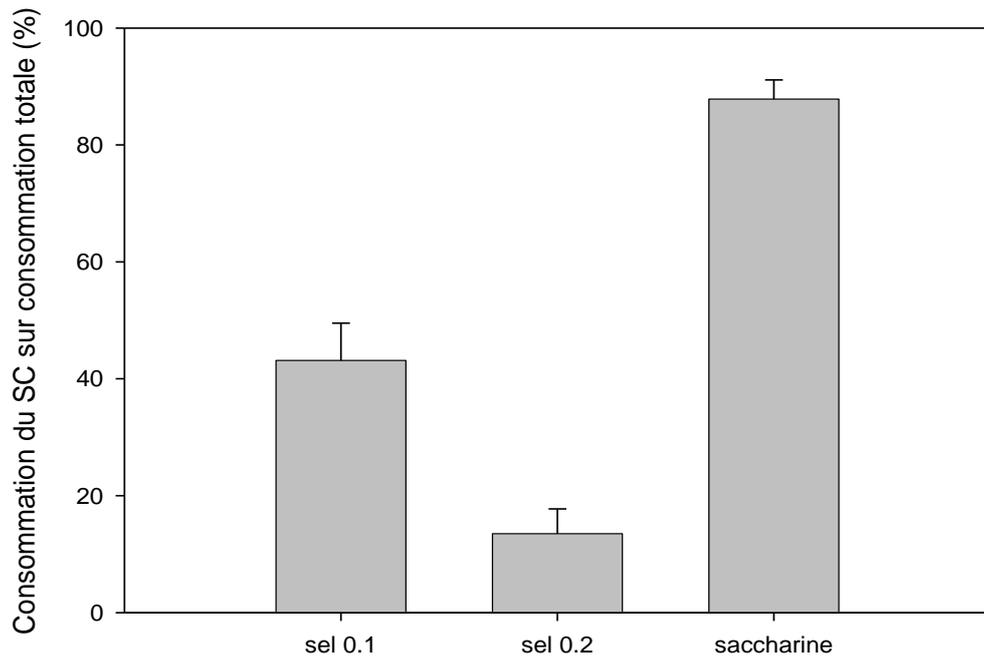


Figure 12. Pourcentage moyen (\pm ESM) de consommation du SC sur la consommation totale. Test sur 12h après 24 heures de réhydratation (groupe déshydraté).

IV. Discussion

1. Rôle de l'acétaldéhyde dans les effets hypothermiques et sédatifs de l'éthanol

1.1. Effets hypothermiques

Les expériences évaluant les effets hypothermiques réalisées chez des souris femelles Swiss montrent que la D-pénicillamine n'influence pas l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde.

Ces deux substances induisent une perte significative de la température rectale se manifestant dès la première mesure, à savoir 15 minutes après l'injection.

Cet effet hypothermique est dépendant de la dose avec une hypothermie marquée aux plus fortes doses.

Dans le cas de l'éthanol, on observe une perte maximale moyenne de 3,9°C à la 15^{ème} minute après l'injection de 3g/kg et une hypothermie significative durant trois heures. La dose de 1.5g/kg exerce également son effet maximal à la 15^{ème} minute avec une perte moyenne de 1,9 °C. Cette hypothermie induite par 1,5g/kg reste significative pendant une heure.

Pour l'acétaldéhyde, la dose de 170mg/kg induit une hypothermie significative durant 30 minutes avec une perte maximale moyenne de 3,3°C à la 15^{ème} minute. Une dose de 300mg/kg d'acétaldéhyde provoque une perte maximale moyenne de 4,8°C se manifestant à la 30^{ème} minute. Après une heure, l'hypothermie que provoque une telle dose n'est plus significative.

Ces résultats sont conformes aux données obtenues chez le rat et la souris. Chez le rat, Myers et ses collègues (1987) ont montré que l'administration d'acétaldéhyde provoque une hypothermie dépendante de la dose, uniquement avec de fortes doses, entre 150 et 300 mg/kg. Ils ont observé une diminution de 2 à 3°C, 20 minutes après une injection intra-péritonéale de la substance.

Par ailleurs, nous avons répliqué les données obtenues par Closon et al., en 2009 qui ont montré chez la souris Swiss que l'acétaldéhyde possède des propriétés hypothermiques à doses élevées (170 et 300 mg/kg). Ces auteurs ont montré également que des doses plus faibles (56 et 100mg/kg) n'induisent pas d'hypothermie significative. Enfin, dans cette étude,

ils ont montré que l'injection de 3g/kg d'éthanol provoquait une diminution maximale moyenne d'environ 3°C, comparable aux résultats obtenus ici avec la même dose.

On peut remarquer globalement des pertes de température un peu plus importantes dans la présente étude. Il est possible que cela soit lié la température ambiante du laboratoire, légèrement en deçà des niveaux habituels ($20,5^{\circ}\text{C}\pm 0,6$).

Néanmoins, ces résultats, comme les précédents, indiquent que l'acétaldéhyde exerce en soi des effets hypothermiques. A l'instar des travaux précédents, la durée de cette diminution de température est plus courte après l'injection d'acétaldéhyde par rapport à l'éthanol. Cette effet est dû aux différences pharmacocinétiques des deux substances et n'exclut pas l'hypothèse de la contribution de l'acétaldéhyde aux effets hypothermiques de l'éthanol. Pour rappel, En effet, l'acétaldéhyde est rapidement métabolisé en acétate par l'ALDH alors que l'ADH est rapidement saturée suite à l'administration d'une telle dose d'éthanol.

De plus, il a été montré chez le rat et la souris que l'inhibition de l'ALDH par le cyanamide ou le disulfiram potentialise l'effet hypothermique de l'éthanol (Closon et al., 2009 ; Jenssen & Faiman, 1986). Comme ces substances sont connues pour augmenter les niveaux périphériques et cérébraux d'acétaldéhyde (Jamal et al., 2007), ces résultats supportent l'implication du métabolite dans les effets hypothermiques de son précurseur.

Toutefois, puisque la D-pénicillamine n'a pas d'effet sur l'hypothermie induite par l'éthanol et l'acétaldéhyde, nous ne pouvons apporter d'informations supplémentaires qui permettraient de clarifier son implication.

1.2. Effets sédatifs

Comme pour l'hypothermie, l'administration de D-pénicillamine ne modifie pas de manière significative l'effet sédatif de fortes doses d'éthanol ou d'acétaldéhyde. Puisqu'une tendance a été observée pour la première expérience réalisée avec 4 g/kg d'éthanol, l'expérience a été répliquée, conduisant finalement à tolérer l'hypothèse d'une absence d'effet de la D-pénicillamine.

Au-delà de l'absence d'effet de cette substance, les résultats sont conformes à ceux de la littérature. Il a été montré que l'effet sédatif de l'éthanol dépend de la dose et que 4g/kg et plus provoquent une perte rapide du réflexe de retournement durant plus d'une heure chez la souris (Correa et al., 2001a ; Tambour et al., 2007). Indépendamment du prétraitement, l'éthanol induit une durée moyenne de perte du réflexe de 48 minutes (± 16.4) dans la première expérience et de 36 minutes (± 14.2) dans la seconde. Ces durées sont légèrement plus courtes que les LORR observées dans d'autres travaux. Néanmoins, on remarque une grande variabilité inter-individuelle dans les effets sédatifs de l'éthanol chez la souris Swiss.

Concernant l'acétaldéhyde, il a été montré chez les rongeurs non sélectionnés qu'une perte significative du réflexe de retournement n'apparaît pas en deçà de 150 mg/kg (Quertermont et al., 2004). Les études précédentes indiquent également que la durée des effets sédatifs de l'acétaldéhyde comparé à ceux de l'éthanol est très brève. Quertermont et al., en 2004 ont observé chez la souris C57BL/6 une perte du réflexe de retournement pendant 6 minutes en moyenne après l'administration intrapéritonéale de 300mg/kg. Les données obtenues dans cette expérience chez la souris Swiss concordent parfaitement avec cette observation. Indépendamment du prétraitement, les souris recevant une injection de 300mg/kg d'acétaldéhyde perdent leur réflexe de retournement pendant 5 minutes en moyenne ($\pm 1,4$). L'écart entre les effets observés de l'éthanol et de l'acétaldéhyde s'explique par des différences d'ordre cinétique, déjà mentionnées, mais n'exclue pas l'implication potentielle du métabolite. En effet, après l'administration d'éthanol, l'acétaldéhyde est graduellement produit à partir de son métabolisme et s'accumule lentement. Les effets de son accumulation locale peuvent durer jusqu'à ce que l'éthanol soit complètement dégradé. En revanche, lorsque l'acétaldéhyde est directement administré, il est rapidement métabolisé par l'ALDH, ce qui explique la courte durée de ses effets. D'ailleurs, certaines études ont montré que le cyanamide potentialisait la durée de la perte du réflexe de retournement induite par 3 et 4g/kg d'éthanol (Tambour et al., 2007). Néanmoins, le cyanamide n'induit pas de perte de réflexe après une dose de 2g/kg d'éthanol, qui en soi n'a pas d'effet sédatif significatif. Il semblerait que seules les doses élevées d'acétaldéhyde ou une combinaison de cyanamide et de fortes doses d'éthanol (3g/kg et plus) sont capables d'induire une sédation significative. Le métabolite ne serait donc pas totalement responsable des effets sédatifs de l'éthanol.

La D-pénicillamine est une substance dérivée de la pénicilline qui d'après les premières études pharmacologiques, interagit avec l'acétaldéhyde (Nagasawa et al., 1977, 1978). Cette interaction est attribuée à une forte réactivité du groupement carbonyle de l'aldéhyde,

réagissant de manière non-enzymatique pour former des adduits stables (Kera et al., 1985 ; Nagasawa et al., 1980 ; Serrano et al., 2007). Ces thiols ont donc été identifiés comme des agents « séquestrant » l'acétaldéhyde généré lors de l'oxydation de l'éthanol *in vivo* (Nagasawa, 1978). L'administration systémique de D-penicillamine conduit à une diminution des niveaux sanguins d'acétaldéhyde générée après administration systémique d'éthanol, sans altérer les concentrations de ce dernier (Nagasawa et al., 1987).

Il est possible pour une raison inconnue que l'absence d'effet de la D-penicillamine soit spécifique à certaines mesures comportementales. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience méthodologiquement identique à celle réalisée par Font et al., en 2005 a été effectuée au laboratoire. Font et ses collaborateurs en 2005 montrent que la D-penicillamine bloque l'activation locomotrice provoquée par l'éthanol chez la souris. Les résultats obtenus pour nous sont non significatifs.

Si la D-penicillamine séquestre effectivement l'acétaldéhyde, alors nos résultats amènent à conclure que cette action n'est pas suffisamment efficace pour qu'un effet comportemental se manifeste.

2. Effets aversifs de l'éthanol et de l'acétaldéhyde

L'aversion gustative conditionnée se base sur un apprentissage associatif, pendant lequel un stimulus gustatif (stimulus conditionnel) est associé aux effets désagréables d'une substance (stimulus inconditionnel) conduisant à une diminution de la consommation du stimulus gustatif (réponse inconditionnelle). Depuis la découverte que des drogues d'abus, renforçantes chez l'homme et l'animal, pouvaient provoquer une aversion gustative conditionnée, les chercheurs tentent d'expliquer ce qui apparaît à première vue comme un paradoxe.

Ce constat suggère que ces drogues exercent aussi des effets aversifs, indépendants de leurs propriétés positives, qui dépendraient notamment de la dose administrée, avec une aversion se manifestant aux doses élevées.

Une explication alternative est proposée en 1997 par Grigson P. connue sous l'hypothèse de « comparaison de renforçateur » (Grigson, 1997). Selon cette hypothèse, la diminution de consommation du stimulus conditionnel induite par les drogues d'abus n'implique aucunement des propriétés aversives mais bien leurs effets hédoniques positifs. Cette hypothèse se base sur plusieurs observations.

La suppression de la prise d'un stimulus gustatif comme la saccharine apparaît lorsque celle-ci prédit l'accès à un stimulus inconditionnel préféré, comme du sucre. Un phénomène connu sous le nom de « contraste anticipatoire » : la saccharine est dévaluée par la disponibilité future d'un renforçateur plus important (Flaherty & Grigson, 1988). Selon cette hypothèse, la suppression de consommation de saccharine induite par des drogues d'abus serait donc sous-tendue par une dévaluation du stimulus qui prédit l'accès à une drogue psychoactive renforçante, comme la cocaïne.

L'aversion gustative conditionnée des drogues serait alors qualitativement différente de celle induite par des stimuli inconditionnels conventionnellement utilisés comme le chlorure de lithium. Ces substances engendraient de « véritables » aversions conditionnées étant donné leur effet uniquement toxique.

Dans cette perspective, si la réduction de la consommation du SC induite par des drogues d'abus reflète une véritable aversion, alors cette diminution devrait apparaître indépendamment de la nature hédonistique du SC, positive ou neutre.

1. Statut du NaCl

Grigson en 1997 montre que des rats préfèrent une solution de saccharine (0.15%) à une solution de chlorure de sodium (0.1M) et a utilisé ces concentrations dans son expérience d'aversion gustative conditionnée pour la cocaïne. La théorie de la comparaison prédit une faible, voire une absence d'aversion pour une solution de NaCl, lorsque celle-ci est associée à une drogue aux propriétés renforçantes (comme l'éthanol ou la cocaïne), étant donné le caractère neutre du stimulus. Dans cette expérience, Grigson a notamment montré une diminution de la consommation de saccharine mais pas de NaCl, lorsque ces SC étaient associés à une injection de cocaïne, validant selon elle l'hypothèse qu'elle défend.

Durant la mise au point de l'expérience 5, nous avons également constaté que les souris préféraient la saccharine (0.15%) au NaCl (0.1M). Mais nous avons également mis en évidence que le NaCl à 0.1M était préféré à l'eau, indiquant qu'à cette concentration, le sel possède un effet hédonique positif (données non présentées). Ce n'est pas le cas du sel à une concentration de 0.2M dont la consommation est équivalente à celle de l'eau. Cette concentration a donc été choisie pour sa valeur apparemment neutre. Il s'agit de la même concentration utilisée par Broadbent et al., en 2002 où l'aversion gustative conditionnée pour le sel uniquement a été comparée chez 15 souches consanguines de souris.

Néanmoins, les données obtenues dans ce mémoire soulignent l'importance du « two bottle choice test » en fin de conditionnement et amènent à remettre en cause l'utilisation du NaCl comme élément déterminant la nature des aversions observées, lorsque sa consommation est comparée à celle de la saccharine.

En effet, dans cette étude, la consommation de sel semble être déterminée par l'interaction de trois facteurs au moins : l'effet de la drogue administrée, la possibilité du choix et l'état de déshydratation de l'animal.

Durant les phases de conditionnement, le LiCl ne semble pas générée d'aversion significative pour la saccharine contrairement au sel. Néanmoins, lorsque le choix leur ait donné, les animaux montrent une consommation absolument nulle des deux stimuli, confirmant l'effet aversif bien connu du LiCl. Durant la phase de conditionnement, il est possible que la consommation plus faible du NaCl s'explique par un effet aversif additionnel de ces deux sels, poussant les souris à ne consommer que très peu de liquide.

Pour la cocaïne, l'évolution de la consommation de sel est similaire à celle de la saccharine. L'analyse révèle toutefois que la consommation de sel durant la 4^{ème} session est significativement plus faible comparée au groupe contrôle. Lors du « two bottle choice test », alors que la consommation de saccharine suggère une aversion modérée pour ce stimulus gustatif, la consommation de sel indique une aversion manifeste pour ce dernier.

Ces résultats sont différents de ce qu'a observé Grigson. Plusieurs points méritent d'être mentionnés. Tout d'abord, son étude a été réalisée chez le rat, des différences inter-espèces ne peuvent être exclues. Ensuite, les injections de cocaïne ont été réalisées en sous-cutanée. Dans une analyse des effets de la voie d'administration sur les CTA induite par la cocaïne, Ferrari et al., en 1991 montrent que les animaux recevant des injections sous-cutanées acquièrent des aversions robustes, dépendantes de la dose. Par contre, ces mêmes doses intrapéritonéales ne provoquent que de faibles aversions, un résultat conforme à ce que l'on observe ici. En outre, il est intéressant de constater que la cocaïne conditionne une préférence de lieu lorsqu'elle est injectée en intrapéritonéal et non en sous-cutané (Mayer et al., 1993). Enfin, dans l'expérience de Grigson, un test de choix n'a pas été réalisé, ce qui semble problématique compte tenu de ce que suggèrent les résultats obtenus dans ce mémoire.

Concernant l'éthanol, on remarque une aversion robuste pour les deux stimuli durant les phases de conditionnement, confirmée dans le test de choix. En ce qui concerne l'acétaldéhyde, on peut observer une aversion significative pour le sel, confirmée dans le « two bottle choice test ». Comme pour la cocaïne, une diminution modérée de la consommation de saccharine est relevée. Mais à la différence de la cocaïne, on remarque une aversion importante pour celle-ci lorsque le choix entre de l'eau et de la saccharine est disponible.

Les résultats obtenus pour l'éthanol sont conformes avec ceux de Brodbent et al., en 2002 qui ont utilisé la même procédure, excepté l'utilisation de saccharine ainsi que d'un test de choix. Ils ont néanmoins montré que 4g/kg d'éthanol induit une robuste CTA au fil des sessions chez 15 souches de souris consanguines, indiquant un effet aversif majeur à cette dose.

Nos résultats sont également cohérents avec les données de Risinger & Cunningham qui indiquent qu'une aversion pour l'éthanol se développe plus rapidement avec du NaCl que de la saccharine (Risinger & Cunningham, 1995). Dans l'expérience que nous avons réalisée, on

peut observer en effet une nette différence de consommation de sel entre la première et la seconde session de conditionnement.

Enfin, comme attendu, on n'observe aucune aversion particulière pour les deux stimuli conditionnels du groupe salin. Néanmoins, lorsque le stimulus conditionnel est présenté conjointement avec de l'eau, on remarque un pattern opposé chez ce groupe de souris. Alors que la saccharine est largement préférée à l'eau, les animaux ayant reçu du sel comme SC montrent une aversion statistiquement équivalente aux autres groupes qui ont été exposés à ce stimulus gustatif. A première vue, ce résultat est surprenant car il diffère de ce que l'on a pu observer dans la mise au point durant laquelle les animaux consommaient de manière équivalente l'eau et le sel à 0.2M. La seule différence réside dans le fait que les animaux utilisés dans la mise au point n'ont pas été soumis à un protocole de restriction d'eau. D'un autre côté, lorsque l'on compare les sessions de conditionnement au sel 0.2M des différentes drogues avec celles du groupe salin, on peut constater une aversion plus ou moins marquée induite par ces drogues, contrairement au groupe contrôle.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'état de déshydratation de l'animal modifie la valeur hédonique du sel et que cette modification ne se manifeste uniquement lorsque le choix entre de l'eau ou du sel ait donné à l'animal. C'est ce que confirme la dernière expérience réalisée. Les souris non soumises à un protocole de restriction d'eau montrent une préférence du sel 0.1M sur l'eau et une consommation d'eau et de sel 0.2M équivalente lorsque ce choix est offert. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de la mise au point. Par contre, on obtient un pattern quasi inverse pour des souris déshydratées : la consommation de sel est évitée, particulièrement pour le sel 0.2M.. En revanche, la consommation de saccharine est identique chez les deux groupes de souris.

Si l'état de déshydratation rend le sel 0.2M si aversif, on peut se demander pourquoi les souris du groupe contrôle notamment, maintiennent des niveaux de consommation équivalents à ceux de la saccharine. Chez l'homme, les pertes liquidiennes normales de l'organisme, causées par la sudation, la respiration et les urines, sont d'environ 1,5 à 2 litres par jour. Elles sont combinées à une perte de substances dissoutes dans les liquides corporels, notamment à la perte de chlorure de sodium (sel). La déshydratation survient lorsque ces déperditions ne sont pas compensées par un apport équivalent. Cet état s'observe en cas d'apport hydrique insuffisant entre autres.

La soif semble dépendre de deux types de signaux, l'un correspond à une diminution du volume sanguin ou hypovolémie, l'autre correspond à la concentration des substances dissoutes dans le sang (comme le sodium et le chlore) ou hypertonicité.

L'hypovolémie déclenche la soif dite volumétrique, notamment par un apport insuffisant d'eau. Cette diminution du volume sanguin déclenche la sécrétion de vasopressine, une hormone produite par la neurohypophyse, qui va agir directement sur les reins pour augmenter la rétention d'eau et inhiber la production d'urine. Cette sécrétion de vasopressine est déclenchée par deux types de stimuli. Tout d'abord l'augmentation des niveaux d'angiotensine II, se produisant en réponse à une diminution de l'afflux sanguin vers les reins et qui va stimuler les neurones de l'organe subfornical du télencéphale, stimulant à son tour les cellules magnocellulaires de l'hypothalamus produisant alors de la vasopressine. Ensuite, les mécanorécepteurs qui signalent la chute de la pression artérielle. Ces signaux atteignent alors l'hypothalamus par le nerf vague et le noyau du faisceau solitaire. La diminution du volume sanguin stimule également la composante sympathique du système nerveux autonome afin de corriger la chute de la pression artérielle. Elle stimule l'animal à chercher de l'eau et la boire.

Le second stimulus déclenchant la soif est l'hypertonicité du sang, lorsque l'on absorbe trop de sel par exemple. L'hypertonicité est perçue par les neurones de l'organe vasculaire de la lame terminale. Lorsqu'il y a hypertonicité, l'eau sort des cellules. Cette déshydratation modifie la décharge des neurones mentionnés qui vont directement exciter les cellules responsables de la sécrétion de vasopressine et vient stimuler la soif osmotique et pousse l'animal à consommer de l'eau (Bear et al., 2007).

Dans cette expérience, il est possible que la restriction d'eau d'une part et l'absorption de sel d'autre part viennent stimuler la recherche d'eau. A défaut d'eau, les souris déshydratées continuent de consommer la solution de chlorure de sodium qui pendant un temps court rétablit la balance hydrique. Mais lorsque l'eau est disponible, comme le « two bottle test », les animaux se dirigent préférentiellement vers la solution la plus « hydratante ». On peut par ailleurs supposer que ce besoin n'est pas suffisamment important pour venir contrecarrer l'effet aversif des substances utilisées.

2. Le statut de la théorie de la « comparaison de renforçateur »

Au regard de la théorie de comparaison des renforçateurs, nos résultats ne nous permettent pas d'émettre de conclusions concernant l'effet aversif de l'éthanol et de l'acétaldéhyde, puisque nous avons mis en évidence que le NaCl n'était pas un stimulus neutre et que son utilisation dans ce protocole semble problématique.

Cette théorie ne rend pas compte toutefois d'un certain nombre de données. Celles-ci tendent à donner raison à l'hypothèse selon laquelle ce protocole révèle les effets aversifs des drogues d'abus, et de l'éthanol en particulier.

Si les propriétés renforçantes des drogues d'abus sous-tendent la CTA, on devrait pouvoir observer une corrélation entre les phénotypes observés dans le protocole de CTA et les protocoles de CPP et d'auto-administration. Les souches de souris ou de rats qui présentent un comportement d'auto-administration élevé devraient montrer une aversion gustative robuste.

Il existe une variation génétique de la sensibilité aux effets aversifs de l'éthanol. Par exemple, la souris C57BL/6J semble relativement insensible aux effets aversifs d'une dose de 2g/kg alors que la DBA/2J développe une aversion très forte à cette dose (Broadbent et al., 2002 ; Horowitz & Whitney, 1975). Parallèlement, la C57BL/6J et la DBA/2J sont connues pour leur forte et faible appétence respectives pour le psychotrope (Crawley et al., 1997).

Il s'agit d'une relation inverse à celle prédite par l'hypothèse de comparaison de renforçateur. Ce constat souligne l'existence de différences individuelles dans les effets aversifs de l'éthanol qui pourrait jouer un rôle protecteur dans l'abus de sa consommation. Cela suggère aussi que le paradoxe apparent entre la CTA et l'auto-administration puisse s'expliquer en termes de propriétés motivationnelles opposées, au moins pour l'éthanol.

En revanche, une corrélation génétique a été établie entre la CTA induite par 4g/kg d'éthanol et l'hypothermie ainsi que les symptômes de manque induits par cette dose (Risinger & Cunningham, 1998). Cette association souligne le rôle potentiel de ces deux facteurs dans l'effet aversif de l'éthanol. Même si les expériences réalisées ici l'ont été chez des sujets différents, nous constatons une association entre les effets hypothermiques de l'éthanol et de l'acétaldéhyde et leurs effets aversifs, l'acétaldéhyde produisant une hypothermie et une aversion moindre que celles produites par l'éthanol.

L'examen de certains facteurs influençant l'auto-administration devrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'aversion gustative conditionnée des drogues d'abus. L'historique toxicomaniaque par exemple. Les animaux qui ont été exposés à la cocaïne et l'éthanol acquièrent typiquement une auto-administration plus rapidement que les animaux naïfs (Horger et al, 1990 ; Camarini & Hodge, 2004). Selon la théorie de Grigson, cette expérience de la drogue ne devrait pas atténuer la CTA. Une sensibilisation aux effets renforçants, sous-tendue par une modification du fonctionnement mésocorticolimbique, devrait même potentialiser l'aversion gustative conditionnée. Les données de la littérature montrent l'inverse. Cette préexposition atténue la CTA induite par ces deux substances (Berman & Cannon, 1974). Après 35 jours d'administration d'alcool, des rats recevaient 2 ou 5g/kg d'éthanol après une solution de saccharine. Les rats contrôles montrent une CTA dépendante de la dose alors que les animaux pré-exposés à la drogue montrent une aversion abolit lorsque la dose est de 2g/kg et atténuée pour les animaux recevant une injection de 5g/kg. Cet effet de l'historique pourrait être lié au développement d'une tolérance aux effets aversifs de l'éthanol.

L'âge affecte également la consommation de drogues. Les adolescents s'auto-administrent la cocaïne et l'éthanol plus rapidement et en plus grande quantité que les adultes (Lynch, 2008 ; Tambour et al., 2008). Ils sont donc plus susceptibles de consommer des drogues pendant cette période de développement. Chez ces adolescents, de plus faibles acquisitions de CTA sont constatées. C'est vrai aussi pour le LiCl, ce qui suggère qu'ils soient moins sensibles aux aversions de manière générale (Scgramm-Sapita et al., 2006).

Un des arguments de la théorie de Grigson réside dans l'observation que le LiCl et autres agents émétiques déclenchent des réponses oro-faciales de dégoût, non observées avec les drogues d'abus. Ce constat ne donne pas forcément raison à la théorie d'une aversion qualitativement différente entre ces deux types de substances. Elle amène peut-être simplement à effectuer une distinction entre l'aversion et l'évitement.

Les cocaïnomanes décrivent typiquement deux conséquences hédoniques distinctes après une intoxication : une euphorie initiale importante suivie d'un état caractérisé par de l'anxiété, de l'agitation, de la dépression et un désir important pour la drogue (Ettenberg, 2004). Ses effets hédoniques positifs ont été modélisés chez l'animal grâce aux protocoles d'auto-administration et de préférence de lieu conditionnée. Il est possible que ses effets hédoniques négatifs se manifestent lors d'une CTA, lorsque pour sur base de mécanismes adaptatifs, un

état interne désagréable soit spontanément associé à un stimulus gustatif et engendre une réponse de nature protectrice, à savoir un évitement de la substance conditionnelle.

C'est ce que suggère l'idée de Huang & Hsiao. Ces auteurs proposent que les effets internes aversifs des drogues d'abus ou du LiCl soient principalement associés aux stimuli gustatifs alors que les effets internes positifs soient plutôt associés aux stimuli externes, ce qui expliquerait pourquoi une même dose est à la fois auto-administrée, recherchée (CPP) et induit une CTA.

Les premières études réalisées sur les aversions gustatives montrent en effet que lorsque des stimuli gustatifs et audiovisuels (une lumière et un son) sont présents simultanément lors d'une exposition au LiCl ou à un choc électrique, on observe une association importante entre le stimulus gustatif et le LiCl d'une part et entre les stimuli audiovisuels et le choc électrique d'autre part (Garcia & Koeling, 1966).

Si les effets aversifs des substances testées se manifestent par une CTA, alors nos résultats indiquent que chez le rongeur naïf, une dose élevée d'éthanol induit un effet aversif robuste. Dans cette perspective l'acétaldéhyde provoque une aversion moindre lorsqu'il est associé à la saccharine. Néanmoins, nous disposons encore trop peu d'informations pour clarifier son rôle dans les effets de son précurseur.

V. Bibliographie

Amit, Z., Brown, Z.W., & Rockman, G.E. (1977). Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration. *Drug and Alcohol Dependence*, 2, 495–500.

Anandatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K., Bhamre, S., Boyd, M.R., Song, B.J., & Ravindranath, V. (1993). Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Research*, 601, 279–85.

Aradottir, S., Moller, K., & Alling, C. (2004). Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol and Alcoholism*, 39(1), 8–13.

Aragon, C.M., Spivak, K., & Amit, Z. (1991a). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 39, 55–59.

Aragon, C.M., Stotland, L.M., & Amit, Z. (1991b). Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15, 165–169.

Aragon, C.M.G., & Amit, Z. (1993). Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 547–554.

Aragon, C.M.G., Abitbol, M., & Amit, Z. (1986). Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. *Neuropharmacology*, 25, 79–83.

Aragon, C.M.G., Spivak, K., & Amit, Z. (1991). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 39, 55–59.

Arias, C., Mlewski, E.C., Molina, J.C., & Spear, N.E., (2009). Ethanol induces locomotor-activating effects in preweanling Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 43, 13-23.

Arizzi, M.N., Correa, M., Betz, A.J., Wisniecki, A., & Salamone, J.D. (2003). Behavioral effects of intraventricular injections of low doses of ethanol, acetaldehyde, and acetate in rats: Studies with low and high rate operant schedules. *Behavioural Brain Research*, *147*, 203–210.

Arizzi-LaFrance, M.N., Correa, M., Aragon, C.M.G., & Salamone, J.D. (2006). Motor stimulant effect of ethanol injected into substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology*, *31*, 997–1008.

Baraona, E., Abittan, C. S., Dohmen, K., Moretti, M., Pozzato, G., Chayes, Z. W., Schaefer, C., & Lieber, C. S. (2001). Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *25*, 502-507.

Bear, M.F., Connors, B.W., & Paradiso, M.A. (2007). Neurosciences, à la découverte du cerveau. Eds pradel. Motivation, pp 540-541.

Beckemeier, M.E., & Bora, P.S. (1998). Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*, *30*(11), 2487–2494.

Berman, R.F., & Cannon, D.S. (1974). The effect of prior ethanol experience on ethanol-induced saccharin aversions. *Physiology and Behavior*, *12*, 1041–1044.

Broadbent, J., Muccino, K.J., & Cunningham, C.L. (2002). Ethanol-induced conditioned taste aversion in 15 inbred mouse strains. *Behavioral Neuroscience*, *116*, 138–148.

Brunetti, G., Carai, M.A., Lobina, C., Melis, S., Serra, S., Vacca, G., Gessa, G.L., & Colombo, G. (2002). Differences in ethanol-induced conditioned taste aversion in Sardinian alcohol-preferring and Sardinian alcohol-non-preferring rats. *Alcohol*, *26*, 167–172.

Camarini, R., & Hodge, C.W. (2004). Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *79*, 623– 632.

Closon, C., Didone, V., Tirelli, E., & Quertemont, E. (2009). Acetaldehyde and the hypothermic effects of ethanol in mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(11), 2005-2014.

Correa, M., Arizzi, M.N., Betz, A., Mingote, S., & Salamone, J.D. (2003). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Research Bulletin*, 63, 197-202.

Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C.M.G. (1999a). Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: The role of brain catalase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23, 799–805.

Correa, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C.M.G. (2001a). Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug and Alcohol Dependence*, 65, 9–15.

Correa, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C.M.G. (2001b). Brain catalase activity is highly correlated with ethanol-induced locomotor activity in mice. *Physiology and Behavior*, 73, 641–647.

Crabbe, J.C., Rigter, H., Uijlen, J., & Strijbos, C. (1979). Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208, 128–133.

Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, J.A., & Paylor, R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*, 132, 107–124.

Cunningham, C.L. (1981). Spatial aversion conditioning with ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 14, 263–264.

Cunningham, C.L. (1994). Modulation of ethanol reinforcement by conditioned hypothermia. *Psychopharmacology*, 115, 79–85.

Cunningham, C.L., & Niehus, D.R. (1989). Effect of ingestion-contingent hypothermia on ethanol self-administration. *Alcohol*, 6, 377–380.

Cunningham, C.L., Hawks, D.M., & Niehus, D.R. (1988). Role of hypothermia in ethanol-induced conditioned taste aversion. *Psychopharmacology*, 95, 318–322.

Davis, C.M., & Riley, A.L. (2010). Conditioned taste aversion learning Implications for animal models of drug abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences. Issue: Addiction Reviews 2*, 247-275.

Deng, X.S., & Deitrich, R.A. (2008). Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current Drug Abuse Reviews*, 1(1), 3–8.

Dudek, B.C., Abbott, M.E., & Phillips, T.J. (1984). Stimulant and depressant properties of sedative-hypnotics in mice selectively bred for differential sensitivity to ethanol. *Psychopharmacology*, 82, 46–51.

Duester, G., Farres, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Höög, J.O., Pares, X., Plapp, B.V., Yin, S.J., & Jörnvall, H. (1999). Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochemical Pharmacology*, 58, 389–395.

Edenberg, H.J. (2000). Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 64, 295–341.

Enrico, P., Sirca, D., Mereu, M., Peana, A.T., Lintas, A., Golosio, A., & Diana, M. (2009). Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. *Drug and Alcohol Dependence*, 100, 265–71.

Eriksson, C.J. (1977). Acetaldehyde metabolism in vivo during ethanol intoxication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 85, 319–341.

Eriksson, C.J. (1980). The aversive effect of acetaldehyde on alcohol drinking behavior in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 4, 107–111.

Escarabajal, D., DeWitte, P., & Quertemont, E. (2003). Role of acetaldehyde in ethanol-induced conditioned taste aversion in rats. *Psychopharmacology*, *167*, 130–136.

Escarabajal, M.D., & Aragon, C.M. (2002a). The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *72*, 389–395.

Escarabajal, M.D., & Aragon, C.M. (2002b). Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced locomotor activity: the role of brain ALDH. *Psychopharmacology*, *160*, 339–343.

Ettenberg, A. (2004). Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*, 721–728.

Ferrari, C. M., O'Connor, D.A & Riley, A.L.. (1991). Cocaine-induced taste aversions: effect of route of administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *38*, 267–271.

Flaherty, C. R., & Grigson, P. S. (1988). From contrast to reinforcement: Role of response contingency in anticipatory contrast. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *14*, 65-76.

Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., & Diana, M. (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*, *29*, 530–536.

Font, L., Aragon, C.M., & Miquel, M. (2006a). Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D-penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde. *Psychopharmacology*, *184*, 56–64.

Font, L., Aragon, C.M., & Miquel, M., (2006b). Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by D-penicillamine. *Behavioural Brain Research*, *171*, 78–86.

Font, L., Miquel, M., & Aragon, C.M. (2005). Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: a sequestration agent for acetaldehyde. *Alcoholism : Clinical and Experimental Research*, 29, 1156–1164.

Freud, G. (1973). Hypothermia after acute ethanol and benzyl alcohol administration. *Alcohol and Alcoholism*, 13, 345–349.

Frye, G.D., & Breese, G.R. (1981). An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology*, 75(4), 372-379.

Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoiding learning. *Psychonomic Science*, 4, 123–124.

Garcia, J., D.J. Kimeldorf & R.A. Koelling. 1955. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157–158.

Goedde, H.W., Agarwal, D.P., Fritze, G., Meier-Tackmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L.Z., Fang, B., & Lisker, R. (1992). Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Human Genetics*, 88, 344–346.

Grigson, P.S., & Twining, R.C. (2002). Cocaine-induced suppression of saccharin intake: a model of drug-induced devaluation of natural rewards. *Behavioral Neuroscience*, 116, 321–333.

Grigson, P.S., (1997). Conditioned taste aversion and drugs of abuse: a reinterpretation. *Behavioral Neuroscience*, 111, 129–136.

Handler, J.A., & Thurman, R.G. (1985). Fatty acid-dependent ethanol metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133, 44–51.

Harada, S., Agarwal, D.P., Goedde, H.W., Tagaki, S., & Ishikawa., B. (1982). Possible protective role against alcoholism for aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency in Japan. *The Lancet*, 2, 827.

Höög, J.O., & Brandt, M. (1995). Mammalian class VI alcohol dehydrogenase: Novel types of the rodent enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 372, 355–364.

Höög, J.O., Hedberg, J.J., Stromberg, P., & Svensson, S. (2001). Mammalian alcohol dehydrogenase – functional and structural implications. *British Journal of Biomedical Science*, 8, 71-76.

Horger, B.A., Shelton, K., & Schenk, S. (1990). Preexposure sensitizes rats to the rewarding effects of cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37, 707–711.

Horowitz, G.P., & Whitney, G. (1975). Alcohol-induced conditioned aversion: genotype specificity in mice (*Mus musculus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89, 340–346.

Hu, W.S., & Pathak, V.K. (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacological Reviews*, 52, 493–511.

Hu, Y., Oscarson, M., Johansson, I., Yue, Q.Y., Dahl, M.L., Tabone, M., Arinco, S., Albano, E & Ingelman-Sundberg, M. (1997). Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Molecular Pharmacology*, 51, 370–376.

Isse, T., Oyama, T., Kitagawa, K., Matsuno, K., Matsumoto, A., Yoshida, A., Nakayama, K., & Kawamoto, T. (2002). Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity. *Pharmacogenetics*, 12, 621–626.

Jamal, M., Ameno, K., Kumihashi, M., Ameno, S., Kubota, T., Wang, W., & Ijiri, I. (2003). Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 798, 155–158.

Jamal, M., Ameno, K., Uekita, I., Kumihashi, M., Wang, W., & Ijiri, I. (2007). Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats. *Neurotoxicology*, 28, 1245–1248.

Jensen, J.C., & Faiman, M.D. (1986). Disulfiram-ethanol reaction in the rat. 1. Blood alcohol, acetaldehyde, and liver aldehyde dehydrogenase relationships. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 10, 45–49.

Jörnvall, H., Shafqat, J., El-Ahmad, M., Hjelmqvist, L., Persson, B., & Danielsson, O. (1997). Alcohol dehydrogenase variability. Evolutionary and functional conclusions from characterization of further variants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 414, 281–289.

Karahanian, E., Quintanilla, M.E., Tampier, L., Rivera-Meza, M., Bustamante, D., Gonzalez-Lira, V., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2011). Ethanol as a Prodrug: Brain Metabolism of Ethanol Mediates its Reinforcing Effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(4), 606-612.

Koivisto, T., & Eriksson, C.J. (1994). Hepatic aldehyde and alcohol dehydrogenase in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Biochemical Pharmacology*, 48, 1551–1558.

Kunitoh, S., Asai, H., Imaoka, S., Funae, Y., & Monna, T. (1996). Metabolism of acetaldehyde to acetate by rat hepatic P-450s: presence of different metabolic pathway from acetaldehyde dehydrogenase system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(1), 22-24.

Lands, W.E.M. (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 15, 147-160.

Lee, S.L., Wang, M.F., Lee, A.I., & Yin, S.J. (2003). The metabolic role of human ADH3 functioning as ethanol dehydrogenase. *FEBS Letters*, *544*, 143–147.

Lieber, C.S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *International Journal of Clinical Chemistry*, *257*(1), 59-84.

Lieber, C.S. (1999). Microsomal ethanol-oxidizing system: the first 30 years (1968–1998)-a review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *23*, 991–1007.

Lieber, C.S., & DeCarli, L.M. (1968). Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, *162*, 917–918.

Lomax, P., & Lee, R.J. (1982). Cold acclimatation and resistance to ethanol-induced hypothermia. *European Journal of Pharmacology*, *84*, 87–91.

Lynch, W.J. (2008). Acquisition and maintenance of cocaine self-administration in adolescent rats: effects of sex and gonadal hormones. *Psychopharmacology*, *197*, 237–246.

Malcolm, R.D., & Alkana, R.L. (1981). Temperature dependence of ethanol depression in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *217*, 770–775.

Martí-Prats, L., Sánchez-Catalán, M.J., Hipólito, L., Orrico, A., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. (2010). Systemic administration of d-penicillamine prevents the locomotor activation after intra-VTA ethanol administration in rats. *Neurosciences letters*, *483*, 143-147.

Mayer, L.A. & L.A.Parker. (1993) .Rewarding and aversive properties of IP and SC cocaine: assessment by place and taste conditioning. *Psychopharmacology*, *112*, 189–194.

Melis, M., Enrico, P., Peana, A.T., & Diana, M. (2007). Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *European Journal of Neurosciences*, *26*(10), 2824–2833.

Meyer, J.S., & Quenzer, L.F. (2005). *Psychopharmacology : Drugs, the brain and behavior*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Myers, W.D., Gibson, S., Ng, K.T., & Singer, G. (1987). Sex differences in acetaldehyde on body temperature and open-field performance in the rat. *Drug and Alcohol Dependence, 19*, 1-6.

Nagasawa, H.T., Goon, D.J., DeMaster, E.G., & Alexander, C.S. (1977). Lowering of ethanol-derived circulating blood acetaldehyde in rats by D-penicillamine. *Life Sciences, 20*, 187–193.

Nagasawa, H.T., Elberling, J.A., & DeMaster, E.G. (1980). Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde. *Journal of Medicinal Chemistry, 23*(2), 140–143.

Nagasawa, H.T., Elberling, J.A., & Roberts, J. (1987). Substituted cysteines as sequestering agents for ethanol-derived acetaldehyde in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry, 30*, 1373–1378.

Nagasawa, H.T., Goon, D.J., & DeMaster, E.G. (1978). 2,5,5-Trimethylthiazolidine- 4-carboxylic acid, a D(-)-penicillamine-directed pseudometabolite of ethanol. Detoxication mechanism for acetaldehyde. *Journal of Medicinal Chemistry, 21*, 1274–1279.

Nizhnikov, M.E., Molina, J.C., & Spear, N.E. (2007). Central reinforcing effects of ethanol are blocked by catalase inhibition. *Alcohol, 41*, 525-534.

Oshino, N., Oshino, R., & Chance, B. (1973). The characteristics of the peroxidatic reaction in ethanol oxidation. *Biochemical Journal, 131*, 555–567.

Peana, A.T., Enrico, P., Assaretti, A.R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M., Piga, A., Lintas, A., & Diana, M. (2008). Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in the rat. *Alcoholism : Clinical and Experimental Research, 32*, 249–258.

Petersen, D.R., Atkinson, N., & Hjelle, J.J. (1982). Increase in hepatic microsomal oxidation by a single dose of ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 221, 275-281.

Phillips, T.J., & Shen, E.H., (1996). Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *International Review of Neurobiology*, 39, 243–282.

Quertemont, E. (2004). Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Molecular psychiatry*, 9, 570-581.

Quertemont, E., & De Witte, P. (2001). Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 68, 449–454.

Quertemont, E., & Didone, V. (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Research and Health*, 29(4), 258-265.

Quertemont, E., & Tambour, S. (2004). Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 130–134.

Quertemont, E., Eriksson, P., Zimatkin, S.M., Pronko, P.S., Diana, M., Pisano, M., Rodd, Z.A., Bell, R.R., & Ward, R.J. (2005a). Is Ethanol a Pro-Drug? Acetaldehyde Contribution to Brain Ethanol Effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(8), 1514-1521.

Quertemont, E., Tambour, S., & Tirelli, E. (2005b). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Progress in Neurobiology*, 75, 247-274.

Quertemont, E., Tambour, S., Bernaerts, P., Zitmakin, S.M., & Tirelli, E. (2004). Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology*, 177, 84–92.

Quintanilla, M.E., & Tampier, L. (2003). Acetaldehyde-reinforcing effects: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol*, *31*, 63–69.

Quintanilla, M.E., Callejas, O., & Tampier, L. (2002). Aversion to acetaldehyde: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol*, *26*, 69–74.

Quoilin, C., Didone, V., Tirelli, E., & Quertemont, E. (2010). Ontogeny of the stimulant and sedative effects of ethanol in male and female Swiss mice: gradual changes from weaning to adulthood. *Psychopharmacology*, *212*, 501-512.

Reid, L.D., Hunter, G.A., Beaman, C.M., & Hubbel, C.L. (1985). Toward understanding ethanol's capacity to be reinforcing : a conditioned place preference following injections of ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *22*, 483-487.

Risinger, F.O., & Boyce, J.M. (2002). Conditioning tastant and the acquisition of conditioned taste avoidance to drugs of abuse in DBA/2J mice. *Psychopharmacology*, *160*, 225–232.

Risinger, F. O., & Cunningham, C. L. (1995). Genetic differences in ethanol-induced conditioned taste aversion after ethanol preexposure. *Alcohol*, *12*, 535–539.

Ritzmann, R.F., & Tabakoff, B. (1976). Ethanol, serotonin metabolism, and body temperature. *Annals of the New York Academy Sciences*, *273*, 245–255.

Roberts, B.J., Shoaf, S.E., Jeong, K.S., & Song, B.J. (1994). Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *205*, 1064-1071.

Rodd, Z.A., Bell, R.L., Zhang, Y., Murphy, J.M., Goldstein, A., Zaffaroni, A., Li, T.K., & McBride, W.J. (2005). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology*, *30*, 330–338.

Rodd-Henricks, Z.A., Melendez, R.I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W.J., & Li, T.K. (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol preferring rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 72, 55–64.

Schramm-Sapyta, N.L., Morris, R.W., & Kuhn, C.M.. (2006). Adolescent rats are protected from the conditioned aversive properties of cocaine and lithium chloride. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84, 344–352.

Stacy, A.W., Newcomb, M.D., & Bentler, P.M. (1991). Cognitive motivation and problem drug use: a 9-year longitudinal study. *Journal of Abnormal Psychology*, 100(4), 502-515.

Serrano, E., Pozo, O.J., Beltran, J., Hernandez, F., Font, L., Miquel, M., & Aragon, C.M. (2007). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S, 2RS)-2,5,5 trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between d(-)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain rat tissues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(7), 1221–1229.

Sinclair, J.D., & Lindros, K.O. (1981). Suppression of alcohol drinking with brain aldehyde dehydrogenase inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 14, 377–383.

Smith, B.R., Amit, Z., & Splawinsky, J. (1984). Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol*, 1, 193– 195.

Tambour, S., Brown, L.L., & Crabbe, J.C. (2008). Gender and age at drinking onset affect voluntary alcohol consumption but neither the alcohol deprivation effect nor the response to stress in mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 2100–2106.

Tambour, S., Closon, C., Tirelli, E., & Quertemont, E. (2007). Effects of cyanamide and acetaldehyde accumulation on the locomotor stimulant and sedative effects of ethanol in mice. *Behavioural Pharmacology*, 18, 777–784.

Tambour, S., Didone, V., Tirelli, E., & Quertemont, E. (2006). Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, *172*, 145-154.

Tampier, L., & Quintanilla, M.E., (2002). Effects of acetaldehyde on acute tolerance and ethanol consumption in drinker and non drinker rats. *Journal of Studies on Alcohol and drugs*, *63*, 257–262.

Tampier, L., & Quintanilla, M.E. (1991). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the hypothermic effect of ethanol consumption in drinker and non drinker rats. *Alcohol*, *8*, 279–282.

Vasiliou, V., Pappa, A., & Estey, T. (2004). Polymorphisms of human aldehyde deshydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drugs metabolism reviews*, *36*(2), 279-299.

Vasiliou, V., & Pappa, A. (2000). Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenase. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology*, *61*, 192–198.

Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K.F., & Nebert, D.W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, *9*, 421–434.

Vasiliou, V., Zeigler, T., Bludeau, P., Petersen, D., Gonzalez, F., & Deitrich, R. (2006). CYP2E1 and catalase influence ethanol sensitivity in the central nervous system. *Pharmacogenetics and Genomics*, *16*, 51–58.

Waller, M.B., Murphy, J.M., McBride, W.J., Lumeng, L., & Li, T.K. (1986). Effect of low dose ethanol on spontaneous motor activity in alcohol-prefering and non-prefering lines of rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *24*(3), 617-623.

Webb, B., Burnett, P.W., & Walker, D.W. (2002). Sex differences in ethanol-induced hypnosis and hypothermia in young Long–Evans rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *26*, 695–704.

Wurst, F.M., Skipper, G.E., & Weinmann, W. (2003). Ethyl glucuronide—the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction*, 98 (Suppl. 2), 51–61.

Yadav, S., Dhawan, A., Singh, R.L., Seth, P.K., & Parmar, D. (2006). Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 286, 171–80.

Yin, S.J. (1994). Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol and Alcoholism*, 29 (Suppl 2), 113–119.

Yin, S.J., Chou, C.F., Lai, C.L., Lee, S.L., & Han, C.L. (2003). Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chemistry and Biology Interactions*, 143–144, 219–227.

Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L.C., & Chang, C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry*, 251, 549–557.

Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research and Health* 29, 245–254.

Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., Satanoversuskaya, V.I., Bardina, L.R., & Deitrich, R.A. (2001a). Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol. II. Studies in selectively bred rats and mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, 982–988.

Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., Slychenkov, V.S., & Deitrich, R.A. (2001b). Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol. I. Studies in outbred animals. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, 976–981

Zimatkin, S.M. (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *Journal of Neurochemistry*, 56, 1–11.

Zimatkin, S.M., & Deitrich, R.A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*, 2, 387–392.

Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., & Deitrich, R.A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 1623–1627.

Zimatkin, S.M., Pronko, S.P., Vasiliou, V., Gonzalez, F.J., & Deitrich, R.A. (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30, 1500–5.

