



HAL
open science

Implications fonctionnelles de la tVTA dans le contrôle des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques

Romain Bourdy

► **To cite this version:**

Romain Bourdy. Implications fonctionnelles de la tVTA dans le contrôle des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ021 . tel-01356693

HAL Id: tel-01356693

<https://theses.hal.science/tel-01356693>

Submitted on 26 Aug 2016

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE présentée par :

Romain Bourdy

soutenue le : 28 mai 2015

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

Spécialité : Neurosciences

Implications fonctionnelles de la tVTA dans le contrôle des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques

THÈSE dirigée par :

Mr. BARROT Michel

DR1, CNRS

RAPPORTEURS :

Mr. DE DEURWAERDÈRE Philippe

Professeur, Université de Bordeaux

Mr. NIEOULLON André

Professeur, Université d'Aix-Marseille

EXAMINATEUR :

Mme. GAVÉRIAUX-RUFF Claire

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

J'aimerais dans un premier temps remercier les membres du jury : les professeurs Gavériaux-Ruff, De Deurwaerdère et Nieoullon pour l'évaluation de mon travail de thèse.

Merci aux membres de l'équipe grâce auxquels j'ai passé de très bon moments aussi bien sur le plan scientifique que personnel : un grand merci à Michel Barrot pour tous ses conseils et sa disponibilité malgré un emploi du temps chargé. Merci à Marie-José Freund-Mercier, Pierre Veinante, Ipek Yalcin, Dominique Massotte, Jennifer Kaufling, Florent, Salim, Maria-José, Alice, Clémentine, Mélanie, Eric, Betty et Dorothee pour tous les coups de main.

Je remercie également tous les chercheurs rencontrés dans le cadre de collaborations ou régulièrement dans les couloirs de l'institut pour leur aide et leur bienveillance : François Georges, Marion Jalabert, Susan Sesack, Philippe Isope, Etienne Chalet, Rémy Schlichter, Mathilde Cordero-Erausquin, Sylvain Hugel, Pascal Darbon, Jean-Luc Rodeau, Jean-Luc Dupons et les autres.

Merci au support technique et administratif : Denis, Christophe, Stéphane, Edouard, Géraldine Scherver et Fabienne Rakitik de la mission handicap de l'université de Strasbourg qui m'a permis de terminer ma thèse à domicile dans les meilleures conditions.

Merci à tous mes amis et collègues de la promo qui m'ont soutenu y compris en dehors du labo dans les moments difficiles : Laetitia, Joseph, Antoine, Vivien, Mickael, Alex, Fred, Paul, Bruce, Popo, Anaïs et tous les autres.

Merci à mes amis de longue date : Gaëtan, Baramey et Emeline.

Et enfin, merci à ma famille et à mes parents qui m'ont toujours soutenu et sans qui cette thèse n'aurait pas pu être terminée.

Publications et communications

Publications liées aux travaux de thèse

Bourdy R*, Sánchez-Catalán MJ*, Kaufling J, Balcita-Pedicino JJ, Freund-Mercier MJ, Veinante P, Sesack SR, Georges F, Barrot M (2014) Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area, *Neuropsychopharmacology* 12: 2788-98. (*co-premier auteur)

Bourdy R, Barrot M (2012) A new control center for dopamine systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci* 11: 681-90.

Jalabert M*, **Bourdy R***, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M, Georges F (2011) Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16446-50. (*co-premier auteur)

Kaufling J, Waltisperger E, **Bourdy R**, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161:1677-91.

Communications affichées

Bourdy R, Kaufling J, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Georges F, Barrot M (2012) Evidence for a role of the tVTA in the control of nigrostriatal function. Meeting annuel Neurex, Strasbourg, France.

Bourdy R, Kaufling J, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Georges F, Barrot M (2012) Evidence for a role of the tVTA in the control of nigrostriatal function. Société américaine des neurosciences, congrès annuel, Nouvelle-Orléans, Etats-Unis.

Bourdy R, Jalabert M, Kaufling J, Veinante P, Georges F, Barrot M (2011) Electrophysiological evidences for midbrain cells control by the GABAergic tail of the ventral tegmental area. Société américaine des neurosciences, congrès annuel, Washington D.C., Etats-Unis.

Bourdy R, Kaufling J, Waltisperger E, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. Meeting annuel Neurex, Bâle, Suisse.

Financements de thèse :

Bourse de fin de thèse de la **Fondation pour la recherche médicale** (FRM) couvrant la période du 01/11/2012 au 30/04/2013.

Bourse de voyage **Tebu-bio** 2011.

Contrat doctoral (concours Ecole Doctorale Vie & Santé, Université de Strasbourg) couvrant la période du 01/10/2009 au 30/09/2012.

Abréviations

6-OHDA	6 hydroxydopamine
AAVs	virus adéno associés
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
amphet	D-amphétamine
AP5	acide (2R)-amino-5-phosphonovaleric
ATP	adénosine triphosphate
BDA	dextran amine biotinylé
cdk5	kinase dépendante de la cycline 5
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CRE	élément de réponse à l'AMPc
CREB	protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CTb	fragment β de la toxine cholérique
DAMGO	([D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enképhaline)
DAT	transporteur de la dopamine
DSM-5	manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux 5
GABA	acide gamma amino-butyrique
GHB	acide gammahydroxybutyrique
GPe	segment externe du globus pallidus
GPI	segment interne du globus pallidus
IPSCs	courants postsynaptiques inhibiteurs
L-DOPA	lévodopa
LHb	habénula latérale
MAOB	monoamine oxydase de type B
MDMA	(+/-)-3,4-méthylènedioxyméthamphétamine
MPP+	ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSNs	neurones épineux moyens
NAc	noyau accumbens
NF-κB	"nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
NMDA	N-Méthyl-D-aspartate

PCP	phencyclidine
PPN	noyau tegmental pédonculopontin
SC	collicules supérieurs
SNC	substance noire compacte
SNr	substance noire réticulée
ST	noyau subthalamique
thal	thalamus
THC	Δ^9 -tétrahydrocannabinol
tVTA	queue de l'aire tegmentale ventrale
VP	pallidum ventral
VTA	aire tegmentale ventrale

Table des matières

Introduction	1
A- Historique du projet de thèse	3
B- Contexte bibliographique : La tVTA, entre l'habénula latérale et les systèmes dopaminergiques mésencéphaliques	5
1- Interactions de la tVTA avec les systèmes dopaminergiques	5
a- Le système mésolimbique	5
b- Le système nigrostrié	6
c- Interactions fonctionnelles entre la tVTA et les systèmes dopaminergiques	7
2- interactions de la tVTA avec l'habénula latérale	8
a- L'habénula latérale	8
a1- Anatomie de l'habénula latérale	8
a2- Fonctions générales de l'habénula latérale	9
b- Interactions fonctionnelles entre l'habénula latérale, la tVTA et la VTA	10
C- Revue de la littérature concernant la tVTA :	
A new control center for dopamine systems: pulling the VTA by the tail	10
1- Contexte de l'écriture de la revue	10
2- A new control center for dopamine systems: pulling the VTA by the tail	11
D- Objectifs de la thèse	23
Chapitre 1 : Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure	25
A- Contexte : Les protéines Fos	27
1- Structure des protéines Fos/interaction avec l'ADN	27
2- Induction de l'expression des protéines Fos	29
3- Mécanismes épigénétiques dans la régulation et l'action des protéines Fos	30
4- Gènes cibles des protéines Fos	31
5- Fonctions des protéines Fos	32
6- Stimuli responsables de l'induction de protéines de la famille Fos dans la tVTA	35
B- Objectifs	36
C- Méthodes	36
D- Résultats	37
E- Contribution	37
F- Article : Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure	38

G- Discussion	59
1- Relations entre psychostimulants et induction des protéines Fos dans la tVTA	59
2- Signification physiologique de l'induction des protéines Fos dans la tVTA	60
3- Couplage entre activité électrophysiologique et induction des protéines Fos : exemple de la tVTA	62

Chapitre 2 : Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons **65**

A- Contexte : Influence des opioïdes sur les neurones de la VTA	67
1- Conséquences physiologiques	67
a- Effets des opioïdes sur l'activité des neurones de la VTA	67
b- conséquences sur le système mésolimbique	68
2- Effets comportementaux des opioïdes : rôle des récepteurs mu et GABA _A de la VTA	68
B- Objectifs	69
C- Méthodes	69
D- Résultats	70
E- Contribution	70
F- Article : Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons	71
G- Discussion : Substrats neuroanatomiques clés pour l'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA	73
1- Structures locales	85
a- Neurones GABAergiques de la tVTA	85
b- Interneurones GABAergiques de la VTA	85
c- Neurones de la VTA	87
2- Structures externes	88
a- Le noyau accumbens	88
b- Le pallidum ventral	88

Chapitre 3 : Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area **91**

A- Contexte bibliographique : les ganglions de la base	93
1- Anatomie des ganglions de la base	93
a- Généralités.	93
b- Composantes des ganglions de la base et connectivité	95
b1- Le cortex cérébral	95
b2- Le striatum	95
b3- Le globus pallidus	96
b4- Le noyau subthalamique	97
b5- La substance noire	97

2- La dopamine et les ganglions de la base	99
a- Innervation dopaminergique des ganglions de la base	99
b- Rôle moteur de la dopamine dans les ganglions de la base	99
b1- Exemple de la maladie de Parkinson	99
b2- Modélisation de la maladie de Parkinson	100
b3- conséquences motrices de lésions dopaminergiques unilatérales chez le rongeur	103
b4- Rôle de la dopamine dans l'apprentissage moteur.	105
B- Objectifs	106
C- Méthodes	106
D- Résultats	106
E- Contribution	107
F- Article : Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area	108
G- Discussion : Rôle de la tVTA dans la motricité	123
1- Rôle de la tVTA dans le comportement de rotation	123
2- Rôle de la tVTA dans les performances motrices et l'apprentissage moteur	123
Discussion.	127
A- Données récentes concernant la tVTA	129
1- Données neuroanatomiques	129
2- Données fonctionnelles	130
a- Implications comportementales de la tVTA dans la réponse aux opioïdes	130
b- Implications comportementales de la tVTA dans la réponse aux autres drogues	131
B- Points de discussion générale	133
1- La tVTA entre récompense et aversion : implications potentielles dans l'addiction	133
2- Influence potentielle du contrôle simultané de la VTA et de la SNc par la tVTA sur les comportements associés à la récompense	135
3- Bénéfices et coût de lésions ou d'inhibitions de la tVTA	136
C- Perspectives	138
Bibliographie	141

Introduction

A- Historique du projet de thèse

J'ai commencé à travailler sur la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA) en 2009 lors de mon stage de Master 2 dans l'équipe alors dirigée par le professeur Freund-Mercier. Lors d'un entretien avec le docteur Michel Barrot pour déterminer mon sujet de stage, j'ai eu la chance de pouvoir choisir entre l'étude des mécanismes de la douleur neuropathique et celle d'une structure récemment mise en évidence et dont j'avais entendu parler lors d'un stage d'été réalisé au sein du laboratoire avec son étudiante en thèse Jennifer Kaufling : la tVTA. Cette région cérébrale est connue pour projeter sur les systèmes dopaminergiques et être recrutée d'un point de vue moléculaire par la cocaïne (Perrotti et al., 2005). La tVTA était encore au stade de la caractérisation neuroanatomique et ses fonctions n'étaient pas encore connues. Etant attiré par les systèmes dopaminergiques et devant l'étendue des possibilités offertes par une structure cérébrale à un stade aussi précoce des connaissances, j'ai choisi le sujet sur les implications fonctionnelles de la tVTA et commencé à travailler sur le rôle de la tVTA dans le contrôle du système dopaminergique nigrostrié.

La caractérisation anatomo-fonctionnelle de la tVTA prend place dans un contexte d'étude de structures cérébrales émergentes ou ré-émergentes (McGinty et al., 2011) et de redéfinition des contours de régions cérébrales en sous-régions, nécessaire pour affiner les connaissances en neuroanatomie fonctionnelle. Lorsque j'ai débuté ma thèse au laboratoire en 2010, la bibliographie sur la tVTA était encore rare. Cependant, nous disposions de quelques informations concernant la neuroanatomie et certaines fonctions de la tVTA. Il existait des données bibliographiques antérieures sur la région, avant qu'elle n'ait une nomenclature propre. La région de la tVTA était potentiellement une efférence majeure de l'habénula latérale (LHb). En effet, l'injection d'acides aminés tritiés utilisés comme traceur antérograde dans la LHb conduit à un marquage dense de fibres dans une région correspondant à la tVTA (Herkenham and Nauta, 1979). Cette partie du cerveau correspondait à une population de neurones GABAergiques (Olson and Nestler, 2007) et projetait sur les neurones de la VTA plus antérieure de façon massive (Geisler et al., 2008), mais également sur les neurones de la substance noire compacte (SNc) (Ferreira et al., 2008). La tVTA était recrutée d'un point de vue moléculaire via une induction des protéines Fos par certains psychostimulants addictifs comme la cocaïne (Perrotti et al., 2005) et potentiellement la nicotine (Pang et al., 1993) et non addictifs comme le modafinil (Scammell et al., 2000). Une autre équipe s'intéressait à la tVTA dans un autre contexte, celui d'un rôle de cette structure GABAergique dans le traitement de l'information relative aux stimuli aversifs, notamment dans les mécanismes de "freezing" via ses projections sur les neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Jhou, 2005).

La caractérisation d'une structure cérébrale débute souvent par la détermination de ses limites neuroanatomiques et de sa connectivité. Au laboratoire, l'équipe avait récemment publié dans *Journal of Comparative Neurology* un article de neuroanatomie décrivant la connectivité détaillée de la tVTA ainsi que ses limites visualisées par l'induction

du facteur de transcription FosB (Kaufling et al., 2009). Dans le même numéro du journal, le groupe s'intéressant à la tVTA dans le contexte du traitement de l'information aversive publiait un autre article sur sa connectivité avec des résultats similaires (Jhou et al., 2009b). Dans les atlas stéréotaxiques, la tVTA n'est pas différenciée de la VTA (Paxinos and Watson, 1998), d'où la nécessité de lui trouver un nom. Chacun des deux groupes a alors attribué à cette région la nomenclature qui lui semblait la plus adaptée. Notre équipe a nommé la région "queue GABAergique de la VTA (Perrotti et al., 2005; Kaufling et al., 2009) en rapport avec sa localisation anatomique, juste en arrière de la VTA. De plus, les afférences de cette région étaient communes à celles de la VTA et ses efférences ciblaient les groupes dopaminergiques mésencéphaliques. L'autre groupe a nommé la même région cérébrale "RMTg" pour noyau tegmental rostromédian (Jhou et al., 2009b), en fonction de la localisation anatomique des deux tiers postérieurs de la structure. La nomenclature attribuée est par conséquent plus proche de celle des noyaux de la formation réticulée pontique. Aujourd'hui la région est connue comme la tVTA ou le RMTg, deux nomenclatures différentes pour la même structure, chacune correspondant à une signification neuroanatomique représentative de sa localisation.

Suite à la caractérisation anatomique de la structure, l'équipe s'est ensuite orientée vers l'étude du rôle de la tVTA dans la réponse aux drogues et dans le contrôle des systèmes dopaminergiques. Des expériences de double traçage réalisées au sein du laboratoire avaient démontré que les neurones GABAergiques de la tVTA exprimant les protéines Fos en réponse à la cocaïne projetaient sur les neurones de la VTA appartenant au système mésolimbique (Kaufling et al., 2010a). Nous avons démontré que divers psychostimulants entraînaient une induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA et que cette induction était liée à la dopamine (Kaufling et al., 2010b). Les neurones GABAergiques de la tVTA impliqués dans la réponse aux psychostimulants contactaient le système mésolimbique et pouvaient par conséquent l'influencer. En parallèle, Jennifer Kaufling avait réalisé des expériences préliminaires d'électrophysiologie *in vivo* dans le cadre de sa thèse montrant une inhibition puissante des neurones dopaminergiques de la VTA en réponse à une stimulation de la tVTA, ce qui confirmait fonctionnellement les données de neuroanatomie. Le premier article sur les implications fonctionnelles de la tVTA concernait son rôle dans le traitement de l'information relative à l'aversion (Jhou et al., 2009a). Cet article a apporté des informations nouvelles concernant l'anatomie, l'électrophysiologie et le rôle comportemental de la tVTA. Il confirmait les projections de la tVTA sur les neurones de la SNc, démontrait un recrutement moléculaire de la tVTA en réponse à des chocs électriques aux pattes ou à des stimuli prédisant ces chocs. D'un point de vue comportemental, la suppression bilatérale de la tVTA était responsable d'une diminution du comportement de "freezing" dans un test de peur conditionnée (Jhou et al., 2009a). Les auteurs ont conclu que la tVTA jouait un rôle dans les comportements aversifs passifs en réponse aux stimuli aversifs. Selon les auteurs, cette inhibition motrice dépendrait des projections de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la SNc.

Dans ce contexte et dans la continuité des travaux réalisés au sein de l'équipe, mon projet de thèse a été d'étudier les implications fonctionnelles de la tVTA via ses projections sur les systèmes dopaminergiques mésolimbique et nigrostrié. Dans un premier temps, nous

avons identifié quels types de drogues pouvaient activer la tVTA en induisant le facteur de transcription FosB/ Δ FosB. Dans un deuxième temps, l'étude de l'influence de la tVTA sur le système mésolimbique nous a permis de mettre en évidence le rôle clé de cette structure dans la réponse aiguë à la morphine. Enfin, l'étude de son influence sur le système nigrostrié nous a permis de mettre en évidence le rôle de la tVTA dans le contrôle électrophysiologique des neurones dopaminergiques de la SNc, dans la motricité et dans l'apprentissage moteur.

B- Contexte bibliographique : La tVTA, entre l'habénula latérale et les systèmes dopaminergiques mésencéphaliques

D'après les données accumulées sur la tVTA, il existe un lien intime entre cette région cérébrale, la LHb qui constitue son entrée majeure et les systèmes dopaminergiques mésencéphaliques mésolimbique et nigrostrié, qui constituent ses sorties principales. Pour mieux comprendre ses fonctions potentielles, il est nécessaire dans un premier temps de s'intéresser à l'organisation et aux fonctions de ces structures/systèmes.

1- Interactions de la tVTA avec les systèmes dopaminergiques

Dahlström et Fuxe ont divisé le système dopaminergique mésencéphalique du rat en trois groupes cellulaires sur la base de leur localisation régionale et de leurs projections sur le télencéphale : les groupes A8, A9 et A10 (Dahlström and Fuxe, 1964). Le groupe A8 correspond à l'aire rétrobulbaire, le groupe A9 à la SNc et le groupe A10 à la VTA (Björklund and Dunnett, 2007). La VTA et la SNc sont à l'origine, respectivement, des systèmes mésolimbique et nigrostrié et sont impliquées dans des fonctions motivationnelles et motrices.

a- Le système mésolimbique

La VTA a été définie pour la première fois par Tsai en 1925 (Sanchez-Catalan et al., 2014). Il s'agit d'un groupe hétérogène de cellules occupant la partie ventromédiane de la formation réticulée mésencéphalique (Swanson, 1982). D'un point de vue neuroanatomique, la VTA est antérieure au pont de Varole, postérieure à l'hypothalamus latéral, médiale à la substance noire, ventrale au noyau rouge et dorsale au noyau interpedonculaire (Swanson, 1982). Cette structure est impliquée dans de nombreuses fonctions comme le contrôle des comportements motivés, les récompenses naturelles et

associées à la drogue, l'apprentissage associé à la récompense... D'un point de vue neurochimique, la VTA contient au moins trois types neuronaux : des neurones dopaminergiques hétérogènes d'un point de vue fonctionnel (Bromberg-Martin et al., 2010), des neurones GABAergiques à projections longues et des neurones glutamatergiques plus récemment mis en évidence (Hnasko et al., 2012; Morales and Root, 2014). La répartition de ces neurones est hétérogène le long de l'axe antéropostérieur (Sanchez-Catalan et al., 2014). Par exemple, les neurones dopaminergiques sont localisés principalement dans le tiers moyen de la VTA et la proportion la plus importante de neurones GABAergiques se trouve dans les tiers antérieur et postérieur (Olson and Nestler, 2007; Sanchez-Catalan et al., 2014).

Les neurones dopaminergiques de la VTA correspondent au groupe A10 de Dahlström et Fuxe, dont les projections vers le striatum ventral, principalement le NAc, et dans une moindre mesure vers le septum, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal constituent les systèmes mésolimbique et mésocortical. Les projections de la VTA vers le striatum ventral présentent une organisation topographique médiolatérale (Björklund and Dunnett, 2007). En 1954, Olds et Milner ont montré que les sites efficaces pour l'auto-stimulation intracrânienne comprenaient ce qui a été découvert plus tard comme étant la voie efférente majeure du système dopaminergique mésocorticolimbique, le faisceau médian du télencéphale (Olds and Milner, 1954). Bien qu'il existe de nos jours de nombreuses théories sur le rôle de la libération de la dopamine dans ses structures effectrices, le système mésolimbique semble jouer un rôle crucial dans la motivation, le renforcement positif et dans les erreurs de prédiction de la récompense et l'apprentissage associé à la récompense (Wise, 2004; Bromberg-Martin et al., 2010) et a été au centre de nombreuses études sur la dépendance aux drogues. En effet, l'influence des récompenses naturelles sur le comportement dépend notamment de leur capacité à augmenter les taux de dopamine dans le NAc (Hyman et al., 2006). Ce système est "piraté" par les drogues addictives responsables d'une augmentation forcée des taux de dopamine dans le NAc, participant au phénomène d'addiction.

b- Le système nigrostrié

La substance noire est un noyau mésencéphalique regroupant la substance noire SNC, la substance noire réticulée (SNr) et la substance noire latérale. La SNC est un feuillet horizontal dense en neurone dopaminergiques de taille moyenne. La SNr, moins dense en neurones que la SNC, est majoritairement constituée de neurones GABAergiques de petite et de moyenne taille. Elle est située ventralement par rapport à la SNC. La substance noire latérale est un petit groupe de neurones GABAergiques et dopaminergiques de taille moyenne, situé rostrocaudalement le long du bord latéral de la SNC et de la SNr (González-Hernández and Rodríguez, 2000). Les neurones dopaminergiques de la SNC peuvent être divisés en un tiers dorsal et un tiers ventral correspondant à leur localisation au sein de la structure et à leurs projections sur les compartiments de type striosome et matrice du striatum (voir chapitre 3, introduction).

Les neurones dopaminergiques de la SNc correspondent au groupe A9 de Dahlström et Fuxe dont les projections vers le striatum dorsal (noyau caudé et putamen) constituent le système nigrostrié. Les projections nigrostriées présentent une organisation topographique médiolatérale selon laquelle la SNc latérale projette au striatum dorsolatéral moteur et la SNc médiane projette au striatum dorsomédian associatif. Les projections vers le striatum dorsal sont également organisées suivant une organisation topographique dorsoventrale inversée, avec des projections des neurones dorsaux vers le striatum ventral et des neurones les plus ventraux vers le striatum dorsal. La libération de dopamine par les terminaisons des neurones dopaminergiques de la SNc module les entrées au striatum dorsal, notamment celles provenant du cortex cérébral (Reynolds and Wickens, 2002) (chapitre 3, introduction). L'innervation dopaminergique du striatum semble jouer un rôle central dans des fonctions motrices, cognitives et émotionnelles variées, correspondant aux subdivisions fonctionnelles du striatum (Joel and Weiner, 2000). Cette diversité fonctionnelle est reflétée par les conséquences motrices et cognitives d'une dégénérescence du système nigrostrié chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Sulzer, 2007). Bien que le système nigrostrié ait longtemps été associé à la motricité, il possède également un rôle dans la motivation (Wise, 2004, 2009). Récemment, la voie nigrostriée a ainsi été étudiée dans le cadre de la dépendance aux drogues. D'un point de vue comportemental, elle semble impliquée dans le passage des comportements motivés vers des réponses instrumentalisées (Wickens et al., 2007) en permettant la consolidation de répertoires d'actions efficaces pour l'obtention d'une récompense (Hyman et al., 2006). Les neurones dopaminergiques de la SNc encodent une erreur de prédiction de la récompense en répondant par des activations phasiques à des stimuli possédant une valence motivationnelle positive ou à des repères les prédisant (Bromberg-Martin et al., 2010).

c- Interactions fonctionnelles entre la tVTA et les systèmes dopaminergiques

Les études publiées sur la tVTA suggèrent un rôle de cette structure dans les réponses aux drogues. De nombreuses drogues addictives sont en effet responsables de modifications de l'activité électrophysiologique de la tVTA (Lecca et al., 2011). Une injection intraveineuse de morphine, de cocaïne et de WIN 55212-2, un agoniste des récepteurs des cannabinoïdes, diminue la fréquence de décharge des neurones de la tVTA. La baisse est plus faible et transitoire, et pour l'instant non confirmée, en réponse à l'injection de cocaïne. Cette inhibition de la tVTA est bloquée par un prétraitement avec un antagoniste sélectif des récepteurs mu des opioïdes et un antagoniste des récepteurs des cannabinoïdes CB1 pour le WIN 55212-2. A l'inverse de ces composés, la nicotine agit en augmentant la fréquence de décharge des neurones de la tVTA, un effet bloqué par la mécamylamine, un antagoniste partiel des récepteurs nicotiques. La tVTA est sensible d'un point de vue moléculaire aux seuls psychostimulants, mais les résultats indiquent que d'un point de vue électrophysiologique, elle serait sensible à d'autres types de drogues.

Certaines études se sont ensuite intéressées aux conséquences de cette modulation de l'activité de la tVTA par les drogues sur l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Jalabert et al., 2011; Matsui and Williams, 2011; Lecca et al., 2012). La durée de l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA observée en réponse à la stimulation de la tVTA peut être modulée par l'injection par voie intraveineuse de certaines drogues affectant l'activité de la tVTA (Lecca et al., 2012). En effet, lors de l'enregistrement *in vivo* d'un neurone dopaminergique pendant une stimulation électrique de la tVTA, l'injection intraveineuse préalable de WIN 55212-2 et de morphine sont responsables d'une diminution de la durée d'inhibition observée en l'absence de drogue. Dans les deux cas, l'inhibition retrouve sa durée basale lors de l'administration des antagonistes respectifs des récepteurs ciblés par les deux drogues. En revanche, la cocaïne et la nicotine n'affectent pas la réponse des neurones dopaminergiques de la VTA à la stimulation de la tVTA. Ces résultats indiquent que la morphine et les cannabinoïdes sont susceptibles d'influencer l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA via leur action sur les neurones de la tVTA. *In vivo*, l'injection intracérébrale de morphine dans la VTA est responsable d'une augmentation de la fréquence et des bouffées de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA. Cet effet est dépendant de l'action de la morphine sur les récepteurs mu exprimés par les terminaisons des afférences GABAergiques et la tVTA est fortement impliquée dans cette inhibition. En effet, l'inactivation sélective de la tVTA par une injection locale de muscimol Bodipy, un agoniste des récepteurs GABA_A, supprime l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques induite par une injection intraveineuse de morphine (Jalabert et al., 2011). Ces résultats indiquent que la morphine augmente la fréquence des neurones dopaminergiques de la VTA à travers l'activation des récepteurs mu exprimés par la tVTA. Ces données ont été confirmées en parallèle par une approche d'électrophysiologie *in vitro* démontrant que la stimulation électrique ou optogénétique de la tVTA était responsable d'une augmentation des potentiels post-synaptiques inhibiteurs dépendants des récepteurs GABA_A dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale et que ces potentiels étaient diminués par l'application de DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enképhaline), un agoniste des récepteurs mu (Matsui and Williams, 2011). Ces résultats confirment *in vitro* que la tVTA constitue un relais GABAergique jouant un rôle crucial dans les mécanismes d'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques du mésencéphale.

2- interactions de la tVTA avec l'habénula latérale

a- L'habénula latérale

a1- Anatomie de l'habénula latérale

Jusqu'à récemment, l'habénula restait une structure relativement peu étudiée dans la littérature. Il s'agit d'une paire de petits noyaux localisés au-dessus du thalamus, à côté de son extrémité postérieure, près de la ligne médiane. Elle est considérée comme une

partie de l'épithalamus, qui comprend la glande pinéale et l'habénula. L'habénula est divisée en deux parties : l'habénula médiale et la LHb. Elle est impliquée dans le contrôle motivationnel du comportement. La LHb est composée de plusieurs sous-noyaux formant deux sous-divisions ; une médiale et une latérale (Andres et al., 1999). La subdivision médiale reçoit des afférences directes ou indirectes du cortex cérébral, du pallidum ventral, de la substantia innominata, de la bande diagonale de Broca et du noyau du lit de la strie terminale (Herkenham and Nauta, 1979). La subdivision latérale reçoit principalement des afférences des ganglions de la base, notamment du globus pallidus interne. Les efférences de la LHb projettent principalement vers le tronc cérébral (Herkenham and Nauta, 1979; Geisler and Trimble, 2008) où elles ciblent les noyaux monoaminergiques : la VTA, la SNc, le raphé dorsal et le tegmentum dorsolatéral. La LHb est majoritairement glutamatergique mais contient également des neurones GABAergiques (Geisler and Trimble, 2008; Brinschwitz et al., 2010). Récemment, la tVTA a été identifiée comme une efférence majeure de la LHb (Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009), ce qui avait été en fait observé par Herkenham et Nauta avant que la structure ne soit caractérisée (Herkenham and Nauta, 1979).

a2- Fonctions générales de l'habénula latérale

La LHb est impliquée dans de nombreuses fonctions comme l'apprentissage associé à la récompense (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011), le stress (Amat et al., 2001), la douleur (Cohen and Melzack, 1993), l'anxiété (Murphy et al., 1996; Kurumaji et al., 2003), la dépression et le sommeil (Murphy et al., 1996; Valjakka et al., 1998). Une grande partie de ces fonctions ont été mises en évidence par des expériences lésionnelles. La LHb joue un rôle majeur dans la récompense et plus particulièrement dans la signalisation associée à l'erreur de prédiction (Matsumoto and Hikosaka, 2007). Elle serait en fait impliquée, par son action sur les neurones dopaminergiques mésencéphaliques, dans l'apprentissage de la suppression des actions pouvant conduire à des situations déplaisantes (Matsumoto and Hikosaka, 2011). Cette structure est également impliquée dans certains processus cognitifs. En effet, des lésions bilatérales sont responsables d'une augmentation des réponses prématurées dans un test attentionnel, cet effet étant potentiellement dû à une augmentation de l'activité dopaminergique (Lecourtier and Kelly, 2005). Ce type de lésion entraîne également des altérations de la mémoire spatiale (Lecourtier et al., 2004) et diminue la plasticité synaptique dans la voie reliant l'hippocampe au NAc, impliquée dans de nombreux processus cognitifs (Lecourtier et al., 2006). La LHb a été impliquée dans la dépression ; une inhibition pharmacologique de cette structure améliorant le comportement de type dépressif dans un modèle animal de dépression résistante aux traitements (Winter et al., 2011). Les expériences de stimulation cérébrale profonde de La LHb chez les animaux, comme chez l'homme, ont conduit à des résultats impressionnants, allant jusqu'à la rémission d'une patiente atteinte de dépression majeure (Sartorius et al., 2010).

b- Interactions fonctionnelles entre l'habénula latérale, la tVTA et la VTA

Les études portant sur la tVTA se sont souvent intéressées à son rôle dans le circuit LHb/tVTA/VTA. La LHb projette sur la tVTA et sa stimulation électrique est responsable d'une inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA dépendante des récepteurs GABA_A (Ji and Shepard, 2007) et d'une excitation des neurones de la tVTA (Hong et al., 2011). Dans plusieurs études, cette excitation des neurones de la tVTA en réponse aux stimulations de la LHb a d'ailleurs été utilisée comme l'un des critères d'identification des neurones de la tVTA (Jalabert et al., 2011; Lecca et al., 2011, 2012; Matsui and Williams, 2011). La stimulation de la LHb entraîne une inhibition des neurones dopaminergiques bien que 85% des terminaisons provenant de cette structure dans la VTA soient glutamatergiques (Omelchenko et al., 2009). En réalité, les axones glutamatergiques provenant de la LHb contactent principalement les neurones GABAergiques de la VTA, ainsi que ceux de la tVTA (Brinschwitz et al., 2010). La densité d'innervation des neurones GABAergiques de la VTA étant trop faible pour expliquer l'effet inhibiteur observé sur les neurones dopaminergiques de la VTA en réponse à la stimulation de la LHb, la tVTA est le meilleur candidat d'un point de vue anatomique pour jouer le rôle de structure intermédiaire entre la LHb et les neurones dopaminergiques de la VTA (Balcita-Pedicino et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés par une approche d'électrophysiologie menée chez le singe mettant en évidence un rôle de la tVTA dans la transmission de l'information relative à l'erreur de prédiction négative de la LHb vers les systèmes dopaminergiques (Hong et al., 2011). D'un point de vue moléculaire, les neurones de la tVTA recevant des afférences provenant de la LHb expriment les protéines c-Fos en réponse à des chocs électriques aux pattes chez le rat (Jhou et al., 2009a), suggérant également un lien fonctionnel entre les deux structures dans le traitement de l'information relative à l'aversion.

C- Revue de la littérature concernant la tVTA : A new control center for dopamine systems: pulling the VTA by the tail

1- Contexte de l'écriture de la revue

L'étude de la tVTA a conduit à une accumulation rapide de données concernant les fonctions de la tVTA aussi bien dans la réponse aux drogues que dans le traitement de l'information relative à l'aversion. Il était alors nécessaire de réaliser une revue de la littérature ayant pour objectif de compiler l'ensemble de ces données récentes et de les conceptualiser pour imaginer les fonctions potentielles de cette région cérébrale récemment découverte. Cette revue a été réalisée en réponse à une invitation de mon

directeur de thèse, le Dr. Michel Barrot par le professeur Paul Bolam pour *Trends in Neuroscience*. J'ai alors travaillé exclusivement sur cette revue pendant les quatre premiers mois de l'année 2012, réalisant les recherches bibliographiques, une grande partie de l'écriture et l'ensemble des figures.

2- A new control center for dopamine systems: pulling the VTA by the tail

Un nouveau centre de contrôle des systèmes dopaminergiques : tirer la VTA par la queue

2012 Elsevier limited

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>

Trends in Neurosciences, November 2012, Vol.35, No.11

Numéro de licence : 3644300725194

A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail

Romain Bourdy^{1,2} and Michel Barrot^{1,2}

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Strasbourg, France

² Université de Strasbourg, Strasbourg, France

The tail of the ventral tegmental area (tVTA), also named the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), is a recently defined midbrain structure considered to exert a major inhibitory drive on dopamine systems. In view of its connectivity, tVTA is well placed to convey salient positive and negative signals to dopamine cells and participate in adaptive behavioral responses. This structure could act as a hub converging and integrating widespread multimodal signals toward dopamine systems. The tVTA participates in prediction error, motor control, and responses to aversive stimuli and drugs of abuse. In light of the crucial role of the tVTA in the opiate control of dopamine activity, a neuroanatomical update of the disinhibition model of morphine action is proposed.

Introduction

Progress in brain function and pathology and in brain neuroanatomy and connectivity are often interdependent. Based on functional studies in the rat, a new mesopontine region named either the tVTA [1,2] or the RMTg [3] was recently described. Characterization of this region, including its boundaries, neurochemical markers, and connectivity [1–6], is revealing circuitry features that in turn are fostering new research related to its functional roles. The tVTA is rich in inhibitory GABA neurons expressing μ -opioid receptors and sends extensive projections toward midbrain dopamine cells. It is proposed as a major brake for dopamine systems.

Since the description of dopamine systems in the 1960s and 1970s [7], accumulating evidence points to their crucial role in a broad range of functions, including motor functions [8], reward-related learning [9,10], motivated behavior [11], and mood [12]. The nigrostriatal pathway from the substantia nigra *pars compacta* (SNc) to the dorsal striatum, and the mesolimbic and mesocortical pathways from the VTA to the nucleus accumbens (NAc) and the cerebral cortex, are the most studied of these systems. Although dopamine neurons have an intrinsic pacemaker activity [13–15], their firing pattern depends on a fine excitatory/inhibitory tune exerted by glutamatergic and GABAergic inputs [13–16]. GABAergic inhibition of dopamine systems is tonically present and, according to the disinhibition model, it can be removed by opiates [17]. Based on its neuroanatomical and neurochemical features, the tVTA appears as a main candidate for this inhibitory control of dopamine activity, and

electrophysiological studies support this hypothesis [18–22]. In addition, functional approaches indicate a crucial role for the tVTA in reward prediction error and the control of aversive responses. In the context of addiction, the tVTA is a target for psychostimulant-induced plasticity [1,6,23] and is also essential for morphine action on dopamine neurons [19]. This latter finding suggests that the classical disinhibition model may need to be revisited in light of the GABAergic control that the tVTA exerts on dopamine systems.

The tVTA and RMTg: the two faces of Janus

Identification of a new brain region

The tVTA was initially described in rats as a bilateral cluster of GABA neurons within the posterior VTA, dorso-lateral to the interpeduncular nucleus, and expressing FosB/ Δ FosB after psychostimulant administration [1]. However, the Fos staining showed that this group of cells extends caudally beyond the defined borders of the VTA [1], shifting dorsally to become embedded within the superior cerebellar peduncle [2]. Around the same time as the tVTA was described, a region caudal to the rat VTA and lateral to the median raphe was proposed to influence passive aversive responses [24]. This region belongs to the reticular formation and was later designated as RMTg [3]. The RMTg extends rostrally, shifting ventrally to become embedded within the posterior VTA. A similar region has also been observed in primates [18] and in mice [25].

There is now agreement that the tVTA and RMTg are two faces of the same structure. Although the most appropriate nomenclature is open to discussion, both names appear to be equally valid. Indeed, tVTA refers to the fact that the first third of the structure is inserted like a bilateral wedge deep into the VTA, and many studies did not differentiate it from the VTA itself [1,26–31]. Moreover, it neuroanatomically and functionally reflects the strong link that the tVTA has with dopamine systems. The tVTA controls their activity and its neurons display *ex vivo* electrophysiological features similar to those of substantia nigra *pars reticulata* GABA neurons [20]. By contrast, RMTg refers to the fact that the last half of the structure extends caudally to the rostral edge of pedunculo-pontine nuclei and shares homology with tegmental structures. This name is thus consistent with the nomenclature of other mesopontine structures, such as the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei [3,5,32]. It should also be noted that various other names have been used to describe this brain region (or at least parts of it).

Corresponding author: Barrot, M. (mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr).

Keywords: tVTA; RMTg; dopamine; GABA; morphine; addiction.

For instance, the ‘retro-VTA’ [26], ‘Area 2’ of GABA cells within VTA [27], ‘ventral tegmental tail’ [28], ‘interstitial nucleus of the decussation of the superior cerebellar peduncle’ [29], ‘rostromedial pontine tegmentum’ [33], or ‘caudal pole of the VTA’ [30]. Based on our previous publications, the tVTA–RMTg continuum (Figure 1a) will be simply referred to as the ‘tVTA’ in this review.

Looking for borders and markers

Defining boundaries of the tVTA is still a challenge requiring precise neuroanatomical, neurochemical and electrophysiological criteria. Neuroanatomically, the tVTA receives strong lateral habenula inputs [2,3,18,25] and sends dense projections to mesencephalic dopamine cells [3,6,30]. However, the extent of this input/output convergence has not yet been precisely described and compared to neurochemical markers. In rats, tVTA cells are mostly GABAergic [1–3,27,34] and, after exposure to psychostimulants, express Fos proteins with high selectivity compared to surrounding areas [1–3,23,26,33,35]. Rat tVTA is also enriched in μ -opioid receptors [3,19,36], somatostatin [3] (Figure 1b–f), and prepronociceptin [36]. In mice, it was previously unclear whether a group of GABA cells embodied

the ‘tVTA’, or if these cells were included within the VTA and corresponded to a subset of the classically described VTA GABA neurons whose functional importance has also recently been highlighted [37–39]. A recent study, however, based on the optogenetic stimulation of terminals from lateral habenula efferents in mice, has defined a brain region similar to the rat tVTA [25]. The limited anteroposterior extent of this structure in mice, and its partial inclusion within the posterior VTA, could explain the previous difficulties in identifying the tVTA in mice.

Electrophysiologically, the *in vivo* firing rate of rat tVTA neurons covers a large range (1–60 Hz) [5,19,20], with an interspike interval of 50–73 ms and an action potential width of 1 ms measured from peak to trough in anesthetized rats [19,20] (Figure 1g,h). A similar mean firing rate (17.8 Hz) is observed in monkeys, with a 0.66 ms action potential measured between the troughs before and after the peak of the spike [18]. In a circuitry context, tVTA neurons have also been identified by their response to orthodromic lateral habenula stimulation [18–20] or by the antidromic response to substantia nigra stimulation [18]. In the caudal-most part of the structure (–7.0 to –7.4 mm), some of the rat tVTA neurons respond to

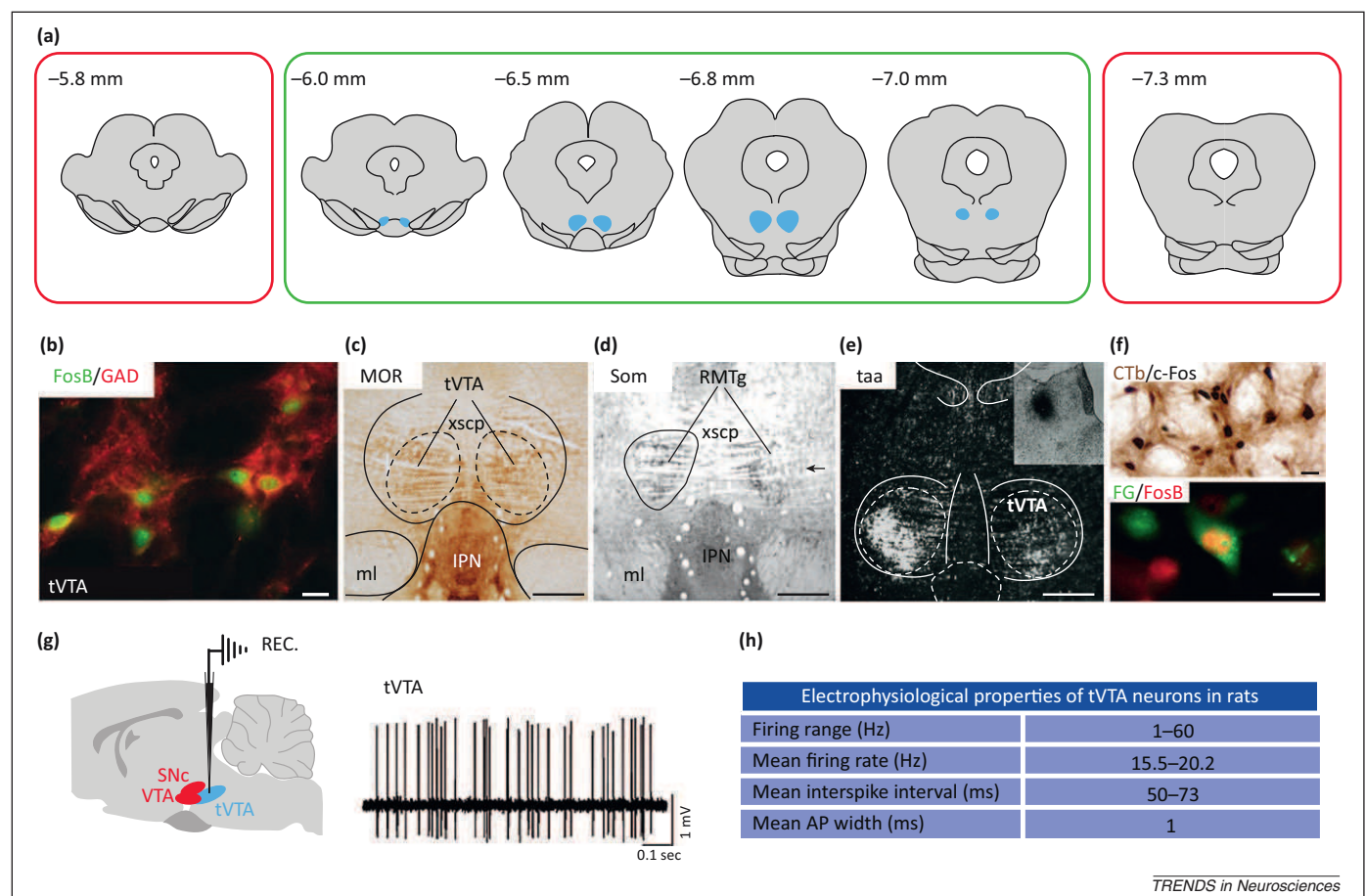


Figure 1. Delimiting tVTA boundaries. (a) In rat, the tVTA (blue) extends from –6 to –7 mm from the bregma, and can be delimited by Fos expression following exposure to psychostimulants [2,23]. (b) Neurons from the tVTA are mostly GABAergic (as indicated by immunostaining for GAD, red) and express FosB (green) following psychostimulant injections [23]. (c,d) The tVTA is rich in μ -opioid receptors (MOR) [19] in (c) and in somatostatin (Som) in (d) [3]. (e) Neuroanatomically, the tVTA can be visualized (white) following anterograde tracer injections in the lateral habenula (inset) [86]. (f) Injections of retrograde tracers in the VTA stain cell bodies in the tVTA (CTb, brown in top panel, or FG, green in bottom panel), these neurons can express Fos-like proteins (black and red) following electrical foot-shocks [5] or cocaine exposure [6]. (g,h) Electrophysiologically, tVTA neurons have a relatively high firing rate *in vivo*: (g) [18], (h) [5,19,20]. Abbreviations: AP, action potential; CTb, cholera toxin B subunit; FG, fluoro-gold; GAD, glutamic acid decarboxylase; IPN, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; RMTg, rostromedial tegmental nucleus; SNc, substantia nigra pars compacta; taa, tritiated amino acid; tVTA, tail of the VTA; VTA, ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars: 20 μ m in (b,f); 400 μ m in (c–e). Reproduced, with permission, from [23] (b), [3] (d), [86] (e), and [5,6] (f).

paw pinching [20], however such a response has not yet been observed in the rest of tVTA. Whether this is representative of tVTA neurons needs to be addressed.

tVTA: a neuroanatomical funnel toward dopamine systems?

Converging information on the tVTA

tVTA afferents are widely distributed [2,3,32]. Inputs arise from the medullary, pontine, and mesencephalic reticular formation, parabrachial nucleus, laterodorsal and pedunclopontine tegmental nuclei, dorsal raphe, periaqueductal gray, intermediate layers of the contralateral superior colliculus, substantia nigra, lateral habenula, zona incerta, lateral and dorsal hypothalamic areas, preoptic region, parts of the extended amygdala (with the notable exception of the central nucleus of the amygdala), ventral striatopallidum, lateral septum, and frontal cortex [2,3] (Figure 2a). Most of these input structures also project to the VTA [40], but these projections may arise from different neuronal populations. For example, concerning the lateral habenula, it has been proposed that tVTA and VTA inputs preferentially arise from the lateral and medial subdivisions, respectively

[41]. Neurochemically, the characterization of tVTA inputs remains very limited. Lateral habenula projections to the tVTA are mainly glutamatergic [34,42], afferents from the dorsal raphe and locus coeruleus are nonaminergic, and those from the lateral hypothalamus are mostly non-orexinergic [2].

Dopamine systems are main targets of the tVTA

tVTA outputs to the forebrain are restricted, the main forebrain output being the lateral hypothalamus [3,6]. There are more tVTA efferents to the brainstem, particularly to the dopamine cell areas (Figure 2b): VTA, SNc, and to a lesser extent the retrorubral field [3,5,6,30]. 80% of the synapses from tVTA axons on VTA dopamine neurons preferentially contact dendrites [34], although appositions can also be seen on cell bodies [5,6,30]. A possible topographical organization of tVTA projections to dopamine neurons, with more lateral and caudal aspects of tVTA targeting more lateral dopamine neurons, has been suggested [5,32] but has not yet been precisely studied.

Based on its connectivity, the tVTA may act as a converging hub, integrating multimodal internal and external information, and channeling the output toward dopamine

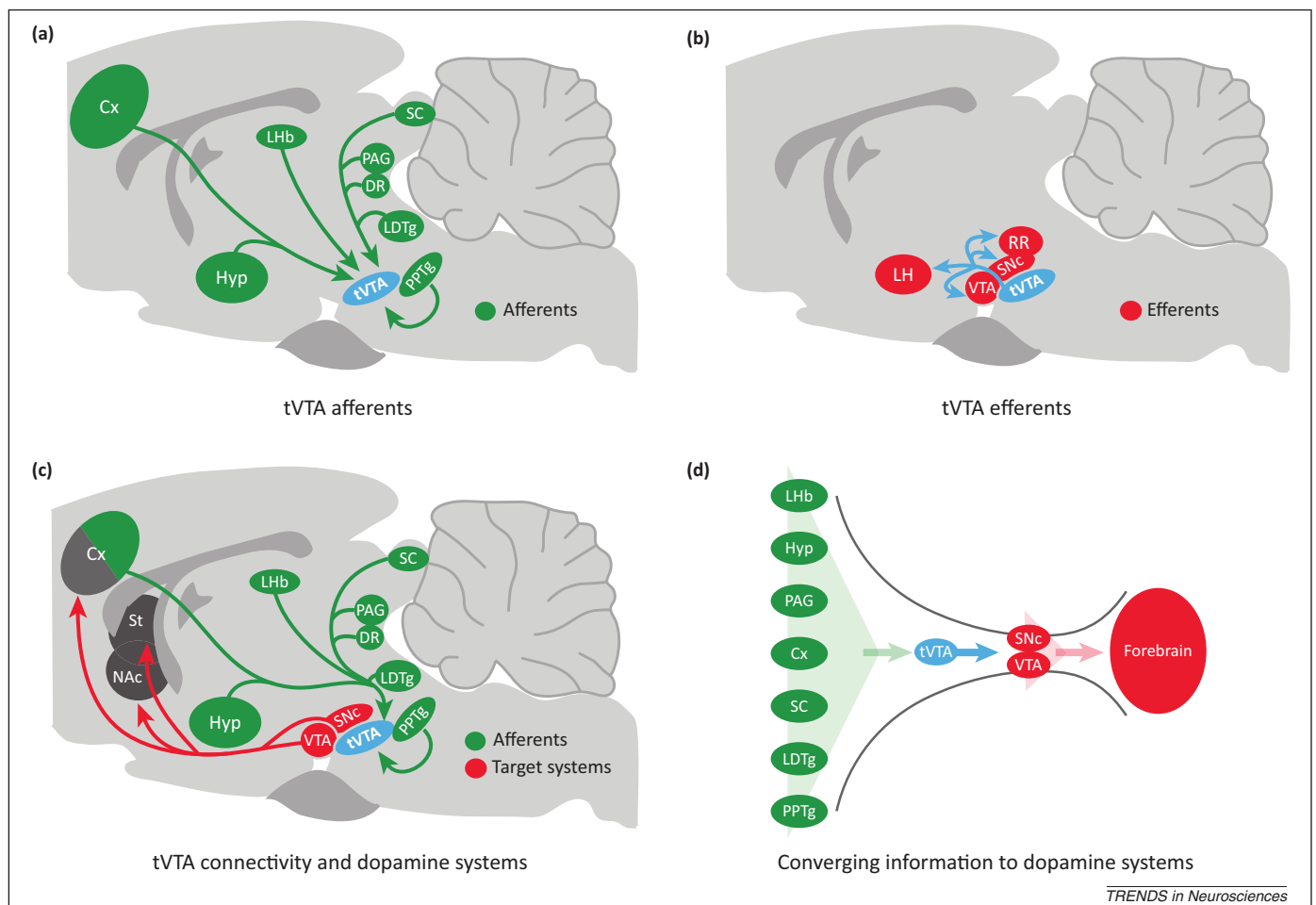


Figure 2. Schematic of tVTA main connectivity. (a) The tVTA receives afferents (in green) from a broad range of cerebral structures. The main afferents arise from the frontal cortex (Cx), lateral habenula (LHb), hypothalamus (Hyp), superior colliculus (SC), periaqueductal gray (PAG), dorsal raphe (DR), laterodorsal tegmentum (LDTg), and pedunclopontine tegmental nucleus (PPTg). (b) The tVTA efferents (in red) are more restricted and preferentially target midbrain dopamine nuclei: ventral tegmental area (VTA), substantia nigra pars compacta (SNc), and to a lesser extent the retrorubral field (RR). The tVTA also heavily projects to the lateral hypothalamus (LH). Other brainstem and forebrain projections [3,6,23,32] are not depicted in this schema. (c) The tVTA is well placed to exert control of both mesocorticolimbic and nigrostriatal systems. (d) The tVTA may act as a hub, integrating converging multimodal signals from widespread structures and channeling them toward dopamine systems and their forebrain targets. It is important to note that these tVTA afferents (in green) also directly project to the VTA. Abbreviations: NAc, nucleus accumbens; St, dorsal striatum.

systems (Figure 2c,d) to trigger or modulate motor/motivational responses.

Incorporating the tVTA into brain circuits

Direct experimental evidence suggests that the tVTA is involved in a lateral habenula/tVTA/VTA pathway and a tVTA/VTA/NAc pathway. Fibers arising from the lateral habenula contact tVTA neurons projecting to the VTA [5,34,42]. In the tVTA, over 55% of synapses from lateral habenula inputs are located on GABA-positive dendrites; in the VTA, most synapses from tVTA inputs are GABA symmetric synapses on dendrites from dopamine cells [34]. In this pathway, the tVTA has been proposed to convert the glutamatergic excitatory drive from the lateral habenula in an inhibitory influence onto VTA dopamine neurons [34,42]. Axons from the tVTA appose VTA dopamine neurons that project to the NAc [6], which support a tVTA influence on mesolimbic system. Because the tVTA also projects to the SNc, it would be of interest to assess directly its link with the nigrostriatal system, and to incorporate the tVTA in the context of the basal ganglia circuitry. In addition, factorial analysis on amphetamine-induced Fos expression has shown that the tVTA belongs to a functional brain circuit including the striatal complex and the medial prefrontal cortex (PFC) [43]. Multiple tract-tracing and/or electrophysiological studies will be needed to incorporate the tVTA into other potential brain circuits.

tVTA as a control center for dopaminergic systems

Neuroanatomical studies suggest that the tVTA could regulate the activity of dopamine neurons [3,5,6]. This has been confirmed by electrophysiological studies in rats. Specifically, tVTA inhibition increases dopamine cell activity [19], whereas tVTA stimulation decreases it [20–22]. Electrical stimulation of the tVTA thus leads to a potent inhibition of VTA dopamine neurons *in vivo* [20,21] and to evoked inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) *ex vivo* [22]. Although the high density of passing fibers in the tVTA area could be a technical concern when using electrical stimulation, *ex vivo* optogenetic stimulation of tVTA neurons also evokes IPSCs in VTA dopamine neurons, confirming the inhibitory influence of tVTA. This effect is dependent on GABA_A receptors [22]. tVTA control of dopamine neurons has also been observed in monkeys. Indeed, 94% of dopamine neurons recorded in the SNc of rhesus monkeys are inhibited by tVTA stimulation [18]. In addition, tVTA inhibitory control over dopamine systems has also been shown to be tonic. Specifically, tVTA inhibition by muscimol in anaesthetized rats was observed to increase the spontaneous activity of VTA dopamine neurons [19].

Considering the concept of accelerator/brake proposed by Arvid Carlsson for cortical regulation of monoaminergic brainstem neurons [44], tVTA could be a major GABA brake for dopamine systems. This could apply to the PFC which projects to both the VTA and tVTA. This may potentially be extended to subcortical glutamatergic afferents to these two structures from the lateral habenula [42,45], pedunculopontine tegmental nucleus [46], and superior colliculus [40,47]. Dopaminergic activity would depend upon the balance between the accelerator

(i.e., direct glutamatergic inputs) and the GABA brake that is necessary to fine-tune the firing and bursting of midbrain dopamine neurons.

Between reward and aversion: choosing behavioral strategies

tVTA in prediction error

Learning to adequately predict the positive or negative outcomes of an action is an important process for adaptation and survival [48–50]. Midbrain dopamine neurons participate in this process by phasically increasing or decreasing their firing when the reward outcome is respectively better or worse than expected. These signals may influence reward-related learning as a means to reinforce or avoid actions based on previous outcomes [51]. The lateral habenula also contributes to this process [52], and the tVTA is proposed as a potential relay to translate habenular glutamatergic influence into inhibition of dopamine cells [5,18,34,42].

Neurons from the tVTA can respond to rewarding or aversive stimuli, and to their associated predictive cues and/or to reward omission [5,18]. In rats, exposure to sucrose or to a tone predicting sucrose delivery results in inhibition of some tVTA neurons [5]. Reciprocally, neuronal excitation can be observed with omission of expected sucrose delivery, foot-shock, or a shock-predicting tone [5]. Aversive conditioning is often more robust than appetitive conditioning, and whereas around 40% of tVTA core neurons preferentially respond to a shock-associated cue compared to a sucrose-associated cue, some heterogeneity in neuronal response can be observed [5]. Indeed, in the remaining neurons of the tVTA core, 45% are not responsive to cues and around 15% preferentially respond to the sucrose-associated cue. In monkeys, the one-direction-rewarded (sucrose) task (1DR) revealed that roughly 2/3 of tVTA neurons ('reward negative type') are excited by a visual target predicting the absence of reward and are inhibited by one predicting a reward [18]. This proportion increases to 94% in the tVTA core. Some neurons (i.e., 30%, 'reward positive type') exhibit an excitatory response following the reward-indicating target. They are more distant from the tVTA core and are in a region with sparser retrograde labeling from dopaminergic areas, suggesting that these neurons less conclusively belong to the tVTA. The response of both types of neurons correlates with the latency of eye movement toward the visual target [18]. Moreover, in these neurons the presence or absence of sucrose reward *per se* also induces a response [18], but only with an unexpected/novel outcome in agreement with error-prediction models [49]. For most tVTA cells, responses are thus similar to those of lateral habenula neurons and opposite to those of midbrain dopamine neurons [18,52]. The tVTA may thus relay lateral habenula reward-prediction errors to the dopamine system [18], but the tVTA is also likely to encode error prediction independently from the lateral habenula. Indeed, the response latency of tVTA neurons in the 1DR task is slightly shorter than for habenula neurons. The origin of the signals leading to tVTA neuron response is thus not yet defined. Interestingly, one of the main tVTA inputs arises from the superior colliculus, which processes

sensory information and controls eye movement partly through dopamine systems [47,53,54].

Control of aversive responses

tVTA neurons receive afferents from structures implicated in aversive responses, including the anterior cingulate cortex [55,56] and subcortical regions such as the septum [57], parts of the extended amygdala [58], the lateral habenula [59–61], and the periaqueductal gray [24,62,63]. In the context of pain, endomorphin-1 or muscimol injections in the tVTA have been observed to reduce nociceptive response in the second phase of the formalin test in rats [36]. Such an effect could be related either to the recruitment of dopamine-dependant analgesia [64] or to brainstem projections of the tVTA. In the tVTA, increased c-Fos expression is observed after food restriction to 85% of initial bodyweight or after electric foot-shocks and shock-predictive cues [5]. These shock procedures also increase the activity of rat tVTA neurons [5]. In mice, acute unpredictable foot-shocks enhance the excitatory transmission from lateral habenula terminals to tVTA neurons

through a presynaptic mechanism [25]. Behaviorally, bilateral tVTA lesions decrease freezing to conditioned (auditory tone in fear conditioning) or unconditioned (predator odor, trimethylthiazoline) stimuli [5]. In the latter, the lesion resulted in a switch from a passive (freezing) to an active (defensive burying) coping strategy, suggesting that the tVTA lesion may influence behavioral output, and more particularly behavioral inhibition, rather than the aversive sensation. Parts of the periaqueductal gray, including its ventrolateral component, are crucial for the control of these coping strategies [24,62,63] and strongly innervate the tVTA. The periaqueductal gray/tVTA/(VTA–SNc) pathway could thus be an interesting candidate for controlling the inhibition of action linked to passive coping strategies. tVTA lesions have also been found to reduce anxiety-like behavior, as assessed by increased time spent in the open arms of an elevated plus-maze [5]. In mice, the optogenetic stimulation of the lateral habenula terminals within the tVTA directly induces active, passive, and conditioned behavioral avoidance of the stimulation [25].

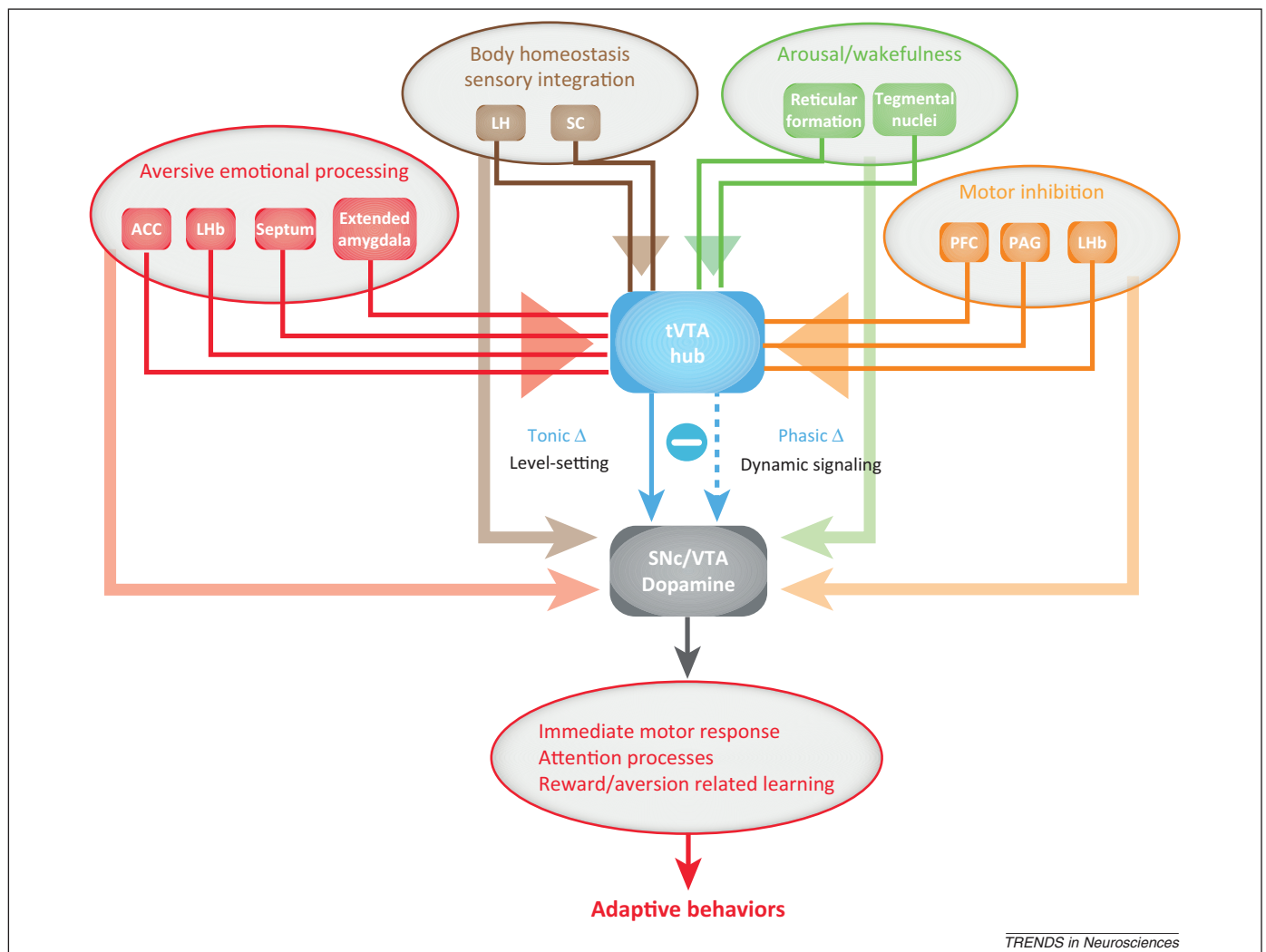


Figure 3. Information processing by the tVTA. The tVTA receives informative signals from structures implicated in aversive processing (in red), body homeostasis and sensory integration (brown), arousal/wakefulness (green) and motor inhibition (orange). The tVTA integrates these signals to control dopamine systems. The tonic inhibitory control exerted by the tVTA on dopamine neurons could play a 'level-setting' role, by influencing the excitability threshold of these neurons. The phasic transients in tVTA activity might influence dopamine neuron activity to control immediate action selection and triggering, attention processes, and reward/aversion-related learning. The tVTA, acting as a converging hub for multimodal internal and external information processing, would thus participate in the optimization of adaptive behaviors in response to salient stimuli.

Manipulation of structures linked to the tVTA (i.e., either the inputs, such as the lateral habenula [60,61] and periaqueductal gray [62], or the output dopamine systems [12]), can affect depressive-like behaviors. As a relay toward dopamine systems, the tVTA may participate in such influences. However, concerning the lateral habenula, a recent study suggests that direct lateral habenula–VTA projections, rather than lateral habenula–tVTA projections, are more crucial for learned helplessness [65].

A hub between emotional and motor systems?

As discussed above, the tVTA receives information from structures implicated in aversive emotional processing. Moreover, the tVTA receives strong afferents from structures implicated in body homeostasis and sensory integration – such as the lateral hypothalamus [66,67] and superior colliculus [68]. Arousal- and wakefulness-associated regions in the reticular formation and tegmental nuclei [69] also project to the tVTA. Finally, it receives afferents controlling the inhibition of action, such as the PFC [70], ventrolateral periaqueductal gray [24,62] and lateral habenula [71]. Thus, the tVTA may integrate a wide range of information concerning both the external environment and internal state, to modulate motor output (Figure 3). Indeed, the tVTA can influence motor responses through its projections on ascending aminergic systems targeting forebrain regions [72], but also through descending projections via lateral mesopontine structures [3]. As a result, the tVTA has been proposed to be a possible component of the emotional motor system [3,72,73].

In this context, the tVTA could control level-setting systems which modulate the general level of activation of efferent neuronal populations [72]. Dopaminergic systems are, for example, under tVTA control [18–22]. Changes in the tonic control would change the threshold of response and/or the pattern of activity of dopamine neuron populations, and this would be potentially fundamental to the coordination or synchronization of their activity, and thereby influence output responses. At present, this hypothesis is supported at the behavioral level by the anxiety state and shifts in behavioral responses following tVTA lesions [5], and at the electrophysiological level by the tonic control exerted by tVTA on dopamine cells [19]. Additional work is however needed to further explore the functional role of this tonic control.

By contrast, phasic changes in tVTA activity have been studied in response to rewarding and aversive stimuli or associated cues [5,18]. These effects are proposed to be linked to tVTA control of dopamine systems. Rapid changes in tVTA firing could influence the immediate selection and/or triggering of adapted motor responses to stimuli salient for their positive or negative emotional value. Considering tVTA connectivity, phasic changes in its activity could also influence attentional processes in response to salient stimuli. This could be exerted not only through tVTA projections to dopamine systems, but also via projections to other brainstem aminergic ascending pathways [3,6]. Finally, phasic changes in tVTA activity would also participate in the adaptive process through their role in reward- and aversion-related learning [5,18,71,74] (Figure 3).

tVTA and drugs of abuse

Molecular influence of psychostimulants...

The tVTA was initially described in the context of its Fos responsiveness to psychostimulants [1–3,33]. Both FosB/ Δ FosB and c-Fos are induced locally by acute [2,23] or chronic cocaine treatments, chronic exposure being either noncontingent (passive administration) [1,33,75] or contingent in a self-administration context [33,75]. Acute cocaine-induced FosB/ Δ FosB levels in the tVTA peak at 3 h post-administration, but remain elevated for over 4 days [23] and accumulate with chronic administration [1]. This implies a possible role for the tVTA in long-term behavioral consequences of cocaine exposure. Induction of Fos proteins in the tVTA is also observed with acute or repeated exposure to amphetaminic drugs, such as *D*-amphetamine [1,22,23,43], methamphetamine [3,20,76], or (+/–)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) [23]. Concerning methamphetamine self-administration, c-Fos or FosB/ Δ FosB are induced in the tVTA by both acute yoked and chronic self-administration procedures [76], with an accumulation of FosB/ Δ FosB and without a tolerance for c-Fos induction after 3 weeks of self-administration [76]. The methamphetamine seeking behavior *per se* does not result in further Fos induction [76].

Psychostimulant-induced expression of Fos proteins in tVTA neurons may be mediated by dopamine. Indeed, acute or repeated injections of GBR12909, a selective inhibitor of dopamine transporters, lead to the same effect, whereas inhibitors of noradrenaline and/or 5-HT transporters are ineffective [1,23]. Fos induction in the tVTA is not restricted to psychostimulants that inhibit dopamine transporters. It can also be observed following acute injections of caffeine [23] and modafinil [26], a nonaddictive psychostimulant used for narcolepsia treatment. Results concerning nicotine exposure remain unclear. A study in rats reported nicotine-induced Fos expression in VTA non-dopamine cells [77] that could correspond to the tVTA, but this was not supported by a recent study in mice [31]. Nicotine action, being highly dependent on the dose, route of administration, context, and species [78] needs further investigation to clarify its impact on Fos induction in tVTA neurons.

Interestingly, Fos induction appears to be selective for arousing, psychostimulant drugs because other classes of drugs fail to induce Fos, independently of their addictive potential. Indeed, administration of morphine, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ethanol, diazepam, γ -hydroxybutyric acid (GHB), ketamine, phencyclidine (PCP), reboxetine, nortriptyline, venlafaxine, fluoxetine, dexfenfluramine, sodium valproic acid, or gabapentin does not result in FosB induction in the tVTA [1,23].

In a neurocircuitry framework, cocaine or amphetamine injections [22,23,33], or cocaine self-administration [33], leads to Fos expression in tVTA neurons that project to the VTA. Induction of FosB targets tVTA GABA neurons projecting to mesolimbic neurons [6]. However, other pathways are probably also recruited. Indeed, methamphetamine is responsible for FosB induction in tVTA neurons projecting to the dorsal raphe [79]. Future studies are needed to understand the functional consequences of such molecular changes on these pathways and on behavioral outputs.

... but electrophysiological influence for all drugs of abuse?

Although only psychostimulants recruit Fos in the tVTA, electrophysiological data have revealed that tVTA neurons are responsive to other drugs of abuse. Strikingly, opiates and cannabinoids have a major influence on tVTA neurons. *In vivo*, systemic or local morphine administration leads to a potent decrease in tVTA cell firing [19,20]. Consistent with *in vivo* data, patch-clamp recordings of tVTA neurons in acute slices show that morphine [20], or the μ -opioid receptor agonists DAMGO and met-enkephalin [22], inhibit tVTA neurons. These findings are in agreement with the presence of μ -opioid receptors on tVTA neurons [3,19,36]. Opioid and cannabinoid systems are often interdependent [80], and both *in vivo* and *ex vivo* experiments have revealed that the CB1 agonist WIN55212-2 potentially inhibits tVTA activity [20]. Through a disinhibition process, the tVTA may thus be an important target for opioid and cannabinoid influences on dopamine systems [19,21,22]. *In vivo*, tVTA inactivation suppresses morphine action on VTA dopamine neurons [19], and morphine or WIN55212-2 reduces VTA dopamine neuron inhibition evoked by tVTA stimulation [21]. Similarly, DAMGO inhibits VTA dopamine neuron IPSCs induced by tVTA optogenetic stimulation [22]. Moreover, behavioral studies indicate that rats self-administer endomorphin-1 and muscimol, and develop conditioned place preference to endomorphin-1, when the infusion is preferentially in the tVTA core [36].

Conversely to opioids and cannabinoids, systemic nicotine increases tVTA cell firing [20] but may not affect VTA dopamine neuron inhibition evoked by tVTA stimulation [21]. Paradoxically, cocaine may lead to a very small decrease in tVTA cell firing [20] while it locally induces Fos proteins. However, this limited electrophysiological action of cocaine remains to be confirmed.

Different classes of drugs of abuse may then share the ability to influence the tVTA. This raises the question as to the role of the tVTA in addiction. Changes in tVTA activity provoked by drugs of abuse may, for example, affect dopamine neuron activity, including the transition to bursting states, and subsequently affect dopamine release in fore-brain areas. Whether tVTA is an actor in the sensitizing [81], opponent [82], or impulsivity [83] processes implicated in addiction remains an open question.

Revisiting the disinhibition model

In the early 1990s, Johnson and North showed that opioids hyperpolarize GABA-containing interneurons in the VTA through an action on μ -opioid receptors, leading to reduced GABA-mediated synaptic input to dopamine cells [17]. These observations led to the 'disinhibition model', in which morphine recruits the dopamine system by acting on local GABA interneurons and blocking their inhibitory tone (Figure 4). Because the tVTA is rich in μ -opioid receptors and is partially embedded within the VTA, this disinhibition model merits revisiting in view of the effects of morphine on tVTA GABA neurons [19]. Indeed, morphine and opioids increase dopamine neuron activity by inhibiting GABA neurons or terminals from the tVTA [19,22], although glutamatergic inputs to the VTA are necessary [19]. Moreover, compared to VTA GABA neuron synapses [45], synapses of tVTA terminals more specifically target dopamine cells [34]. This suggests that drug action on tVTA neurons/terminals is more likely to influence dopamine activity (Figure 4).

This revised model may also apply to other classes of drugs. For example, cannabinoids, benzodiazepines, and to some extent alcohol, are also thought to act on dopamine neurons through disinhibition [80,84,85]. Interestingly, cannabinoids decrease tVTA activity and reduce the inhibition of VTA dopamine neurons during tVTA stimulation

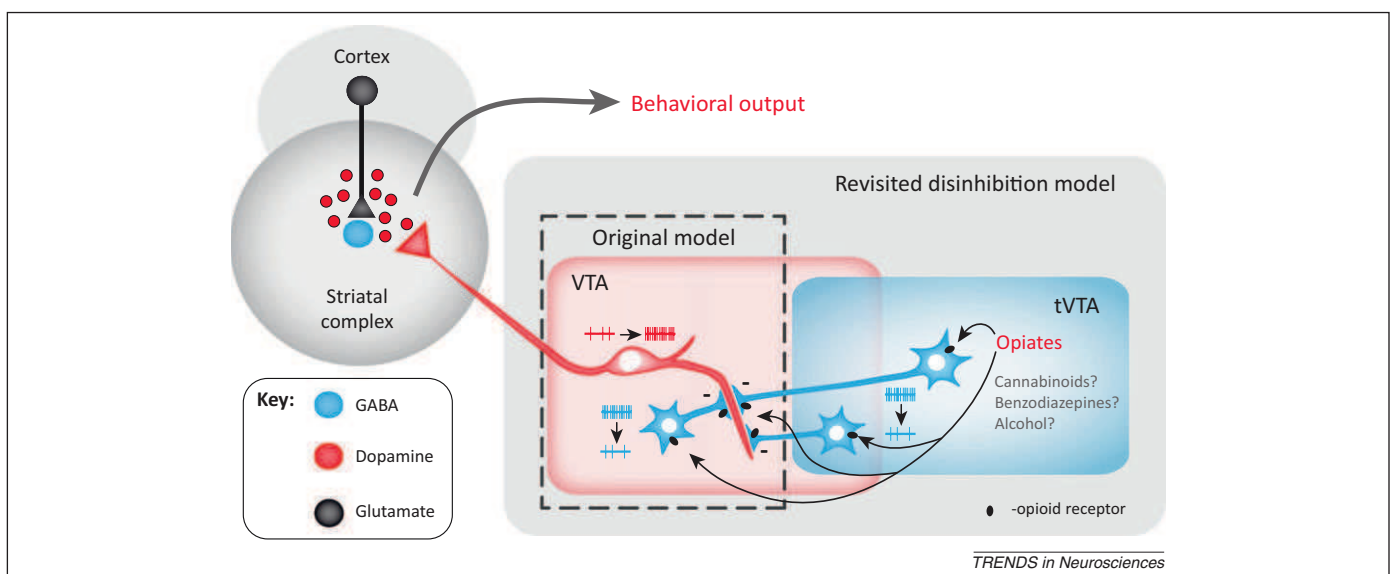


Figure 4. Revisiting the disinhibition model of morphine action on dopamine neurons. According to this model (broken line area, [17]), opiates target μ -opioid receptors expressed by ventral tegmental area (VTA) GABA interneurons to remove inhibition on VTA dopamine neurons. As shown on the schema, the tail of the VTA (tVTA) is partially embedded within the VTA and some tVTA GABA neurons may thus have been previously considered as VTA neurons. tVTA GABA neurons express high levels of μ -opioid receptors and project to dopamine cells. Morphine can act on tVTA cell bodies and/or terminals within the VTA to suppress the inhibitory tone exerted by the tVTA on dopaminergic activity [19,22]. Other drugs, such as cannabinoids, benzodiazepines, and ethanol, are also known to recruit dopamine cells through disinhibition mechanisms [80,84,85]. Research is necessary to assess whether the revisited disinhibition model may be extended to these drugs.

Box 1. Outstanding questions

- Is the tVTA-RMTg present in all mammals, including humans? Is it present in non-mammalian species? What is the ontogeny of this brain region?
- What is the molecular profile of tVTA cells? Are the molecular features and the developmental origin of tVTA GABA neurons similar or different from those of VTA GABA neurons?
- Can the influence of tVTA over VTA dopamine neurons be generalized to the substantia nigra or retrorubral field dopamine neurons?
- What is the functional significance of afferents from a given brain region influencing dopamine cells both directly and indirectly through the inhibitory GABA tVTA? How does it participate in shaping dopaminergic activity?
- What is the respective significance of the tonic and phasic controls that tVTA exerts on dopamine neurons?
- Is the tVTA a necessary relay center for the processing of error prediction by VTA neurons? Where does the information leading to tVTA detection of error prediction originate?
- What are the influences of the tVTA on behavior? Is the tVTA important in the control and choice of coping strategies?
- Is the tVTA directly implicated in neurological or psychiatric pathologies involving dopamine systems?
- What are the significance and functional consequences of psychostimulant-related Fos induction in the tVTA? Why is this induction limited to psychostimulant drugs?
- Does the revised tVTA-VTA disinhibition model also apply to dopaminergic action of other drugs, such as cannabinoids, benzodiazepines, or alcohol?
- Is the tVTA implicated in mechanisms leading to drug abuse, and if so, how?

[20,21]. The tVTA is thus a good candidate for controlling cannabinoid action on dopamine neurons. This requires direct confirmation, and future research will be necessary to test whether similar mechanisms apply to alcohol and benzodiazepines.

Concluding remarks

The tVTA-RMTg continuum is a reticular brain region that was recently identified in the rat [4] and which has since been described in other species [18,25]. Starting within the posterior VTA, and extending over 1 mm into the pons, this GABAergic structure exerts an inhibitory control over dopamine systems. tVTA connectivity designates this structure as a potential funnel/hub, integrating multimodal informative signals to influence dopamine systems. The tVTA brake on these systems has both tonic and phasic influences, and functional studies have already highlighted the role of the tVTA in prediction error, freezing behaviors, psychostimulant-induced plasticity, and opiate control of dopaminergic activity. However, the description of this brain structure is recent, and research on tVTA function, particularly its influence on behavior (Box 1), is still in its infancy with many questions remaining to be addressed.

Disclaimer statement

M.B. has received lecture fees from Adir (Servier) and from Lilly France, research contractor funding from Missions-Cadres, and reports a CNRS-filed patent for new pain treatments. These activities are related to neuropathic pain research and are unrelated to tVTA research.

Acknowledgments

This work is supported by the CNRS (contract UPR3212) and by the Université de Strasbourg. The authors thank Prof. Marie-José Freund-

Mercier, Prof. Pierre Veinante, Luis Somoza, and Dr Nancy Grant for their advice on the manuscript.

References

- 1 Perrotti, L.I. *et al.* (2005) DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2817–2824
- 2 Kauffling, J. *et al.* (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 513, 597–621
- 3 Zhou, T.C. *et al.* (2009) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596
- 4 Barrot, M. and Thome, J. (2011) Discovering a new anatomical structure in the brain: implications for neuropsychiatry and therapy. *World J. Biol. Psychiatry* 12 (Suppl. 1), 19–22
- 5 Zhou, T.C. *et al.* (2009) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786–800
- 6 Kauffling, J. *et al.* (2010) Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol. Psychiatry* 67, 88–92
- 7 Bjorklund, A. and Dunnett, S.B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202
- 8 Cenci, M.A. (2007) Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci.* 30, 236–243
- 9 Fields, H.L. *et al.* (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 289–316
- 10 Schultz, W. (2007) Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 30, 203–210
- 11 Wise, R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483–494
- 12 Nestler, E.J. and Carlezon, W.A., Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151–1159
- 13 Marinelli, M. *et al.* (2006) Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 79–97
- 14 Grace, A.A. *et al.* (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* 30, 220–227
- 15 Morikawa, H. and Paladini, C.A. (2011) Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 198, 95–111
- 16 Henny, P. *et al.* (2012) Structural correlates of heterogeneous in vivo activity of midbrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 613–619
- 17 Johnson, S.W. and North, R.A. (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.* 12, 483–488
- 18 Hong, S. *et al.* (2011) Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J. Neurosci.* 31, 11457–11471
- 19 Jalabert, M. *et al.* (2011) Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16446–16450
- 20 Lecca, S. *et al.* (2011) Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36, 589–602
- 21 Lecca, S. *et al.* (2012) Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37, 1164–1176
- 22 Matsui, A. and Williams, J.T. (2011) Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* 31, 17729–17735
- 23 Kauffling, J. *et al.* (2010) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1677–1691
- 24 Zhou, T. (2005) Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J. Comp. Neurol.* 493, 111–114
- 25 Stamatakis, A.M. and Stuber, G.D. (2012) Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107

- 26 Scammell, T.E. *et al.* (2000) Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J. Neurosci.* 20, 8620–8628
- 27 Olson, V.G. and Nestler, E.J. (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61, 87–95
- 28 Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.* 56, 27–78
- 29 Paxinos, G. and Watson, C., eds (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th edn), Academic Press
- 30 Ferreira, J.G. *et al.* (2008) Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area–nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153, 196–213
- 31 Zhao-Shea, R. *et al.* (2011) Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 36, 1021–1032
- 32 Lavezzi, H.N. and Zahm, D.S. (2011) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia* 1, 191–200
- 33 Geisler, S. *et al.* (2008) Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33, 2688–2700
- 34 Balcita-Pedicino, J.J. *et al.* (2011) The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J. Comp. Neurol.* 519, 1143–1164
- 35 Colussi-Mas, J. *et al.* (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1011–1025
- 36 Zhou, T.C. *et al.* (2012) Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist Endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology* <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-012-2753-6>
- 37 Cohen, J.Y. *et al.* (2012) Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 482, 85–88
- 38 Tan, K.R. *et al.* (2012) GABA Neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* 73, 1173–1183
- 39 van Zessen, R. *et al.* (2012) Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron* 73, 1184–1194
- 40 Geisler, S. and Zahm, D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat–anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.* 490, 270–294
- 41 Goncalves, L. *et al.* (2012) Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 520, 1278–1300
- 42 Brinschwitz, K. *et al.* (2010) Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476
- 43 Rottlant, D. *et al.* (2010) The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience* 168, 691–705
- 44 Carlsson, A. *et al.* (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 237–260
- 45 Omelchenko, N. *et al.* (2009) Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1239–1250
- 46 Clements, J.R. and Grant, S. (1990) Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci. Lett.* 120, 70–73
- 47 Comoli, E. *et al.* (2003) A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat. Neurosci.* 6, 974–980
- 48 Bromberg-Martin, E.S. and Hikosaka, O. (2011) Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat. Neurosci.* 14, 1209–1216
- 49 Schultz, W. *et al.* (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593–1599
- 50 Roesch, M.R. *et al.* (2012) Surprise! Neural correlates of Pearce–Hall and Rescorla–Wagner coexist within the brain. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1190–1200
- 51 Bromberg-Martin, E.S. *et al.* (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68, 815–834
- 52 Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115
- 53 Gandhi, N.J. and Katnani, H.A. (2011) Motor functions of the superior colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 205–231
- 54 Shires, J. *et al.* (2010) Shedding new light on the role of the basal ganglia–superior colliculus pathway in eye movements. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 717–725
- 55 Devinsky, O. *et al.* (1995) Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 118, 279–306
- 56 Vogt, B.A. (2005) Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 533–544
- 57 Sheehan, T.P. *et al.* (2004) Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res. Rev.* 46, 71–117
- 58 Davis, M. *et al.* (2010) Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35, 105–135
- 59 Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat. Neurosci.* 12, 77–84
- 60 Sartorius, A. *et al.* (2010) Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol. Psychiatry* 67, e9–e11
- 61 Winter, C. *et al.* (2011) Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. *Behav. Brain Res.* 216, 463–465
- 62 Berton, O. *et al.* (2007) Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55, 289–300
- 63 McNally, G.P. *et al.* (2011) Placing prediction into the fear circuit. *Trends Neurosci.* 34, 283–292
- 64 Altier, N. and Stewart, J. (1998) Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 208–215
- 65 Li, B. *et al.* (2011) Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–539
- 66 Berthoud, H.R. and Munzberg, H. (2011) The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol. Behav.* 104, 29–39
- 67 van Dijk, G. *et al.* (2011) The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance. *Behav. Brain Res.* 221, 481–487
- 68 Stein, B.E. *et al.* (2009) The neural basis of multisensory integration in the midbrain: Its organization and maturation. *Hear. Res.* 258, 4–15
- 69 Lin, J.-S. *et al.* (2011) The waking brain: an update. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2499–2512
- 70 Tanji, J. and Hoshi, E. (2008) Role of the lateral prefrontal cortex in executive behavioral control. *Physiol. Rev.* 88, 37–57
- 71 Hikosaka, O. *et al.* (2008) Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J. Neurosci.* 28, 11825–11829
- 72 Holstege, G. (2009) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus and the emotional motor system: role in basic survival behavior. *J. Comp. Neurol.* 513, 559–565
- 73 Holstege, G. (1992) The emotional motor system. *Eur. J. Morphol.* 30, 67–79
- 74 Quirk, G.J. and Sotres-Bayon, F. (2009) Signaling aversive events in the midbrain: worse than expected. *Neuron* 61, 655–656
- 75 Zahm, D.S. *et al.* (2010) Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology* 35, 445–463
- 76 Cornish, J.L. *et al.* (2012) Regional c-Fos and FosB/DeltaFosB expression associated with chronic methamphetamine self-administration and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience* 206, 100–114
- 77 Pang, Y. *et al.* (1993) Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Mol. Brain Res.* 20, 162–170
- 78 Matta, S.G. *et al.* (2007) Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* 190, 269–319
- 79 Lavezzi, H.N. *et al.* (2011) Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculopontine tegmental

- nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct. Funct.* 217, 719–734
- 80 Lupica, C.R. *et al.* (2004) Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br. J. Pharmacol.* 143, 227–234
- 81 Robinson, T.E. and Berridge, K.C. (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 363, 3137–3146
- 82 Koob, G.F. and Le Moal, M. (2008) Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 363, 3113–3123
- 83 Dalley, J.W. *et al.* (2011) Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron* 69, 680–694
- 84 Riegel, A.C. and Kalivas, P.W. (2010) Lack of inhibition leads to abuse. *Nature* 463, 743–744
- 85 Morikawa, H. and Morrisett, R.A. (2010) Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. *Int. Rev. Neurobiol.* 91, 235–288
- 86 Herkenham, M. and Nauta, W.J. (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19–47

D- Objectifs de la thèse

Les travaux réalisés précédemment au sein de l'équipe d'accueil ont permis de caractériser la tVTA d'un point de vue neuroanatomique et la question de sa fonction s'est alors naturellement posée. L'objectif général de mon projet de thèse a été d'évaluer le rôle de la tVTA dans le contrôle des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques. Ce projet comporte 3 parties :

- La première partie de mon projet a été de déterminer quels sont les types de drogues pouvant recruter la tVTA d'un point de vue moléculaire sous forme de l'induction du facteur de transcription FosB/ Δ FosB. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une approche de pharmacologie *in vivo* suivie d'immunohistochimie. Les résultats de ces expériences ont donné lieu à un article publié dans le *british journal of pharmacology* (Kaufling et al., 2010b) et sont présentés dans la partie résultats du chapitre 1.

- La deuxième partie de mon projet a été d'évaluer le rôle de la tVTA dans le contrôle du système mésolimbique, et plus particulièrement dans la réponse des neurones dopaminergiques de la VTA à la morphine. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des approches de traçage de voies en neuroanatomie et d'électrophysiologie *in vivo* chez l'animal anesthésié. Les résultats de ces expériences ont donné lieu à un article publié en 2011 dans le journal *Proceedings in the National academy of Science U.S.A.* (Jalabert et al., 2011) et sont présentés dans la partie résultats du chapitre 2. Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. François Georges de l'université de Bordeaux.

- La troisième partie de mon projet a été d'étudier le rôle de la tVTA dans le contrôle du système nigrostrié. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé différentes approches techniques : le traçage de voies en neuroanatomie accompagné de microscopie électronique, l'électrophysiologie *in vivo* chez l'animal anesthésié et des tests d'évaluation du comportement moteur chez le rat. Les résultats de cette troisième partie ont été publiés en 2014 dans le journal *Neuropsychopharmacology* (Bourdy et al., 2014) et sont présentés dans la partie résultats du chapitre 3. Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec l'équipe du docteur François Georges de l'université de Bordeaux et celle du professeur Susan Sesack de l'université de Pittsburg.

Chapitre 1 :

Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure

Recrutement pharmacologique de la queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale par une exposition aiguë à des drogues

Jennifer Kaufling, Elisabeth Waltisperger, Romain Bourdy, Antoine Valera, Pierre Veinante, Marie-José Freund-Mercier et Michel Barrot

A- Contexte : Les protéines Fos

1- Structure des protéines Fos/interaction avec l'ADN

Les protéines Fos sont des facteurs de transcription qui régulent d'autres gènes impliqués dans des réponses adaptatives et de plasticité. La famille des protéines Fos comprend c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2 ainsi que Δ FosB, un variant d'épissage alternatif de FosB. Ces protéines sont codées par des gènes qualifiés d' "immediate early-genes" (IEGs) ou gènes à expression précoce. En effet, leur réponse à un stimulus est rapide, transitoire et stéréotypée avec un niveau d'ARNm et de protéine qui retourne à des taux basaux en quelques heures (McClung et al., 2004; Nestler, 2012)(Figure1). La réponse rapide et transitoire des protéines Fos à un stimulus dans les neurones post-mitotiques a conduit à l'utilisation, aujourd'hui très répandue, de leur expression comme un marqueur d'activation neuronale.

Il y a environ 20 ans, des protéines de la famille Fos appelées antigènes associés à Fos chroniques (chronic FRAs) ont été décrites (Morgan and Curran, 1995). Ces protéines de 35-37 kDA n'étaient pas ou peu observées en réponse à un stimulus ou un traitement aigu, mais induites à des taux importants après une exposition répétée au même stimulus ou traitement (Morgan and Curran, 1995; McClung et al., 2004) (Figure 1). De plus, il a été montré que ces protéines persistent dans le cerveau sur une longue période (plusieurs jours à plusieurs semaines) en comparaison avec les autres membres de la famille Fos qui ne persistent que quelques heures. Il a été montré plus tard que ces FRAs chroniques sont en fait des isoformes de Δ FosB, un variant d'épissage tronqué de FosB auquel il manque une séquence de 101 acides aminés à la partie C-terminale de la protéine totale (Nakabeppu and Nathans, 1991) (Figure 2). La stabilité des isoformes de Δ FosB a fourni un nouveau mécanisme moléculaire par lequel des modifications de l'expression génique peuvent persister pendant de longues périodes.

Les protéines de la famille Fos sont des facteurs de transcription de type "leucine zipper", littéralement "fermeture éclair à leucine". Il s'agit d'une structure protéique tridimensionnelle qui fonctionne comme un domaine de dimérisation facilitant leur association avec d'autres protéines appartenant à la famille Jun (c-Jun, JunB, JunD). Elles forment le groupe de protéines AP-1 ou complexe AP-1, qui après dimérisation se lie aux TRE ("TPA-responsive elements" TGAC/GTCA) également appelés sites AP-1 sur les régions promotrices et "enhancer" des gènes cibles (Morgan and Curran, 1995). L'expression des protéines Fos est donc essentielle pour l'activité des gènes régulés par le complexe AP-1 (Halazonetis et al., 1988; Ryseck and Bravo, 1991). Contrairement aux protéines de la famille Jun, les protéines Fos ne sont pas capables de former des homodimères, mais s'hétérodimérisent avec les protéines Jun, entraînant la formation de complexes trans-activateurs ou trans-répresseurs variés possédant des propriétés biochimiques différentes. Par exemple, les hétérodimères Jun-Fos sont plus stables et ont une liaison à l'ADN plus forte

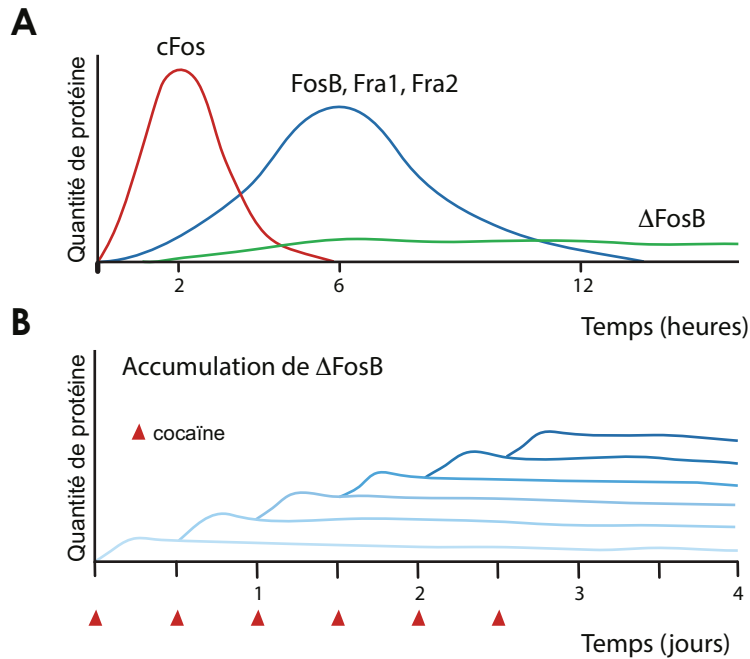


Figure 1 (adaptée de Nestler, 2008). Déroulement temporel de l'induction des protéines Fos. Figure 1A. Profil temporel de l'induction des protéines Fos en réponse à un stimulus aigu. Les protéines de la famille Fos sont induites spécifiquement dans des régions du cerveau en réponse à différents stimuli. Les réponses de ces protéines sont variables avec une induction rapide et transitoire et un pic d'induction quelques heures après le stimulus pour les protéines Fos à courte demi-vie (cFos, FosB, Fra-1 et Fra-2) et une induction des protéines ΔFosB qui persistent dans le cerveau sur une longue période grâce à une plus grande stabilité. **Figure 1B.** Induction des protéines ΔFosB en réponse à des injections répétées de cocaïne. Lors d'une répétition du stimulus (ici 2/jour), chaque stimulus est responsable d'une faible induction de la protéine ΔFosB qui s'accumule progressivement, formant des paliers réguliers.

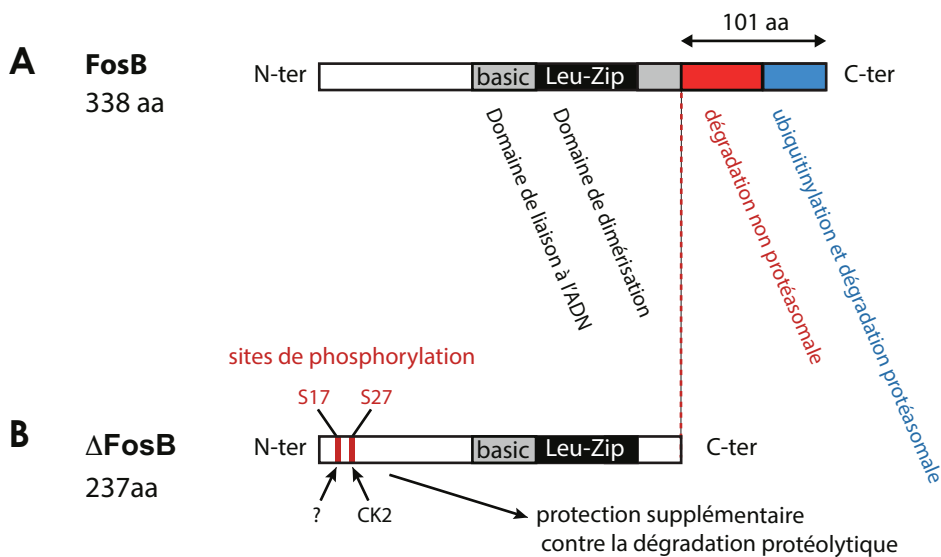


Figure 2 (adaptée de Nestler, 2008). Structure de FosB/ΔFosB et stabilité de ΔFosB. Les protéines FosB (2A) et ΔFosB (2B) sont encodées par le gène FosB. ΔFosB est un variant d'épissage alternatif de FosB de 237 acides aminés auquel il manque la partie C-terminale de 101 acides aminés présente dans la protéine FosB totale. La stabilité de ΔFosB peut être expliquée par 2 mécanismes : 1) il manque dans cette protéine 2 domaines de dégradation localisés dans la partie C-terminale de la protéine FosB totale et retrouvés dans les autres protéines de la famille Fos. L'un de ces domaines de dégradation marque la protéine FosB pour son ubiquitinylation et sa dégradation dans le protéasome et l'autre domaine de dégradation marque la protéine FosB pour une dégradation indépendante de l'ubiquitine et du protéasome (2A). 2) La protéine ΔFosB est phosphorylée par une caséine kinase 2 (CK2) et probablement d'autres protéines kinases (?) sur sa partie N-terminale, ce qui contribue également à stabiliser la protéine (2B).

que les homodimères Jun-Jun. L'activité des membres de la famille Fos est modulée par des phosphorylations par différentes protéines kinases comme : les MAP kinases (MAPK), cdc2, les protéines kinases C (PKC). Ces phosphorylations influencent la stabilité des protéines Fos, leur activité de liaison à l'ADN et leur potentiel de trans-activation des facteurs de transcription (Gruda et al., 1994; Hurd et al., 2002).

Bien que Δ FosB possède de nombreuses homologues avec les autres protéines de la famille Fos, des réponses très différentes sont observées avec cette protéine. Les isoformes de Δ FosB se dimérisent principalement avec les protéines JunD pour former un complexe AP-1 actif et perdurant dans le temps (Chen et al., 1997). La persistance des protéines Δ FosB dans les neurones peut s'expliquer par au moins deux facteurs :

- L'absence dans la protéine Δ FosB de 2 domaines "degron" localisés dans la partie C-terminale de la protéine FosB totale et de toutes les autres protéines de la famille Fos et qui cible ces protéines pour une dégradation rapide. L'absence de ces domaines protège la protéine Δ FosB d'une dégradation rapide (Figure 2).
- La phosphorylation de Δ FosB à sa partie N-terminale par la caséine kinase 2 et peut-être d'autres protéines kinases (Ulery et al., 2006; Carle et al., 2007). Cette phosphorylation a lieu sur des résidus sérines spécifiques et la suppression de ces sites déstabilise la protéine dans des cultures cellulaires (McClung et al., 2004) (Figure 2).

2- Induction de l'expression des protéines Fos

De nombreux messagers extracellulaires peuvent conduire à l'expression des protéines Fos. L'expression des gènes Fos peut être activée par les facteurs de croissance qui agissent sur les récepteurs tyrosine kinase, par les neuromodulateurs comme les monoamines qui agissent sur les récepteurs couplés aux protéines G, ou par l'activation de récepteurs canaux transmembranaires ligand- et voltage-dépendants (West et al., 2002) dont l'ouverture provoque une entrée massive de calcium.

Par exemple, dans le cas de l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G de type stimulatrice, l'adénylate cyclase augmente la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate). L'activation de protéines effectrices suite à cette augmentation d'AMPc peut *in fine* conduire à l'expression des protéines Fos. Dans certains cas, l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G n'est pas suffisante à cette expression et nécessite l'activation complémentaire des récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-aspartate) du glutamate (Berretta et al., 1992). Par exemple, dans le striatum, l'expression des protéines Fos en réponse à la morphine dépend à la fois de l'activation des récepteurs du glutamate de type NMDA et des récepteurs dopaminergiques D1 (Liu et al., 1994; Sharp et al., 1995). De plus, l'expression de Fos dans cette structure en réponse à la cocaïne est abolie ou diminuée lorsque les animaux sont respectivement traités avec un antagoniste des récepteurs D1 ou un antagoniste des récepteurs NMDA (Sun et al., 2008).

L'augmentation de l'AMPc intracellulaire en réponse à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G et l'entrée de calcium résultant de l'ouverture des canaux induisent via des protéines kinases la phosphorylation du facteur de transcription CREB (pour "cAMP response element binding protein") sur la Sérine 133 ainsi que le recrutement du co-activateur transcriptionnel CBP (pour "CREB-binding protein"). Le facteur de transcription CREB reconnaît les séquences CRE (pour "cAMP response element") localisées au niveau du promoteur des gènes *Fos*. L'augmentation de l'AMPc et du calcium intracellulaire lèvent également la répression exercée par certains facteurs comme DREAM (pour "downstream response element (DRE)-antagonist modulator") et induit des activateurs comme le SRF (pour "serum response factor"), qui fonctionne avec le facteur de transcription CREB pour permettre la transcription de *Fos* (West et al., 2002).

3- Mécanismes épigénétiques dans la régulation et l'action des protéines Fos

L'épigénétique concerne la modification de l'expression des gènes se produisant en l'absence de changements dans la séquence d'ADN. Les mécanismes épigénétiques contrôlent la condensation de l'ADN à l'intérieur du noyau via son interaction avec des protéines nucléaires qui ensemble forment la chromatine (Nestler, 2012). L'expression des gènes est régulée par cet état de condensation de l'ADN via des modifications de protéines appelées les histones. L'acétylation des histones a tendance à entraîner l'activation des gènes et leur méthylation peut entraîner une répression ou une activation en fonction du résidu lysine impliqué. La méthylation de l'ADN lui-même est généralement associée à une répression. Ces mécanismes épigénétiques sont impliqués aussi bien dans la régulation de l'expression des protéines Fos que dans leur action sur les gènes cibles.

Le contrôle de l'expression des gènes *Fos* dépend de modifications épigénétiques qui changent l'architecture de leur promoteur. La modification des histones par phosphorylation et acétylation contribue, de façon significative, à l'expression de *Fos*, en particulier la phosphorylation de l'histone H3S10, qui entraîne l'acétylation de l'histone H3K14 (Cheung et al., 2000). En réalité, c'est l'acétylation/désacétylation dynamique, plutôt qu'une augmentation statique des niveaux d'acétylation qui semble importante pour l'expression de *Fos*. Ce processus semble dépendant de la présence de l'histone H3K4 qui permet le turnover de l'acétylation des histones (Hazzalin and Mahadevan, 2005). Par exemple, il a été montré que l'acétylation des histones par la CBP jouait un rôle dans la sensibilité à la cocaïne en régulant l'expression du gène *FosB* et de son variant d'épissage Δ *FosB* (Levine et al., 2005).

Les protéines Fos contrôlent également leurs gènes cibles via des mécanismes épigénétiques. Par exemple, la capacité de Δ *FosB* à induire le gène *Cdk5* et à réprimer le gène *C-Fos* repose sur sa capacité à recruter des protéines co-activatrices ou co-répressives régulant la structure de la chromatine. La capacité de Δ *FosB* à induire *Cdk5* est

ainsi liée au recrutement d'une histone acétyltransférase associé à un remodelage de la chromatine (Kumar et al., 2005). A l'opposé, la capacité de Δ FosB à réprimer le gène *C-Fos* est liée au recrutement d'une histone désacétylase et probablement d'autres protéines répressives comme l'histone méthyl-transférase (White and Brinckerhoff, 1995; Nestler, 2008; Maze et al., 2010).

4- Gènes cibles des protéines Fos

Les gènes régulés par les protéines Fos à courte demi-vie (*c-Fos*, *FosB*, *Fra-1* et *Fra-2*) comprennent des régulateurs importants dans l'invasion, les métastases, la prolifération et la survie cellulaire, dont des gènes associés à l'hypoxie et l'angiogénèse (Milde-Langosch, 2005). L'influence de ces protéines sur un promoteur dépend de nombreuses combinaisons possibles de dimères agissant sur le site AP-1 et de co-facteurs recrutés, ce qui rend les gènes cibles difficiles à identifier.

La protéine Δ FosB se dimérise principalement avec les protéines JunD, et un certain nombre de ses gènes cibles ont été identifiés, notamment dans le cadre de la dépendance aux drogues. Δ FosB peut fonctionner à la fois comme un activateur et un répresseur transcriptionnel (McClung et al., 2004). Ces effets opposés peuvent s'expliquer par le fait qu'une expression à court terme et faible de Δ FosB entraîne une inhibition de la transcription AP-1 alors qu'une expression à long terme et avec un niveau plus élevé de protéines entraîne une augmentation de la transcription AP-1 (McClung et al., 2004). Parmi les gènes régulés par Δ FosB *in vivo*, on trouve : *GluR2*, *NMDA1*, le gène codant la prodynorphine (*PDYN*), *Cdk5*, *NF- κ B* et *C-Fos*.

Δ FosB est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant certaines sous-unités des récepteurs du glutamate AMPA et NMDA (Nestler, 2004). Par exemple, concernant les récepteurs AMPA, la surexpression de Δ FosB est responsable de l'augmentation de l'expression de la sous-unité *GluR2* dans le NAc (Kelz et al., 1999). La présence de cette sous-unité dans le récepteur AMPA diminue leur conductance au calcium (Hollmann and Heinemann, 1994; Jonas and Burnashev, 1995).

Un autre gène cible de Δ FosB est *PDYN* codant la prodynorphine, un peptide dont le clivage est à l'origine du peptide opioïde dynorphine. *PDYN* contient des sites de type AP-1 pouvant lier les complexes AP-1 contenant Δ FosB. L'expression de Δ FosB dans le striatum à lieu préférentiellement dans les neurones produisant ce peptide et une surexpression de Δ FosB diminue l'expression de la dynorphine dans les régions striatales (McClung et al., 2004).

Δ FosB active la transcription de *Cdk5* (pour "cyclin dependent kinase-5") en se liant à un site AP-1 localisé sur son promoteur (Chen et al., 2000). L'expression de ce gène a été associée à l'augmentation de la densité des épines dendritiques dans le NAc en réponse à des injections chroniques de cocaïne (Norrholm et al., 2003).

Une autre cible de Δ FosB est *NF κ B*. Ce gène est induit dans le NAc lorsque Δ FosB est surexprimé ou en réponse à un traitement chronique à la cocaïne (Ang et al., 2001).

Une caractéristique intéressante de Δ FosB est son effet répresseur sur le gène *C-fos*. Cette répression, exercée via des mécanismes épigénétiques, permet de passer de l'induction de protéines Fos possédant une demi-vie courte (après une exposition aiguë aux drogues) à une accumulation de Δ FosB (après une exposition chronique aux drogues) (Renthal et al., 2008).

5- Fonctions des protéines Fos

Les premières expériences sur les protéines Fos se sont concentrées sur leur rôle potentiel dans le contrôle du cycle cellulaire (Morgan and Curran, 1995). Ces protéines jouent en effet un rôle important dans la carcinogénèse et sont fréquemment retrouvées dans les cellules cancéreuses (Milde-Langosch, 2005; Ozanne et al., 2006). Elles sont aussi impliquées dans la différenciation et la survie cellulaire. Les recherches sur leur expression dans des neurones post-mitotiques ont conduit à l'utilisation aujourd'hui très répandue de l'expression des protéines Fos comme marqueurs d'activation neuronale (Morgan and Curran, 1995). Bien que ce ne soit pas systématiquement le cas, le niveau d'expression des protéines Fos est fréquemment corrélé à l'activité électrophysiologique des neurones via l'entrée de calcium dans la cellule (Sheng et al., 1990; West et al., 2002) (Fig 3). L'induction moléculaire rapide des protéines Fos reflétant une activité neuronale a permis d'établir des liens entre des ensembles de structures cérébrales (systèmes) et leurs fonctions potentielles (anatomie fonctionnelle). L'induction des protéines Fos dans différentes régions cérébrales en réponse à un stimulus peut ainsi être utilisée comme un système d'imagerie reflétant l'activation moléculaire des structures à un instant donné (Colussi-Mas et al., 2007; Rotllant et al., 2010).

Les protéines Fos sont exprimées dans différentes régions du cerveau et du système nerveux en réponse à des stimuli pharmacologiques et non pharmacologiques : les drogues à fort potentiel addictogène (Hope et al., 1994b; Pich et al., 1997; Perrotti et al., 2008), les antagonistes des récepteurs NMDA (de Olmos et al., 2009), les antipsychotiques (Hiroi and Graybiel, 1996), les antidépresseurs (Hope et al., 1994b), les crises d'épilepsie (Hope et al., 1994a), le stress (Perrotti et al., 2004; Berton et al., 2007), l'ischémie (McGahan et al., 1998), les douleurs inflammatoires (Luis-Delgado et al., 2006), les récompenses naturelles (Wallace et al., 2008)... La stabilité inhabituelle de Δ FosB en comparaison avec les autres protéines de la famille Fos pourrait contribuer au rôle de cette protéine dans les changements adaptatifs associés à différentes conditions comme la dépendance aux drogues, la maladie de Parkinson, la dépression et les traitements aux antidépresseurs (McClung et al., 2004).

En ce qui concerne les drogues addictives, l'induction des protéines Fos a été observée en réponse à la cocaïne (Hope et al., 1994b), la D-amphétamine (Saint Marie et al., 2006; Conversi et al., 2008), la méthamphétamine (Cornish et al., 2012), la nicotine (Pitchers et al., 2010), la morphine, l'éthanol et le Δ 9-tétrahydrocannabinol (THC) (Perrotti et al., 2008). Cette induction a été observée principalement dans le NAC et le striatum dorsal

même si de plus faibles niveaux d'induction sont présents dans d'autres régions comme le cortex préfrontal et l'amygdale (Nestler, 2004). L'expression de Δ FosB dans le NAc en réponse aux drogues semble liée aux propriétés pharmacologiques de ces drogues plutôt qu'au mode d'administration, car les animaux s'auto-administrant de la cocaïne présentent une induction similaire à ceux ayant reçu des injections passives (Perrotti et al., 2008). Au contraire, l'induction de Δ FosB dans d'autres régions comme par exemple le cortex orbitofrontal nécessitent une administration volontaire de drogue (Winstanley et al., 2007). De nombreuses données concernant la fonction potentielle de Δ FosB dans les effets comportementaux des drogues addictives proviennent de l'utilisation de souris génétiquement modifiées exprimant Δ FosB uniquement dans les neurones du striatum (Kelz et al., 1999; Werme et al., 2002). Ces souris présentent une augmentation de la sensibilité locomotrice à la cocaïne, une augmentation de la préférence pour la cocaïne et la morphine dans le test de préférence de place conditionnée (Kelz et al., 1999), une augmentation de l'auto-administration de cocaïne à faible dose et une augmentation de la motivation pour la consommation de cocaïne dans un protocole de ratio progressif (Colby et al., 2003). Concernant la morphine, les animaux surexprimant Δ FosB dans le complexe striatal présentent une diminution de la réponse analgésique et une augmentation de la dépendance physique (Zachariou et al., 2003). Δ FosB semble augmenter les effets motivationnels des drogues ce qui peut conduire à une augmentation du risque de rechute, même après une période prolongée de sevrage.

Les récompenses naturelles sont aussi responsables de l'expression de Δ FosB dans les neurones du NAc (Wallace et al., 2008). Cette induction a été observée en réponse à une activité importante de course dans une roue (Un stimulus récompensant pour les rongeurs) (Werme et al., 2002; Greenwood et al., 2011), après une consommation chronique de saccharose, de nourriture enrichie en graisse, ou des relations sexuelles (Teegarden and Bale, 2007; Teegarden et al., 2008; Wallace et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, la surexpression de Δ FosB dans le NAc est responsable d'une augmentation de la consommation de récompenses naturelles comme la course compulsive dans une roue (Werme et al., 2002) et la motivation pour le saccharose (Olausson et al., 2006).

Les protéines Fos sont induites par des molécules utilisées dans le traitement de la maladie de Parkinson et de la schizophrénie, deux maladies ayant une composante dopaminergique. Les protéines Fos sont augmentées dans le striatum dorsal en réponse à une dénervation dopaminergique striatale suivie d'injections répétées de L-DOPA (Hope et al., 1994b; Pérez-Otaño et al., 1998). La sévérité des dyskinésies chez des modèles animaux de la maladie de Parkinson est corrélée avec le niveau d'induction de Δ FosB dans le striatum dorsal, et ces dyskinésies sont diminuées par l'administration d'oligonucléotides anti-sens contre Δ FosB (Pérez-Otaño et al., 1998). Une étude récente a montré que l'inactivation sélective des neurones striataux exprimant FosB/ Δ FosB supprimait les dyskinésies induites par la L-DOPA (Engeln et al., 2014). L'halopéridol, un antipsychotique typique bloquant les récepteurs dopaminergiques centraux, entraîne une induction des protéines Fos principalement dans le NAc et le striatum dorsal et dans une moindre mesure dans les régions corticales frontales (Hiroi and Graybiel, 1996; Atkins et al., 1999). Les antipsychotiques de seconde génération comme la clozapine, la rispéridone et

Stimuli pharmacologiques

stimulus	protéine	induction	administration	dose	référence
cocaïne	FosB/ Δ FosB	oui	aiguë intra-péritonéale	20 mg/kg	Kauffling et al., 2009, 2010
	FosB/ Δ FosB	oui	auto-administration	0,5 mg/kg/inj ; 4h/jour ; 5 jours	Perrotti et al., 2005
	FosB/ Δ FosB	oui	chronique intra-péritonéale	15 mg/kg ; 2 inj/jour ; 14j	Perrotti et al., 2005
	c-Fos	oui	auto-administration	0,5 mg/kg/inj ; 2h/jour ; 6 jours	Geisler et al., 2008
	c-Fos	oui	chronique intra-veineuse	0,5 mg/kg/inj ; 2h/jour ; 6 jours	Geisler et al., 2008
	c-Fos	oui	auto-administration	0,5 mg/kg/inj ; 2h/jour ; 1 et 6 jours	Zahm et al., 2010
	c-Fos	oui	auto-administration	0,5 mg/kg/inj ; 2h/jour ; 1 et 6 jours	Jhou et al., 2009
D-amphétamine	FosB/ Δ FosB	oui	chronique intra-péritonéale	4 mg/kg ; 1/jour ; 4 jours	Perrotti et al., 2005
	c-Fos	oui	aiguë intra-péritonéale	1,5; 5 mg/kg	Rotlland et al., 2010
	c-Fos	oui	aiguë intra-péritonéale	5 mg/kg	Colussi-Mas et al., 2007
methamphétamine	c-Fos	oui	aiguë intra-péritonéale	10 mg/kg	Jhou et al., 2009
modafinil	c-Fos	oui	aiguë intra-péritonéale	75, 150 mg/kg	Scammel et al., 2000
GBR-12909	FosB/ Δ FosB	oui	chronique intra-péritonéale	20 mg/kg ; 2/jour ; 7 jours	Perrotti et al., 2005
nortriptyline	FosB/ Δ FosB	non	chronique intra-péritonéale	15 mg/kg ; 2/jour ; 7 jours	Perrotti et al., 2005
fluoxétine	FosB/ Δ FosB	non	chronique intra-péritonéale	10 mg/kg ; 2/jour ; 7 jours	Perrotti et al., 2006
morphine	FosB/ Δ FosB	non	chronique, sous-cutanée	dose croissante ; 2/jour ; 10 jours	Perrotti et al., 2007
morphine	FosB/ Δ FosB	non	granule	granule 75 mg ; 1/jour ; 5 jours	Perrotti et al., 2008

Stimuli aversifs et stressants

stimulus	protéine	induction	caractéristiques	références
Chocs électriques	cFos	oui	4X ; 0,5 mA ; 0,5s	Jhou et al., 2009
Son associé aux chocs	cFos	oui	20s ; 1 kHz, 55 dB	Jhou et al., 2009
Privation alimentaire	cFos	oui	diminution de 15 % de la masse corporelle	Jhou et al., 2009
stress de contention répété	FosB/ Δ FosB	non	1h/jour ; 10 jours	Perrotti et al., 2005

Tableau. Stimuli responsables de l'induction des protéines Fos dans la tVTA.

Les données représentées correspondent aux travaux publiés jusqu'à l'année 2010.

l'olanzapine entraînent une induction dans le cortex frontal. D'un point de vue fonctionnel, la capacité de nombreux antipsychotiques à induire des dyskinésies est fortement corrélée à leur capacité à induire Δ FosB dans le striatum dorsal après une administration chronique (Atkins et al., 1999).

L'expression des protéines Fos est induite par divers stress aigus ou chroniques comme le stress de contention, le stress imprévisible ou les chocs électriques aux pattes. Cette induction se produit dans diverses structures cérébrales dont le cortex préfrontal, le NAc, l'amygdale, le noyau septal et le locus coeruleus (Perrotti et al., 2004). Diverses études ont montré que l'induction de Δ FosB avait un rôle protecteur vis à vis des conséquences de stress chroniques souvent utilisés pour modéliser la dépression. Les antidépresseurs sont responsables de l'expression de Δ FosB principalement dans le cortex et l'hippocampe lorsqu'ils sont administrés de manière chronique (Hope et al., 1994b). Chez la souris, l'induction de Δ FosB dans le NAc est impliquée dans les mécanismes de résilience, c'est-à-dire les mécanismes permettant à un individu d'échapper aux effets délétères du stress (Vialou et al., 2010; Donahue et al., 2014). Par ailleurs, l'induction de Δ FosB est nécessaire pour que la fluoxétine, un antidépresseur, diminue les conséquences comportementales d'un stress de défaite sociale chronique (Vialou et al., 2010). Des animaux exposés de manière répétée à un stress auquel ils ne peuvent échapper (un modèle animal de dépression) présentent une induction de Δ FosB dans la substance grise périaqueducule ventrolatérale, avec une induction plus importante chez les animaux les plus résilients. L'expression de Δ FosB dans la substance grise périaqueducule a pour conséquence de réduire les comportements de type dépressif (Berton et al., 2007). A l'inverse, les souris KO pour le gène *FosB* présentent un phénotype dépressif (Yutsudo et al., 2013).

6- Stimuli responsables de l'induction de protéines de la famille Fos dans la tVTA (Tableau)

Ces dernières années, les études sur la tVTA ont montré que cette région cérébrale pouvait être activée d'un point de vue moléculaire sous forme de l'induction de facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines Fos en réponse à des stimuli pharmacologiques ou sensoriels.

Les protéines de la famille Fos : cFos, FosB et Δ FosB sont exprimées par les neurones de la tVTA suite à des injections aiguës ou répétées de psychostimulants de manière passive ou active (auto-administration). L'auto-administration de cocaïne induit l'expression de FosB/ Δ FosB (Perrotti et al., 2005) et c-Fos (Geisler et al., 2008; Jhou et al., 2009b; Zahm et al., 2010) dans la tVTA. Cette induction est également observée en réponse à des injections passives aiguës (Kauffling et al., 2009) et chroniques (Perrotti et al., 2005; Geisler et al., 2008). La D-amphétamine et la méthamphétamine augmentent respectivement l'expression des protéines FosB/ Δ FosB et c-Fos dans les neurones de la tVTA en réponse à des injections aiguës (Colussi-Mas et al., 2007; Jhou et al., 2009b; Rotllant et al., 2010) ou chroniques

(Perrotti et al., 2005). Une injection aiguë de nicotine serait responsable d'une induction des protéines c-Fos dans une région semblant correspondre à la tVTA (Pang et al., 1993). Un autre psychostimulant non addictif, le modafinil, est responsable de l'expression de c-Fos dans la région de la tVTA lorsque il est injecté à forte dose (Scammell et al., 2000).

L'activation moléculaire de la tVTA sous forme de l'induction des protéines Fos a également été observée en réponse à des stimuli sensoriels aversifs conditionnés et non conditionnés. Des rats ayant reçu des chocs électriques aux pattes ou ayant été exposés à un stimulus prédisant ces chocs présentent une augmentation de l'expression de c-Fos dans les neurones de la partie centrale de la tVTA projetant à la VTA. Cette induction a été associée à l'aspect aversif des stimuli (Jhou et al., 2009a). Une privation de nourriture conduisant à une diminution de 15% de la masse corporelle des rats pourrait également augmenter l'expression de c-Fos dans les neurones de la partie centrale de la tVTA (Jhou et al., 2009a), mais les recherches récentes réalisées au sein de l'équipe n'aboutissent pas aux mêmes conclusions (non publié).

B- Objectifs

L'identification des stimuli capables d'induire l'expression de FosB/ Δ FosB dans une structure cérébrale peut constituer un bon indice des implications fonctionnelles potentielles de cette structure. Dans cet article, nous avons testé des drogues de différentes classes : psychostimulants, sédatifs, dissociatifs, anticonvulsivants, inhibiteurs de recapture des monoamines pour leur capacité à induire FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA. Parmi ces molécules, ont trouvé des drogues à fort potentiel addictogène consommées pour un usage récréatif et/ou des drogues fréquemment utilisées en clinique en tant qu'anesthésiques, analgésiques, antiépileptiques et antidépresseurs.

C- Méthodes

Pour étudier l'expression de FosB/ Δ FosB par les neurones de la tVTA en réponse aux drogues, nous avons utilisé une approche d'immunohistochimie succédant à une administration systémique de drogue chez le rat adulte. Des doubles marquages en fluorescence ont été utilisés pour déterminer le type neurochimique (dopaminergique ou GABAergique) des neurones impliqués dans cette induction.

D- Résultats

L'injection aiguë des psychostimulants cocaïne, D-amphétamine, (+/-)-3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA), méthylphénidate et caféine, ont entraîné l'expression de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA. L'injection de drogues appartenant à d'autres classes comme les sédatifs (éthanol, diazépam, acide gammahydroxybutyrique (GHB), morphine), les dissociatifs (kétamine, phencyclidine (PCP), Δ 9-tétrahydrocannabinol (THC)), les anticonvulsivants (acide valproïque et gabapentine) n'ont pas entraîné d'induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA. Parmi les inhibiteurs de recapture des monoamines testés, seul le GBR12909, un inhibiteur de recapture de la dopamine a provoqué une augmentation de l'expression du facteur de transcription. Aucune induction de FosB/ Δ FosB n'a été observée suite à l'administration de l'antidépresseur inhibiteur de recapture noradrénergique réboxétine, de l'antidépresseur tricyclique nortriptyline, de l'antidépresseur inhibiteur de recapture sérotonergique fluoxétine, de l'antidépresseur inhibiteur sélectif de recaptures sérotonergique et noradrénergique venlafaxine ou du "releaser" de sérotonine dexfenfluramine. Ces résultats indiquent que l'induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA est dépendante de la dopamine. Une analyse du décours temporel de l'expression de FosB/ Δ FosB par les neurones de la tVTA en réponse à la cocaïne a montré une induction rapide, dans les 30 minutes, et prolongée. Ainsi, les noyaux marqués sont toujours présents 96 heures après l'injection, suggérant la présence à long terme du variant d'épissage Δ FosB suite à une injection aiguë de la drogue.

Ces résultats indiquent que l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA est une caractéristique commune des drogues partageant des propriétés psychostimulantes plutôt qu'un risque d'abus.

E- Contribution

Lorsque je suis arrivé au laboratoire en 2008 pour y réaliser un stage volontaire d'été en première année de Master, la doctorante de Michel Barrot, Jennifer Kauffling était en train de réaliser les expériences nécessaires pour cet article après avoir étudié la connectivité de la tVTA. J'ai alors eu l'occasion d'apprendre la technique d'immunohistochimie en réalisant quelques immuno-détections de FosB/ Δ FosB sur des cerveaux de rats ayant reçu des injections de psychostimulants (Fig1 de l'article).

Au début de ma thèse en 2010, l'article a été envoyé au "*British Journal of Pharmacology*". Les membres du comité de lecture nous ont demandé de réaliser des expériences complémentaires : un comptage des noyaux FosB/ Δ FosB dans la tVTA chez les animaux testés pour des drogues n'induisant pas FosB/ Δ FosB (Figures 5, 6 de l'article ; Figure S5 de l'article), une dose réponse à la cocaïne et la caféine (Figure 3 C,D de l'article ;

Figure S2 de l'article ; Fig S3 de l'article) et le décours temporel de l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA en réponse à une injection de cocaïne (Figure 3B de l'article). J'ai alors réalisé la majorité des expériences, des analyses et des figures demandées.

F- Article: Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure

Recrutement pharmacologique de la queue GABAergique de l'aire tegmentale Ventrale par une exposition aiguë à des drogues

Jennifer Kaufling, Elisabeth Waltisperger, Romain Bourdy, Antoine Valera, Pierre Veinante, Marie-José Freund-Mercier et Michel Barrot

2010 The British Pharmacological society

DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00984.x www.bjpharmacol.org

British Journal of Pharmacology (2010) 161 1677-1691

Numéro de licence (John Wiley and sons) : 3767500540247

RESEARCH PAPER

Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure

Jennifer Kaufling^{1,2}, Elisabeth Waltisperger¹, Romain Bourdy^{1,2}, Antoine Valera², Pierre Veinante^{1,2}, Marie-José Freund-Mercier^{1,2} and Michel Barrot¹

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France, and ²Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence

Dr Michel Barrot, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr

Keywords

psychostimulant; DeltaFosB; VTA; dopamine; GABA; tVTA; RMTg

Received

3 February 2010

Revised

2 July 2010

Accepted

11 July 2010

BACKGROUND AND PURPOSE

The tail of the ventral tegmental area (tVTA), also called the rostromedial tegmental nucleus, is a newly defined brain structure and a potential control centre for dopaminergic activity. It was identified by the induction of DeltaFosB following chronic cocaine exposure. In this work, we screened 20 drugs for their ability to induce FosB/DeltaFosB in the tVTA.

EXPERIMENTAL APPROACH

Immunohistochemistry following systemic drug administration was used to study FosB/DeltaFosB induction in the tVTA of adult rats. Double-staining was used to determine whether dopamine or GABA neurones are involved in this induction.

KEY RESULTS

The acute injection of the psychostimulant drugs cocaine, D-amphetamine, (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylphenidate or caffeine, induced the expression of FosB/DeltaFosB in the tVTA GABAergic cells. No induction was observed following exposure to ethanol, diazepam, γ -hydroxybutyric acid (GHB), morphine, ketamine, phencyclidine (PCP), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), sodium valproic acid or gabapentin. To evaluate the role of monoamine transporters in the psychostimulant-induced expression of FosB/DeltaFosB, we tested the antidepressant drugs reboxetine, nortriptyline, fluoxetine and venlafaxine (which target the noradrenaline and/or the 5-hydroxytryptamine transporters), the 5-hydroxytryptamine releasing agent dexfenfluramine, and the dopamine transporter inhibitor GBR12909. Only GBR12909 was able to induce FosB/DeltaFosB expression in the tVTA, showing that this induction is mediated by dopamine.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Newly described brain structures may help to increase our knowledge of brain function, pathology and targets for treatments. FosB/DeltaFosB induction in the tVTA is a common feature of drugs sharing psychostimulant properties but not of drugs sharing risk of abuse.

Abbreviations

DAT, dopamine transporter; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD, glutamic acid decarboxylase; GHB, γ -hydroxybutyric acid; i.p., intraperitoneal; MDMA, (\pm)-3,4-methylenedioxymethamphetamine; NET, noradrenaline transporter; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PCP, phencyclidine; RMTg, rostromedial tegmental nucleus; s.c., subcutaneous; SERT, 5-hydroxytryptamine transporter; TH, tyrosine hydroxylase; THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol; tVTA, tail of the VTA; VTA, ventral tegmental area

Introduction

Newly discovered brain structures may help to improve our knowledge of brain functions and of

brain disorders, and may provide new neuroanatomical targets for treatments. The tail of the ventral tegmental area (tVTA) is a recently defined structure (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009; 2010),

which was discovered simultaneously by different research groups. This region is of interest as it may be a potential control centre for the dopaminergic system (Jhou *et al.*, 2009b; Kauffling *et al.*, 2010). In the literature, it is mainly referred to either as the tVTA (Perrotti *et al.*, 2005; Kauffling *et al.*, 2009; 2010) or as the rostromedial tegmental nucleus (Jhou *et al.*, 2009a,b). However, parts of this structure can be found under various other names: 'retro-VTA' (Scammell *et al.*, 2000), 'Area 2' in the description of GABAergic cell clusters within the VTA (Olson and Nestler, 2007), 'ventral tegmental tail' (Ikemoto, 2007), 'interstitial nucleus of the decussation of the superior cerebellar peduncle' for its most caudal extent (Paxinos and Watson, 2007), 'rostromedial pontine tegmentum' (Geisler *et al.*, 2008) or 'caudal pole of the VTA' (Ferreira *et al.*, 2008).

The boundaries and the connections of the tVTA have been recently described (Jhou *et al.*, 2009a; Kauffling *et al.*, 2009; 2010) (Supporting Information Figure S1). The tVTA was initially revealed by the accumulation of the transcription factor Δ FosB, a stable truncated variant of FosB (Nestler *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2004), after chronic exposure to cocaine or amphetamine (Perrotti *et al.*, 2005). In its most rostral section, the tVTA is restricted to a bilateral sub-region, posterior to the VTA paranigral nucleus and dorsolateral to the interpeduncular nucleus (Kauffling *et al.*, 2009). As it progresses caudally, the tVTA shifts dorsally and slightly laterally and becomes embedded within the decussation of the superior cerebellar peduncle. Its inputs are mainly similar to those of VTA (Jhou *et al.*, 2009a; Kauffling *et al.*, 2009), but its outputs are more restricted (Supporting Information Figure S1). A notable feature of tVTA outputs is the presence of a dense projection to the mesencephalic dopamine cells (Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009a; Kauffling *et al.*, 2010). Because this tVTA output is mainly GABAergic (Kauffling *et al.*, 2010), the tVTA might be an inhibitory control centre for dopaminergic activity (Jhou *et al.*, 2009b; Kauffling *et al.*, 2010). As the dopaminergic system is involved in a wide variety of functions and pathologies (Le Moal and Simon, 1991; Iversen and Iversen, 2007), the tVTA is a structure of interest for fundamental and preclinical research.

One possible approach to study the function of a particular brain region is to look for stimuli that recruit this region. Hence, in the present work, we screened 20 different drugs for their ability to induce the expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA. We showed that only psychostimulant drugs were able to recruit these Fos proteins locally. This action affects tVTA GABAergic cells and is probably mediated through the recruitment of the dopaminergic

system as it was observed after treatment with the specific dopamine reuptake inhibitor GBR12909.

Methods

The nomenclature for drugs and for their molecular targets conforms to the *British Journal of Pharmacology Guide to Receptors and Channels* (Alexander *et al.*, 2009).

Animals

Animal care and procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/6609/EEC. The animal facilities are legally registered for animal housing and experimentation (veterinary Animal House Agreements B67-482-1 and C67-482-1). The scientists in charge of the experiments possess the French certificate authorizing experimentation on living animals, obtained from the government veterinary office. Male Sprague Dawley rats were used in all the experiments ($n = 130$ rats for all the studies, 280–340 g, Janvier, France), housed under standard conditions (22°C, lights on 07 h 00 min–19 h 00 min) with food and water available *ad libitum*.

Drug injections

Drug doses were chosen based on behavioural and/or molecular studies in rodents that are relevant to the related human use of these drugs. Drugs were injected i.p. or s.c. at the following doses: cocaine hydrochloride, 2.5, 5, 10, 20 or 40 mg·kg⁻¹ i.p. (Cooper, Melun, France); D-amphetamine sulphate, 1 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (Gruner *et al.*, 2009); (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine hydrochloride (MDMA), 5 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Stephenson *et al.*, 1999); methylphenidate hydrochloride, 10 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Gruner *et al.*, 2009); caffeine, 2.5, 10, 25, 60 or 100 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Deurveilher *et al.*, 2006); 1-(2-[bis-(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl)-4-(3-phenylpropyl) piperazine dihydrochloride (GBR12909), 15 mg·kg⁻¹ i.p. (Biotrend, Zurich, Switzerland) (Gruner *et al.*, 2009); ethanol (15% solution), 1.5 or 5 g·kg⁻¹ i.p. (Vilpoux *et al.*, 2009); diazepam, 1.5 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Chaouloff *et al.*, 1997); γ -hydroxybutyric acid sodium salt (GHB), 1 g·kg⁻¹ i.p. in a 2 mL·kg⁻¹ volume (Sigma-Aldrich) (Maitre, 1997); morphine sulphate, 10 or 50 mg·kg⁻¹ s.c. (Francopia, Paris, France); ketamine hydrochloride, 50 mg·kg⁻¹ i.p. (Centravet, Taden, France) (Tose *et al.*, 2009); phencyclidine hydrochloride (PCP), 3 or 10 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Castellani and Adams, 1981); Δ^9 -tetrahydrocannabinol solution

(THC) in 30% (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, 3 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Lepore *et al.*, 1995); sodium valproic acid, 20 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); gabapentin, 50 mg·kg⁻¹ i.p. (Teva Santé, Paris la Défense, France) (Pedersen and Blackburn-Munro, 2006); reboxetine mesylate, 0.8 mg·kg⁻¹ i.p. (Edronax®, Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Germany) (Yalcin *et al.*, 2009); nortriptyline hydrochloride, 15 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Beck, 1995); fluoxetine hydrochloride, 10 mg·kg⁻¹ i.p. (Biotrend) (Cryan *et al.*, 2005); venlafaxine hydrochloride, 5 mg·kg⁻¹ i.p. (Effexor®, Wyeth, Paris la Défense, France) (Millan *et al.*, 2001); S-(+)-fenfluramine hydrochloride (dexfenfluramine), 4 mg·kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich) (Vickers *et al.*, 1996). Unless otherwise indicated, the drugs were prepared in 0.9% NaCl and injected in a volume of 1 mL·kg⁻¹. For the three highest doses of caffeine, this drug was injected using a 20 mg·mL⁻¹ solution due to limits of solubility. Control animals received an injection of 0.9% NaCl. As the tVTA is a brain region with no or very few FosB/ Δ FosB staining under basal conditions (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009; 2010), the induction of these transcription factors is easy to detect locally. It allowed us to use only three animals (triplicate) for most of the drugs tested.

Histochemistry

Three hours following the drug injection, the rats were perfused under deep chloral hydrate anaesthesia (800 mg·kg⁻¹; Sigma, St. Louis, MO, USA) with 100 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) followed by 500 mL of a paraformaldehyde solution (4% in phosphate buffer). Brains were removed and post-fixed overnight in the same fixative. Forty μ m mesencephalic sections were subsequently cut following the frontal plane on a vibratome (VT 1000S, Leica, Rueil-Malmaison, France). Sections were serially collected in phosphate buffer with 0.9% NaCl [phosphate-buffered saline (PBS)]. For the time course of cocaine response, perfusions were done 30 min and 1, 1.5, 3, 6, 24, 48 and 96 h post-injection.

Sections for immunohistochemistry were washed in PBS (3 \times 10 min), incubated 15 min in a 1% H₂O₂/50% ethanol solution if used for a peroxidase reaction, washed in PBS (3 \times 10 min) and incubated in PBS containing Triton X-100 and 5% donkey serum for 45 min. Sections were then incubated overnight at room temperature in PBS with Triton X-100, 1% donkey serum and the primary antibody(ies). Triton X-100 was used at 0.5%, except for glutamic acid decarboxylase (GAD) immunohistochemistry for which it was reduced to 0.2% to limit the background noise and facilitate identification of the cell body.

The rabbit anti-FosB polyclonal antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; catalogue number SC-48; 1:2000 for peroxidase reaction, 1:200 for immunofluorescence) was raised against an internal region of the transcription factor FosB (Santa-Cruz data sheet). It recognizes both FosB and its splice variant Δ FosB, but no other member of the Fos proteins (Perrotti *et al.*, 2004; 2005; Luis-Delgado *et al.*, 2006). The sheep anti-tyrosine hydroxylase (TH) polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA; catalog number AB1542; 1:1000) was raised against a sodium dodecyl sulphate-denatured TH from rat pheochromocytoma (Chemicon data sheet). The mouse anti-GAD 67 kDA monoclonal antibody (Chemicon, catalogue number MAB5406; 1:10 000) was raised against a recombinant fusion protein containing N-terminal regions of GAD 67 kDA not shared by GAD 65 kDA (Chemicon data sheet).

Sections for immunohistochemistry were washed in PBS (3 \times 10 min), incubated with a donkey Cy3 or FITC fluorophore-labelled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; 1:400) for 1 h 30 min, and washed in PBS (3 \times 10 min) before being mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections for the peroxidase reaction were washed in PBS (3 \times 10 min), incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences, Orsay, France; 1:200 in PBS containing Triton X-100, 1% donkey serum) for 1 h 30 min, washed in PBS (3 \times 10 min) and incubated with PBS containing the avidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) (ABC Elite, 0.2% A and 0.2% B; Vector Laboratories) for 1 h 30 min. After being washed in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.5; 3 \times 10 min), bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.0006% H₂O₂ (Sigma) in Tris-HCl buffer. Sections were incubated for approximately 10 min and washed again. Sections were serially mounted on gelatine-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, cleared in Roti-Histol (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany) and coverslipped with Eukitt.

Analysis and illustrations

Coded slides were used to analyse the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei throughout the tVTA. Blind counting was done using a Nikon Eclipse 80i microscope with the NeuroLucida® 8.0 software (MicroBrightField Inc., Williston, VT, USA). We counted the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei bilaterally in the tVTA, between -5.80 and -7.30 mm from the bregma, analysing a 40 μ m section every 160 μ m. Section drawings presenting the FosB/ Δ FosB signal were done using a microscope

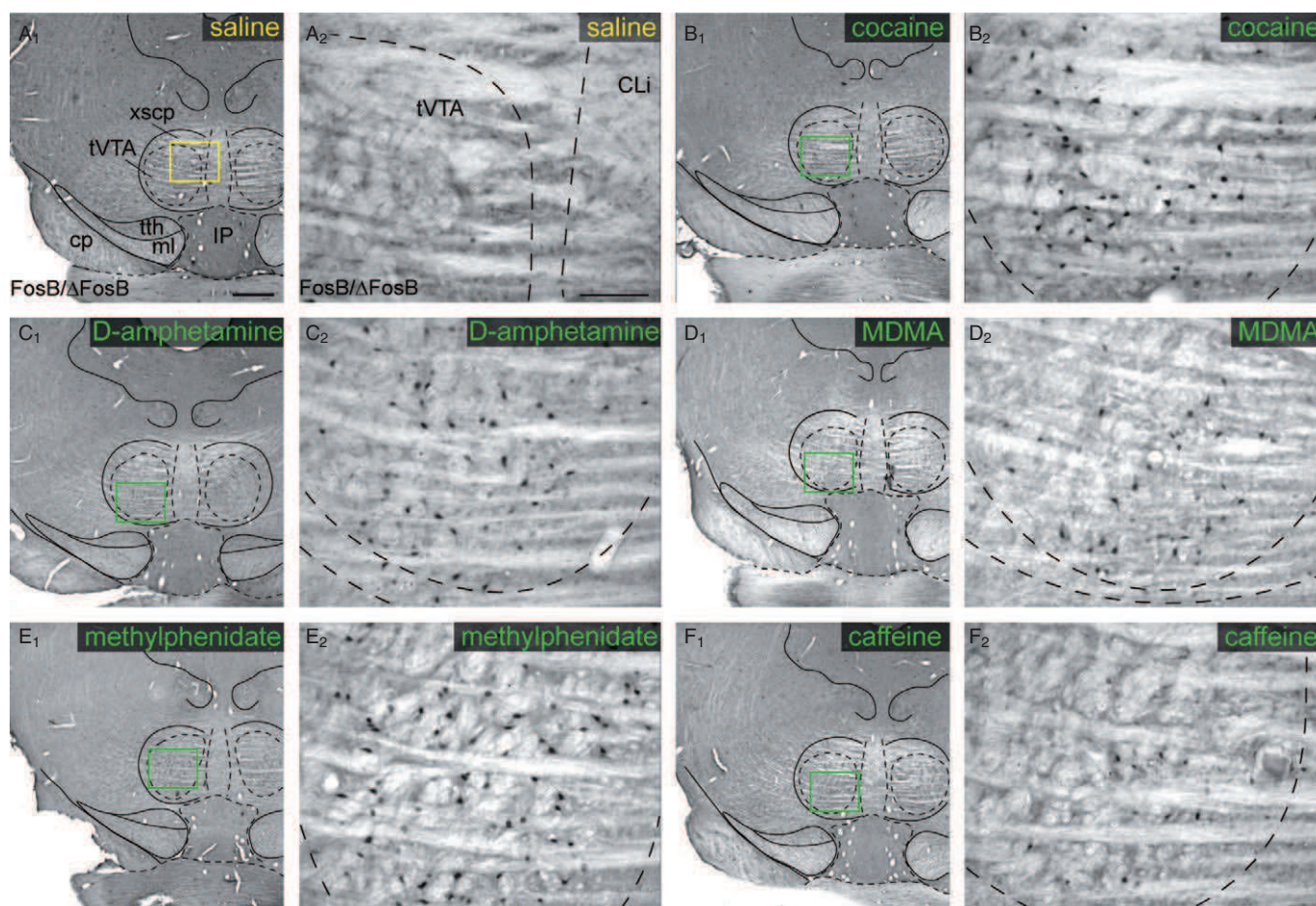


Figure 1

Psychostimulant drugs induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. Control saline injection had no effect on FosB/ Δ FosB in the tVTA (A). The acute injection of cocaine $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (B), D-amphetamine $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (C), MDMA $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (D), methylphenidate $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (E) or caffeine $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (F) induced FosB/ Δ FosB in the tVTA. The rats were perfused 3 h post-injection. $n = 3$ per group. Scale bars = $500 \mu\text{m}$ in A_1 (applies to B_1 – F_1); $100 \mu\text{m}$ in A_2 (applies to B_2 – F_2). The coloured squares in A_1 – F_1 indicate the regions shown at higher magnification in A_2 – F_2 . CLI, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation.

equipped with a *camera lucida* (Nikon Eclipse E600, Nikon Instruments, Kingston, UK). Data for FosB/ Δ FosB analysis are expressed as mean \pm SEM of positive nuclei per hemi-tVTA. Statistical analysis was performed with STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), using Student's *t*-test to compare the drug action with the control. The significance level was set at $P < 0.05$.

The analysis of double-labelling fluorescence was done on 3 to 6 frontal sections per animal using an epifluorescence microscope (Leica DMRD). Pictures were taken by using a microscope (Leica) with a digital camera (Cool-snap, Princeton, NJ, USA). Adobe Photoshop 7.0 was used to adjust contrast, brightness and sharpness. The colour channels were individually adjusted for the merged pictures. Abbreviations and structure limits are based on the

frontal diagrams from the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Results

Expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA by psychostimulant drugs

We previously reported that chronic exposure to cocaine induced the transcription factor Δ FosB in the tVTA (Perrotti *et al.*, 2005; Kauffling *et al.*, 2010) and we recently observed a similar induction with acute cocaine (Kauffling *et al.*, 2009; 2010). We thus used acute cocaine as a positive control for the present study. Few FosB/ Δ FosB-positive nuclei were observed in the tVTA following saline administration (Figure 1A), which is in agreement with previous

reports (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009). In contrast, acute injections of the psychostimulants cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate or caffeine resulted in a strong expression of the transcription factor FosB/ Δ FosB in the tVTA (Figure 1B–F). This induction was observed in each of the animals receiving the psychostimulant injection.

This bilateral induction started in the most posterior part of the VTA and the cluster of nuclear staining extended more caudally, shifting dorsally and slightly laterally to become embedded within the decussation of the superior cerebellar peduncle (Figures 2 and 3A). The overall quantification of this tVTA staining (Figure 2) and the quantification along the anteroposterior axis (Figure 3A) revealed that all the drugs induced FosB/ Δ FosB with a similar anteroposterior profile. The induction obtained with caffeine was significant but much lower than that observed with the other psychostimulants (Figures 2E and 3A).

A time-course analysis of the cocaine response (20 mg·kg⁻¹) revealed a rapid and long-lasting induction of FosB/ Δ FosB (Figures 3B and S2) ($F_{7,23} = 9.2$, $P < 0.00001$). This protein induction could be detected within 30 min post-injection (insert of Figure 3B, $P < 0.001$) and FosB/ Δ FosB was still present within the tVTA 4 days after cocaine exposure. The rapid induction and its peak at 3 h are in agreement with current knowledge regarding psychostimulant-induced FosB expression in other brain regions such as the nucleus accumbens (Nestler *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2004). These data confirmed this timepoint as adequate for our experiments. The long-lasting effect suggests that stable variants of Δ FosB were also locally expressed (Nestler *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2004; Perrotti *et al.*, 2005). No induction of FosB/ Δ FosB was observed over time after saline injection ($F_{2,6} = 0.6$, $P > 0.5$).

The expression of FosB/ Δ FosB induced by both cocaine and caffeine was dose dependent (cocaine: $F_{5,12} = 43.7$, $P < 0.00001$; Figures 3C and S3) (caffeine: $F_{5,12} = 11.4$, $P < 0.001$; Figures 3D and S3). For cocaine, the maximal effect was reached with 20 mg·kg⁻¹. For caffeine, it increased up to the highest tested dose, 100 mg·kg⁻¹. Even at this high dose of caffeine, the induction of FosB/ Δ FosB remained much smaller than that observed with the psychostimulant drugs that directly target amine uptake sites (Figures 2 and 3C,D).

The double-labelling by immunofluorescence (Figures 4 and S4) revealed that FosB/ Δ FosB induced by the acute injection of these psychostimulants was in each case almost always present in the GABAergic neurones (98–100% depending on the

drug, Figure 4G₂), with no detectable expression in dopaminergic neurones (Figure 4G₁).

Lack of expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA after exposure to other drugs

Drugs stimulating GABAergic transmission were unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. This lack of induction was observed with ethanol (Figures 5A and S5A); with the anxiolytic drug diazepam (Figure 5B), an agonist with allosteric activity at the benzodiazepine site on GABA_A receptors; and with GHB (Figure 5C), a GABA metabolite acting through both its own receptors and GABA receptors, predominantly GABA_B (Carter *et al.*, 2009). The opiate analgesic and drug of abuse morphine (Figures 5D and S5B), an agonist of opioid receptors, was also unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. Dissociative drugs that primarily act through NMDA antagonism, such as the anaesthetic ketamine (Figure 5E) and PCP (Figures 5F and S5C) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The cannabinoid agonist THC (Figure 5G) also had no effect on FosB/ Δ FosB expression in the tVTA. All these drugs are however liable to induce drug abuse.

Lastly, the anticonvulsant drug valproic acid (Figure 5H) which inhibits histone deacetylases and also favours GABA transmission through an indirect mechanism, and the anticonvulsant drug gabapentin (Figure 5I), which binds the $\alpha_2\text{-}\delta$ protein subunits of voltage-gated calcium channels (Ca_v $\alpha_2\text{-}\delta$), were unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA.

The lack of FosB/ Δ FosB induction with all of the said drugs was quantified (Figure 5J).

Expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA by inhibition of the DAT

The most prominent induction of FosB/ Δ FosB in the tVTA was observed with psychostimulant drugs acting on monoamine transporters: cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate. To evaluate the role of the different monoamines in this induction, we tested inhibitors of the various transporters: dopamine transporter (DAT), noradrenaline transporter (NET) and/or 5-hydroxytryptamine transporter (SERT). The antidepressant drug reboxetine (Figure 6A), which is a specific NET inhibitor, the tricyclic antidepressant drug nortriptyline (Figure 6B), a NET/SERT inhibitor with a predominant NET action, the antidepressant drug fluoxetine (Figure 6C), a SERT inhibitor, and the antidepressant drug venlafaxine (Figure 6D), a non-tricyclic NET/SERT inhibitor, were unable to induce the expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA. The anorexigenic drug dexfenfluramine (Figure 6E),

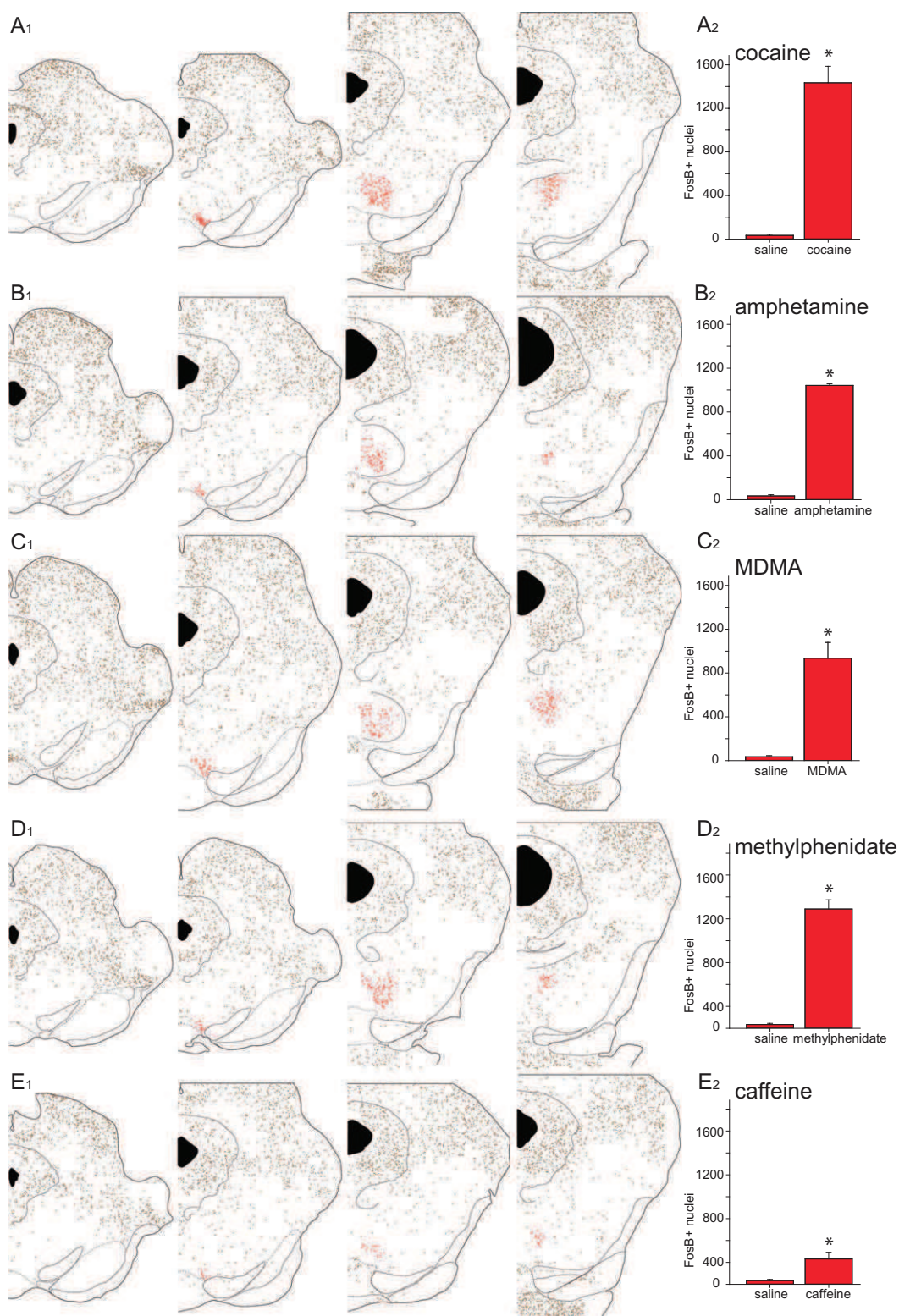


Figure 2

Quantification and *camera lucida* drawings of FosB/ΔFosB-positive nuclei in the tail of the ventral tegmental area (tVTA). The acute injection of cocaine 20 mg·kg⁻¹ (A), D-amphetamine 1 mg·kg⁻¹ (B), MDMA 5 mg·kg⁻¹ (C), methylphenidate 10 mg·kg⁻¹ (D) or caffeine 10 mg·kg⁻¹ (E) induced FosB/ΔFosB in the whole of the tVTA. For each drug, drawings are ordered from rostral to caudal. Each dot represents a positive nucleus for FosB/ΔFosB immunohistochemistry. The positive nuclei within tVTA are in red; the positive nuclei outside tVTA are in brown. The induction of FosB/ΔFosB is bilateral; for each drug, the total number of FosB/ΔFosB-positive nuclei per hemi-tVTA is presented as mean ± SEM; n = 3 per group. *P < 0.05, t-test against control data (saline).

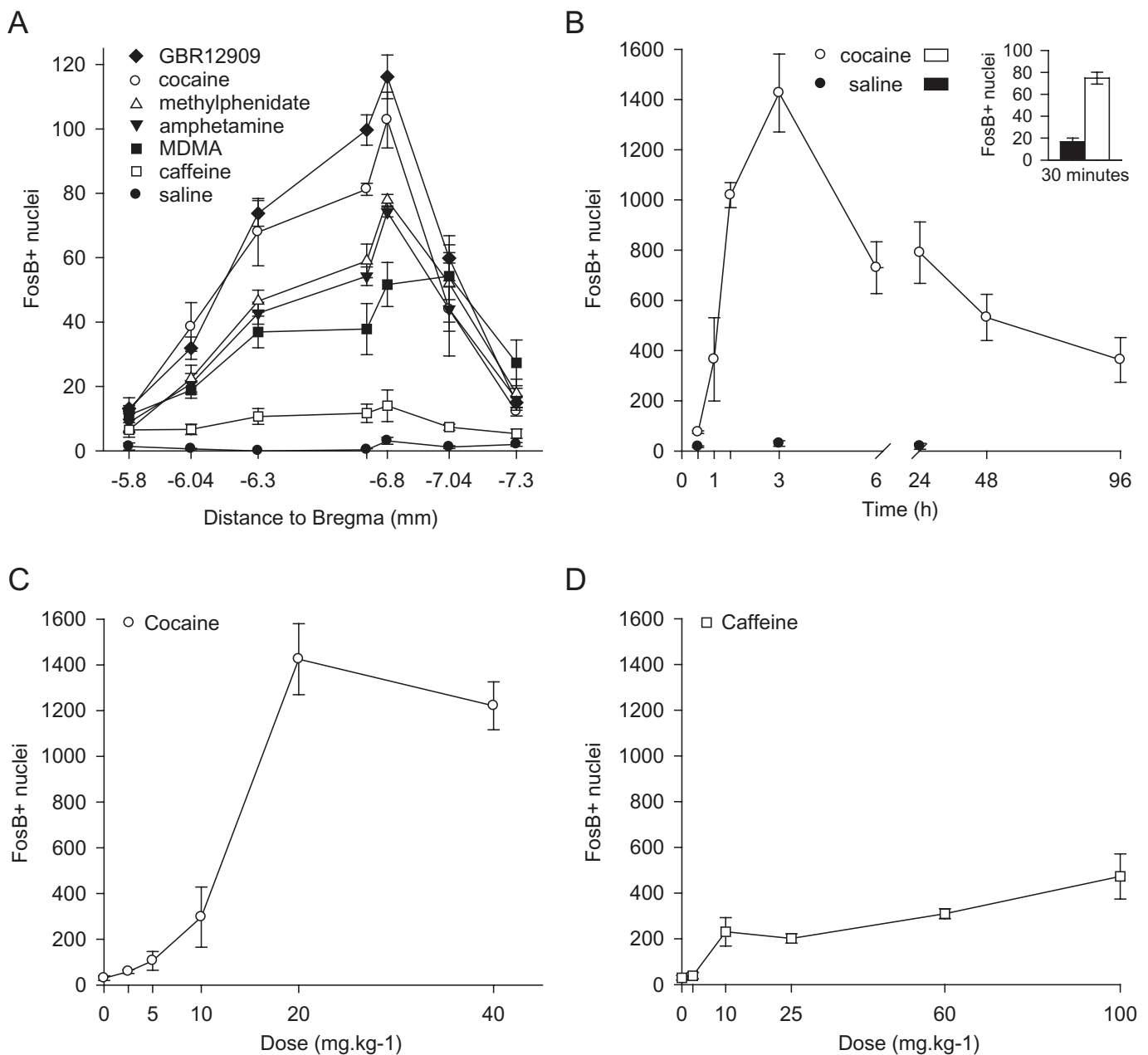


Figure 3

Quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei along the anteroposterior extent of the tail of the ventral tegmental area (tVTA) and dose-responses. (A) Rats received an acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹, D-amphetamine 1 mg.kg⁻¹, MDMA 5 mg.kg⁻¹, methylphenidate 10 mg.kg⁻¹, caffeine 10 mg.kg⁻¹, GBR12909 15 mg.kg⁻¹ or 0.9% NaCl (saline) as control. They were perfused 3 h post-injection. $n = 3$ per group. The mean number of FosB/ Δ FosB-nuclei is given per bregma level, according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). (B) Rats were perfused at various timepoints following an acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹ ($n = 3-5$ per timepoint). Data indicate the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole of the tVTA. The top right insert shows with a larger scale the increase in the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei at 30 min. Dose-responses to cocaine (C) or to caffeine (D) were done, perfusing the animals 3 h post-injection ($n = 3$ per dose).

which is a 5-hydroxytryptamine releasing agent, was also unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. In contrast, the DAT inhibitor GBR12909, at a dose that promotes an awake state (Gruner *et al.*, 2009), induced a strong expression of FosB/ Δ FosB in the

tVTA (Figures 3A and 6F,G). This induction of FosB/ Δ FosB following GBR12909 exposure displayed the same anteroposterior profile as the psychostimulant drugs (Figure 3A), and was also mainly present in GABAergic cells (98%, Figure 4F,G₂).

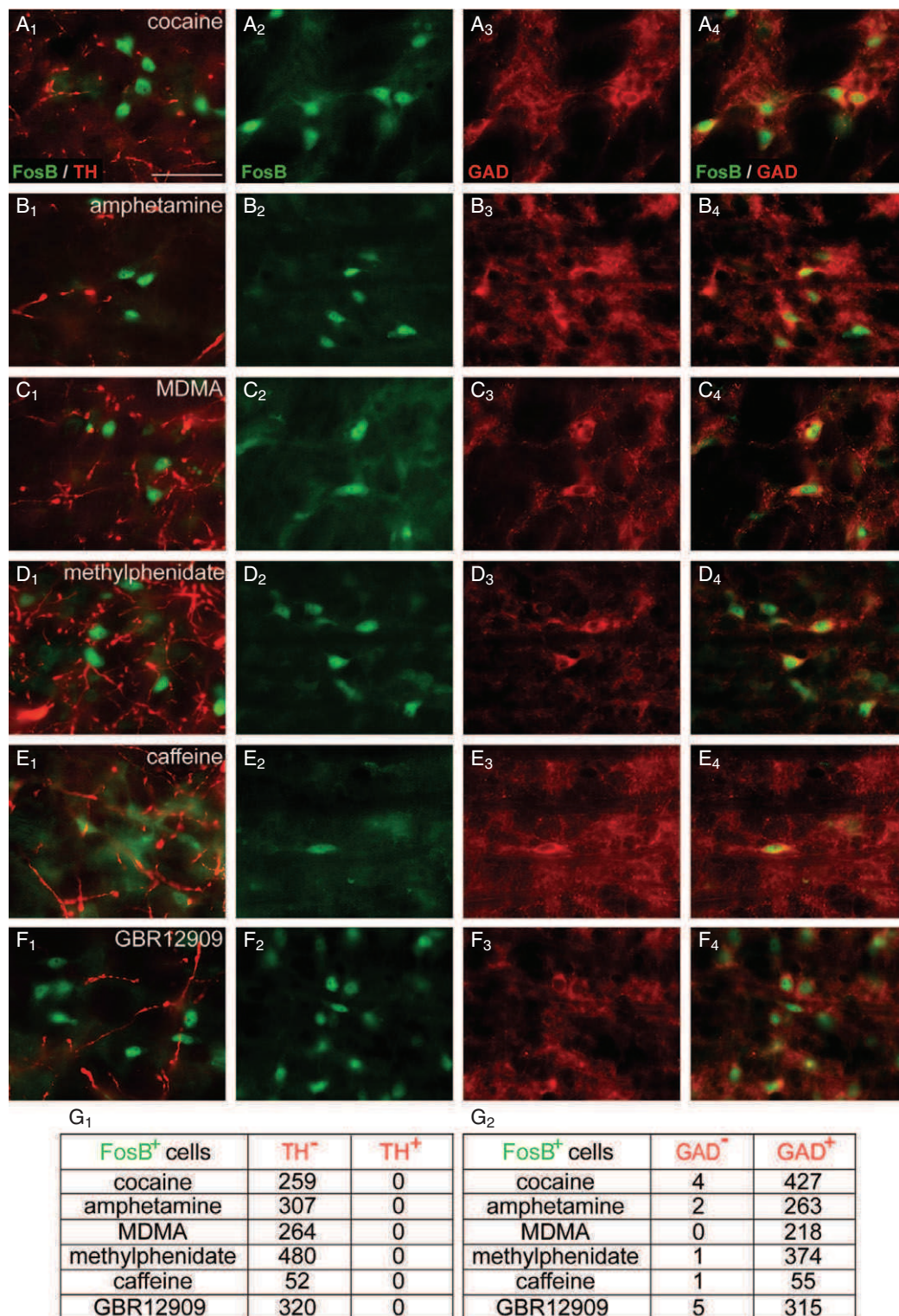


Figure 4

Psychostimulants induced the expression of FosB/ Δ FosB in GABAergic neurones of the tail of the ventral tegmental area (tVTA). Following acute injection of cocaine 20 mg·kg⁻¹ (A), D-amphetamine 1 mg·kg⁻¹ (B), MDMA 5 mg·kg⁻¹ (C), methylphenidate 10 mg·kg⁻¹ (D), caffeine 10 mg·kg⁻¹ (E) or GBR12909 15 mg·kg⁻¹ (F), FosB/ Δ FosB-positive nuclei are found in GABAergic but not in dopaminergic neurones in the tVTA. The merged image for FosB/ Δ FosB (green) and tyrosine hydroxylase (TH) (red) double labelling is presented in the 1st column. The merged image for FosB/ Δ FosB (green, 2nd column) and glutamic acid decarboxylase (GAD) (red, 3rd column) is presented in the fourth column. Quantification of double-labelling immunofluorescence revealed that none of the FosB/ Δ FosB-positive cells co-expressed TH (G₁) whereas 98–100% were GAD-positive (G₂).

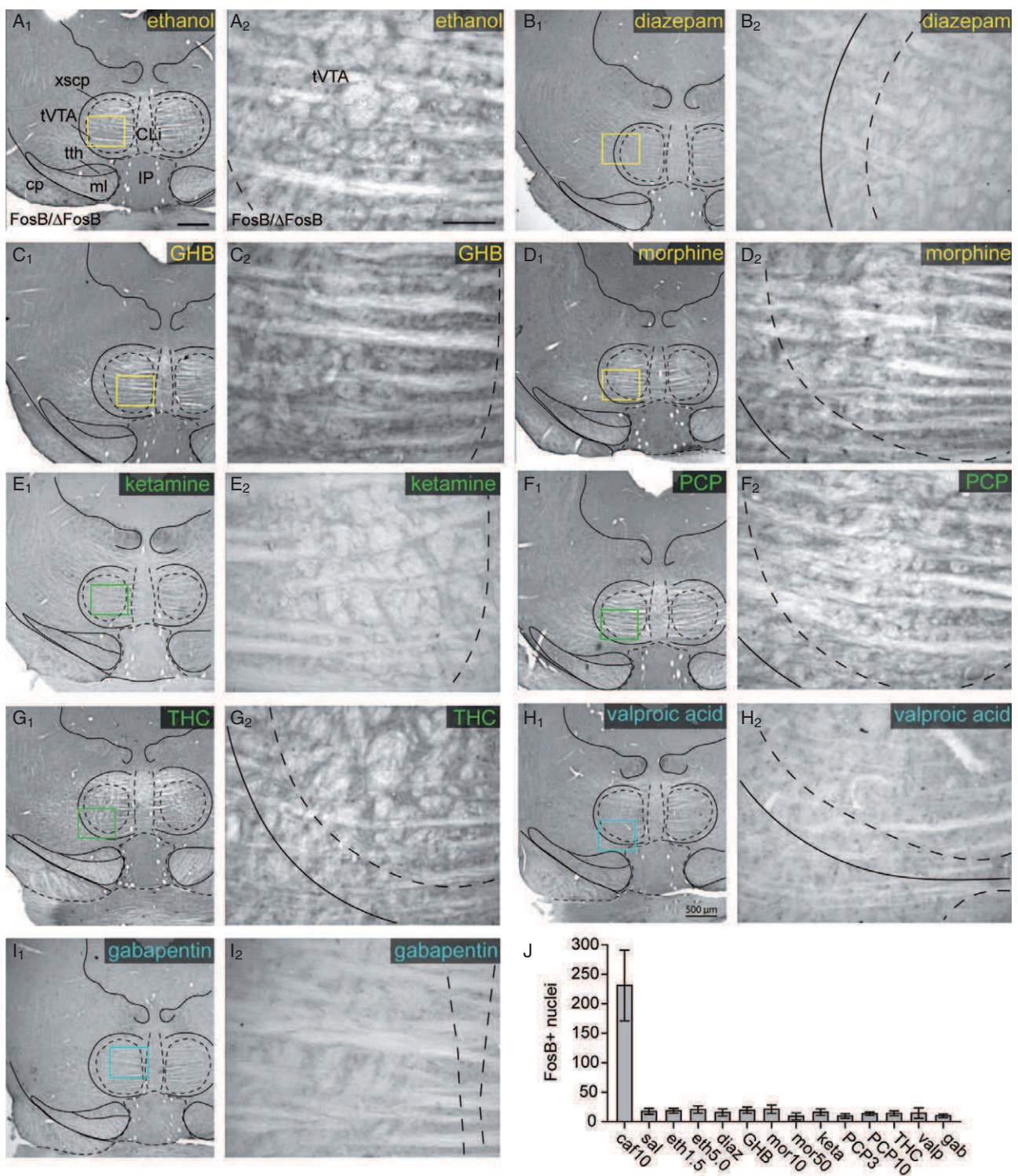


Figure 5

Sedative, dissociative or anticonvulsant drugs did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The acute injection of ethanol 1.5 g·kg⁻¹ (eth1.5) (A), diazepam 1.5 mg·kg⁻¹ (diaz) (B), γ -hydroxybutyric acid sodium salt 1 g·kg⁻¹ (GHB) (C), morphine 10 mg·kg⁻¹ (mor10) (D), ketamine 50 mg·kg⁻¹ (keta) (E), phencyclidine 3 mg·kg⁻¹ (PCP3) (F), Δ^9 -tetrahydrocannabinol 3 mg·kg⁻¹ (THC) (G), valproic acid 20 mg·kg⁻¹ (valp) (H) or gabapentin 50 mg·kg⁻¹ (gab) (I) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. (J) Quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole extent of the tVTA, caffeine data (10 mg·kg⁻¹, caf10) and saline data (sal) are given as references. $n = 3$ per group. Scale bars = 500 μ m in A₁ (applies to B₁–I₁); 100 μ m in A₂ (applies to B₂–I₂). The coloured squares in A₁–I₁ indicate the regions shown at higher magnification in A₂–I₂. eth5.0, ethanol 5 g·kg⁻¹; mor50, morphine 50 mg·kg⁻¹; PCP10, PCP 10 mg·kg⁻¹; CLi, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation.

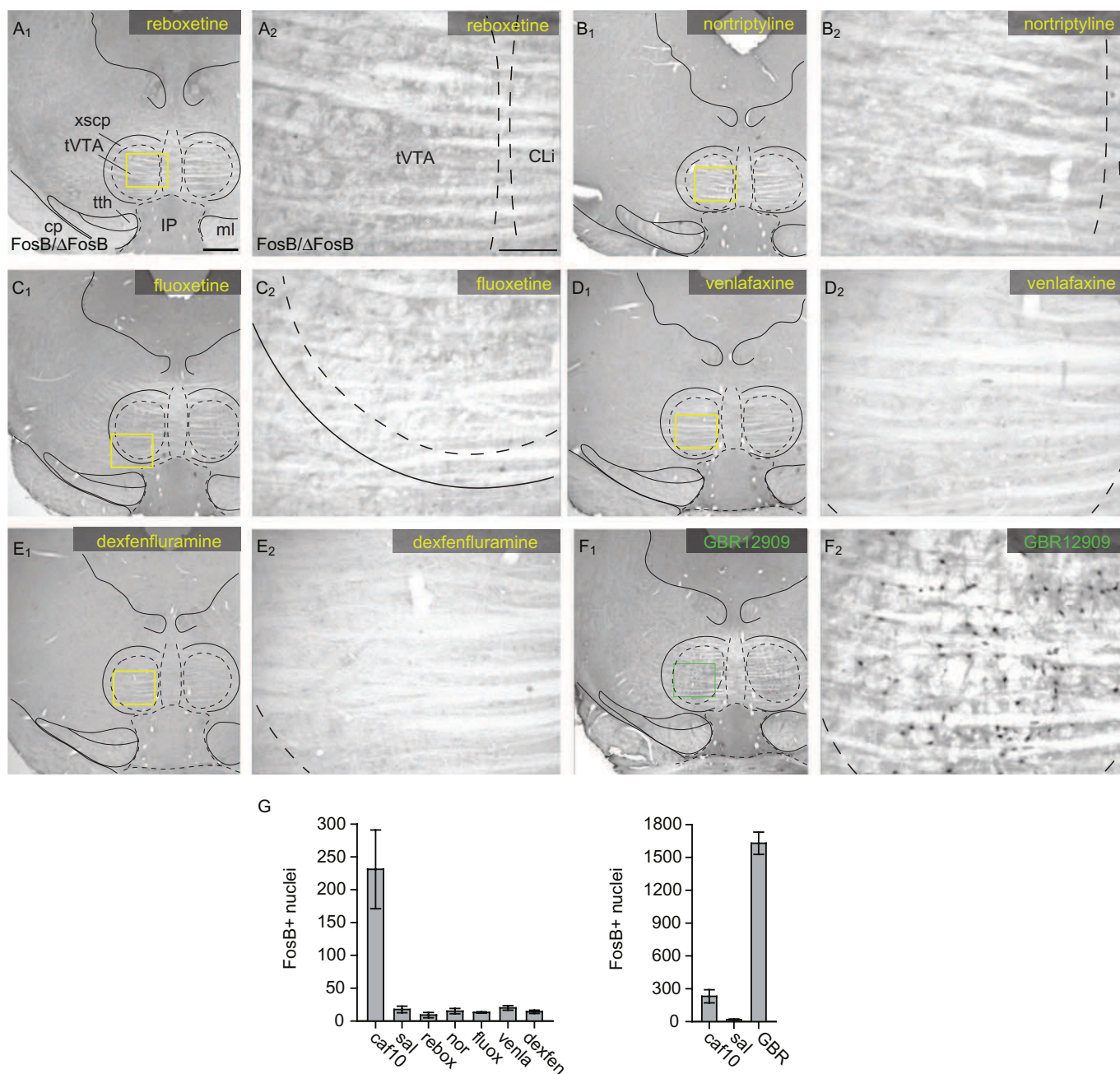


Figure 6

FosB/ΔFosB was induced in the tVTA by a DAT inhibitor, but not by antidepressant drugs or by a 5-hydroxytryptamine releasing agent. The acute injection of reboxetine 0.8 mg·kg⁻¹ (rebox) (A), nortriptyline 15 mg·kg⁻¹ (nor) (B), fluoxetine 10 mg·kg⁻¹ (fluox) (C), venlafaxine 5 mg·kg⁻¹ (venla) (D) or S-(+)-fenfluramine (dexfenfluramine) 4 mg·kg⁻¹ (dexfen) (E) did not induce FosB/ΔFosB in the tVTA. The acute injection of GBR12909 15 mg·kg⁻¹ (GBR) (F) induced FosB/ΔFosB in the tVTA. (G) Quantification of FosB/ΔFosB-positive nuclei over the whole of the tVTA, caffeine data (10 mg·kg⁻¹, caf10) and saline data (sal) are given as references. GBR12909 data are presented separately due to the high level of induction of FosB/ΔFosB; *n* = 3 per group. Scale bars = 500 μm in A₁ (applies to B₁–F₁); 100 μm in A₂ (applies to B₂–F₂). The coloured squares in A₁–F₁ indicate the regions shown at higher magnification in A₂–F₂. CLi, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation.

Discussion and conclusions

In this study, we tested pharmacological compounds for their ability to recruit a recently discov-

ered brain region, the tVTA. We show that an acute injection of the psychostimulant drugs cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate and caffeine, induced the expression of FosB/ΔFosB in tVTA

cells that were identified as GABAergic by double immunostaining. No induction was observed following exposure to ethanol, diazepam, GHB, morphine, ketamine, PCP, THC, sodium valproic acid or gabapentin. By testing various drugs targeting the aminergic systems (reboxetine, nortriptyline, fluoxetine, venlafaxine, dexfenfluramine, GBR12909), we found that the DAT inhibitor GBR12909 was the only one able to induce FosB/ Δ FosB expression in the tVTA. This shows that the dopaminergic system has a critical role in the recruitment of tVTA induced by pharmacological compounds. Our results suggest that the tVTA is a common target for drugs sharing psychostimulant properties.

The VTA is key structure for adaptive and goal-directed behaviours, motivation, reward and mood, and it is thus implicated in various psychopathological disorders (Le Moal and Simon, 1991; Nestler and Carlezon, 2006; Grace *et al.*, 2007; Iversen and Iversen, 2007; Schultz, 2007). Its functional heterogeneity along the anteroposterior axis was first observed 30 years ago (Arnt and Scheel-Krüger, 1979). This functional heterogeneity then remained unstudied until the last 10 years. Behavioural studies showed that cocaine (Rodd *et al.*, 2005a), nicotine (Ikemoto *et al.*, 2006), cannabinoids (Zangen *et al.*, 2006), opioid peptides such as the endogenous ligand of μ -opioid receptors endomorphin-1 (Zangen *et al.*, 2002), but also ethanol (Rodd-Henricks *et al.*, 2000; Rodd *et al.*, 2005b) or its metabolite acetaldehyde (Rodd-Henricks *et al.*, 2002), are self-administered if delivered into the posterior VTA; but they are not or poorly self-administered if delivered into the anterior VTA. The functional distinction between anterior and posterior VTA is also supported by studies using local viral-mediated gene transfer to manipulate the AMPA receptor subunit GluR1 (Carlezon *et al.*, 2000), the phospholipase C γ (Bolanos *et al.*, 2003) or the transcription factor CREB (Olson *et al.*, 2005). This last study identified the functional transition between anterior and posterior VTA around -5.5 mm from the bregma in the rat. However, the anterior versus posterior subdivisions of the VTA only cover the rostral and central tiers of this structure. There is less information available on the caudal-most tier, corresponding to the tVTA which is mainly GABAergic and can be revealed by Δ FosB induction following cocaine exposure (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009). Our results show that various psychostimulant drugs recruit the tVTA after acute administration, as indicated by the induction of the transcription factor FosB/ Δ FosB. Behaviourally, future studies are now needed to evaluate whether tVTA also supports drug self-administration and to functionally differentiate the posterior VTA

from the tVTA. However, the partial overlap between the posterior VTA and tVTA (Kaufling *et al.*, 2009) might make the latter studies challenging.

FosB and its stable truncated splice variant Δ FosB are expressed in different regions of the nervous system in response to various pharmacological or non-pharmacological stimuli: drugs of abuse (Hope *et al.*, 1994a; Pich *et al.*, 1997; Perrotti *et al.*, 2008), NMDA antagonists (de Olmos *et al.*, 2009), antipsychotic drugs (Hiroi and Graybiel, 1996), antidepressant drugs (Hope *et al.*, 1994a), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Berton *et al.*, 2009), but also seizures (Hope *et al.*, 1994b), stress (Perrotti *et al.*, 2004; Berton *et al.*, 2007), ischaemia (McGahan *et al.*, 1998), inflammatory pain (Luis-Delgado *et al.*, 2006), compulsive running (Werme *et al.*, 2002) or natural rewards (Wallace *et al.*, 2008). With regard to drugs of abuse, this induction was observed with cocaine, amphetamine, methamphetamine, PCP, morphine, nicotine, ethanol and THC (Pich *et al.*, 1997; McDaid *et al.*, 2006; Perrotti *et al.*, 2008). Some brain regions, such as the striatal complex, appear to be common targets for molecular plasticity induced by all these drugs. However, this is not the case for the tVTA. Our survey of various pharmacological stimuli showed that, despite their abuse potential, ethanol, diazepam, GHB, morphine, ketamine, PCP or THC do not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The induction of FosB/ Δ FosB in the tVTA may thus be related to the stimulant/arousing properties of psychostimulant drugs rather than to their potential for abuse. In support of this hypothesis, it has been previously shown that modafinil (Provigil[®], Cephalon, Maisons-Alfort, France), a non-addictive psychostimulant used against narcolepsy, induces a strong Fos expression specifically in the caudal-most tier of the VTA, which corresponds to the tVTA (Scammell *et al.*, 2000).

Cocaine, D-amphetamine, MDMA and methylphenidate target monoamine transporters. However, the NET inhibitor reboxetine, the NET/SERT inhibitors nortriptyline and venlafaxine, the SERT inhibitor fluoxetine, and the 5-hydroxytryptamine releasing agent dexfenfluramine are unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. In contrast, FosB/ Δ FosB can be induced in the tVTA by the DAT inhibitor GBR12909. A marked increase in dopamine transmission thus appears to be sufficient to induce the local expression of this transcription factor. The dopamine involved may originate from the sparse dopaminergic cells or fibres within the tVTA itself. These fibres may arise from local cell bodies or from dopaminergic cell bodies in VTA and substantia nigra pars compacta, which are tVTA afferents (Kaufling *et al.*, 2009).

However, the dopamine may also be of somatodendritic origin from the VTA itself (Kalivas and Duffy, 1988) and diffuse by volume transmission to the nearby tVTA. Another hypothesis that should not be discarded is the possibility of a system-wide polysynaptic recruitment of tVTA. Indeed, tVTA receives inputs from various brain regions recruited by psychostimulants. This includes, but is not restricted to, prefrontal cortical areas, nucleus accumbens or lateral habenula (Geisler *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009a; Kauffling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010).

An increase in somatodendritic and axonal dopamine has also been observed after morphine exposure (Kalivas and Duffy, 1988), whereas we found that morphine did not induce the expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA. Two explanations may be proposed to account for this discrepancy. Firstly, the somatodendritic release of dopamine induced by morphine has a lower capacity for diffusion than that induced by the previously cited psychostimulants. Indeed, DAT are still effective in animals administered with morphine, preventing an important diffusion of the dopamine. Secondly, it has been shown that tVTA neurones express the μ -opioid receptors (Zhou *et al.*, 2009a) and direct stimulation of these opioid receptors by morphine may inhibit the cAMP/PKA pathway and prevent FosB/ Δ FosB induction in tVTA neurones. It is also important to remember that the induction of FosB/ Δ FosB does not necessarily reflect an electrophysiological activity of the corresponding cell and that a lack of induction does not reflect a lack of electrophysiological effect.

The FosB/ Δ FosB induction in the tVTA after caffeine is mild but significant at various doses. Caffeine is not an inhibitor of the monoamine transporter; it is a non-selective adenosine receptor antagonist and a competitive non-selective phosphodiesterase inhibitor (Nehlig *et al.*, 1992). Due to caffeine's low affinity for phosphodiesterases, its *in vivo* action, particularly its psychostimulant effect, is thought to be mediated through its inhibitory effects on adenosine receptors (Ferré, 2008). Studies on the striatal complex have revealed that both pre- and post-synaptic mechanisms, which depend on A₁ and A_{2A} receptors and on their interactions with dopamine receptors, are involved in the psychostimulant effect of caffeine (Ferré, 2008). Future work is however needed to evaluate whether similar mechanisms are implicated in the recruitment of tVTA cells by caffeine.

In conclusion, among the 20 drugs tested, only the psychostimulant drugs induced the expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA. Newly described brain structures may help to increase our knowledge on

brain functions, pathology and pharmacological targets. The tVTA, a potential control centre for dopaminergic activity, appears to be a common target for drugs sharing psychostimulant properties rather than for drugs sharing a risk of abuse. Future work is needed to understand the functional implication of tVTA in the stimulant and/or arousing properties of these drugs, and to determine whether this newly defined brain area is a critical neuroanatomical substrate for such properties.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg and the Fondation pour la Recherche Médicale (JK, MB). We thank Stéphane Doridot for animal care.

Statement of conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to receptors and channels (GRAC), 4th edn. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1): S1–S254.
- Arnt J, Scheel-Krüger J (1979). GABA in the ventral tegmental area: differential regional effects on locomotion, aggression and food intake after microinjection of GABA agonists and antagonists. *Life Sci* 25: 1351–1360.
- Beck CH (1995). Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci* 20: 25–32.
- Berton O, Covington HE 3rd, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P *et al.* (2007). Induction of DeltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55: 289–300.
- Berton O, Guigoni C, Li Q, Bioulac BH, Aubert I, Gross CE *et al.* (2009). Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry* 66: 554–561.
- Bolanos CA, Perrotti LI, Edwards S, Eisch AJ, Barrot M, Olson VG *et al.* (2003). Phospholipase C γ in distinct regions of the ventral tegmental area differentially modulates mood-related behaviors. *J Neurosci* 23: 7569–7576.
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168: 463–476.

- Carlezon WA Jr, Haile CN, Coppersmith R, Hayashi Y, Malinow R, Neve RL *et al.* (2000). Distinct sites of opiate reward and aversion within the midbrain identified using a herpes simplex virus vector expressing GluR1. *J Neurosci* 20: RC62.
- Carter LP, Loel W, France CP (2009). Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms. *Pharmacol Ther* 121: 100–114.
- Castellani S, Adams PM (1981). Acute and chronic phencyclidine effects on locomotor activity, stereotypy and ataxia in rats. *Eur J Pharmacol* 73: 143–154.
- Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res* 85: 27–35.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 547–569.
- Deurveilher S, Lo H, Murphy JA, Burns J, Semba K (2006). Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. *J Comp Neurol* 498: 667–689.
- Ferré S (2008). An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* 105: 1067–1079.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153: 196–213.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M *et al.* (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688–2700.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007). Regulation of firing of dopamineergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220–227.
- Gruner JA, Marcy VR, Yin-Guo L, Bozyczko-Coyne D, Marino MJ, Gasior M (2009). The roles of dopamine transport inhibition and dopamine release facilitation in wake enhancement and rebound hypersomnolence induced by dopaminergic agents. *Sleep* 32: 1425–1438.
- Hiroi N, Graybiel AM (1996). Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol* 374: 70–83.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y *et al.* (1994a). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13: 1235–1244.
- Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ (1994b). Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a longlasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14: 4318–4328.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56: 27–78.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006). Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26: 723–730.
- Iversen SD, Iversen LL (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30: 188–193.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009a). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513: 566–596.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009b). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61: 786–800.
- Kalivas PW, Duffy P (1988). Effects of daily cocaine and morphine treatment on somatodendritic and terminal field dopamine release. *J Neurochem* 50: 1498–1504.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513: 597–621.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010). Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67: 88–92.
- Le Moal M, Simon H (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71: 155–234.
- Lepore M, Vorel SR, Lowinson J, Gardner EL (1995). Conditioned place preference induced by delta-9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci* 56: 2073–2080.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Ulery PG, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006). The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem* 98: 1423–1431.
- McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004). DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Mol Brain Res* 132: 146–154.
- McDaid J, Graham MP, Napier TC (2006). Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and Δ-FosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. *Mol Pharmacol* 70: 2064–2074.

- McGahan L, Hakim AM, Nakabeppu Y, Robertson GS (1998). Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Mol Brain Res* 56: 146–161.
- Maitre M (1997). The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 51: 337–361.
- Millan MJ, Dekeyne A, Papp M, Drieu La Rochelle C, MacSweeney C, Peglion JL *et al.* (2001). S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 581–591.
- Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17: 139–170.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59: 1151–1159.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11042–11046.
- de Olmos S, Bender C, de Olmos JS, Lorenzo A (2009). Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine. *Neuroscience* 164: 1347–1359.
- Olson VG, Nestler EJ (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61: 87–95.
- Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ *et al.* (2005). Regulation of drug reward by CREB: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 25: 5553–5562.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. Academic Press: San Diego, CA.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. Academic Press: San Diego, CA, fig 89–92.
- Pedersen LH, Blackburn-Munro G (2006). Pharmacological characterisation of place escape/avoidance behaviour in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology* 185: 208–217.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS *et al.* (2004). Induction of DeltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24: 10594–10602.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG *et al.* (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21: 2817–2824.
- Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S *et al.* (2008). Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* 62: 358–369.
- Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997). Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275: 83–86.
- Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ (2005a). Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 31: 134–145.
- Rodd ZA, Bell RL, Zhang Y, Murphy JM, Goldstein A, Zaffaroni A *et al.* (2005b). 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 ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 149: 217–224.
- Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 55–64.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS *et al.* (2000). Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20: 8620–8628.
- Schultz W (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 30: 203–210.
- Stephenson CP, Hunt GE, Topple AN, McGregor IS (1999). The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine 'Ecstasy'-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience* 92: 1011–1023.
- Tose R, Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Furukawa K, Ueno S *et al.* (2009). Orexin A decreases ketamine-induced anesthesia time in the rat: relevance to brain noradrenergic neuronal activity. *Anesth Analg* 108: 491–495.
- Vickers SP, Clifton PG, Dourish CT (1996). Behavioural evidence that d-fenfluramine-induced anorexia in the rat is not mediated by the 5-HT_{1A} receptor subtype. *Psychopharmacology* 125: 168–175.
- Vilpoux C, Warmault V, Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M (2009). Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 945–969.
- Wallace DL, Vialou V, Rios L, Carle-Florence TL, Chakravarty S, Kumar A *et al.* (2008). The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *J Neurosci* 28: 10272–10277.

Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thoren P, Nestler EJ *et al.* (2002). DeltaFosB regulates wheel running. *J Neurosci* 22: 8133–8138.

Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demoulière N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ *et al.* (2009). Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 33: 386–394.

Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002). Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22: 7225–7233.

Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26: 4901–4907.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Summary of tVTA connections in the rat brain. The structures connected to the tVTA are schematically presented according to their distance to tVTA (1 mm per circle) along the anteroposterior (top-bottom) and lateral (left-right) axis. Colours indicate the relative density of the connections. The afferents are presented on left half of the schematic and the efferents on the right half. Abbreviations: 3, oculomotor ncl; AcbC, accumbens ncl, core; AcbSh, accumbens ncl, shell; AI, agranular insular cortex; a/pVTA, anterior/posterior VTA; BST, bed ncl of the stria terminalis; Cg, cingulate cortex; Cl, claustrum; CPu, caudate putamen; DA, dorsal hypothalamic area; DMTg, dorsomedial tegmental area; DP, dorsal peduncular cortex; DpMe, deep mesencephalic ncl; DR, dorsal raphe ncl; F, ncl of the fields of Forel; HBD, ncl of the horizontal limb of the diagonal band; IL, infralimbic cortex; ILT, intralaminar thalamic ncl; IP, interpeduncular ncl; IPAC, interstitial ncl of the posterior limb of the anterior commissure; LC, locus coeruleus; LDTg, laterodorsal tegmental ncl; LH, lateral hypothalamic area; LHb, lateral habenula; LPO, lateral preoptic area; LS, lateral septum; MCPO, magnocellular preoptic ncl; MHb, medial habenular ncl; MnR, median raphe ncl; MPO, medial preoptic ncl; ncl, nucleus/nuclei; PAG, periaqueductal gray; PB, parabrachial ncl; PF, parafascicular thalamic ncl; PH, posterior hypothalamic area; PnC, pontine reticular ncl, caudal part; PnO, pontine reticular ncl, oral part; PMnR, paramedian raphe ncl; PPTg, pedunculopontine tegmental ncl; PrL, prelimbic cortex; PV, paraventricular thalamic ncl; R, retrorubral field; SC, superior colli-

culus; SI, substantia innominata; SNC, substantia nigra, compact part; SNR, substantia nigra, reticular part; Sub, submedius thalamic ncl; TC, tuber cinereum area; tVTA, tail of the VTA; VP, ventral pallidum; VT, ventral thalamic ncl; VTA, ventral tegmental area; ZI, zona incerta.

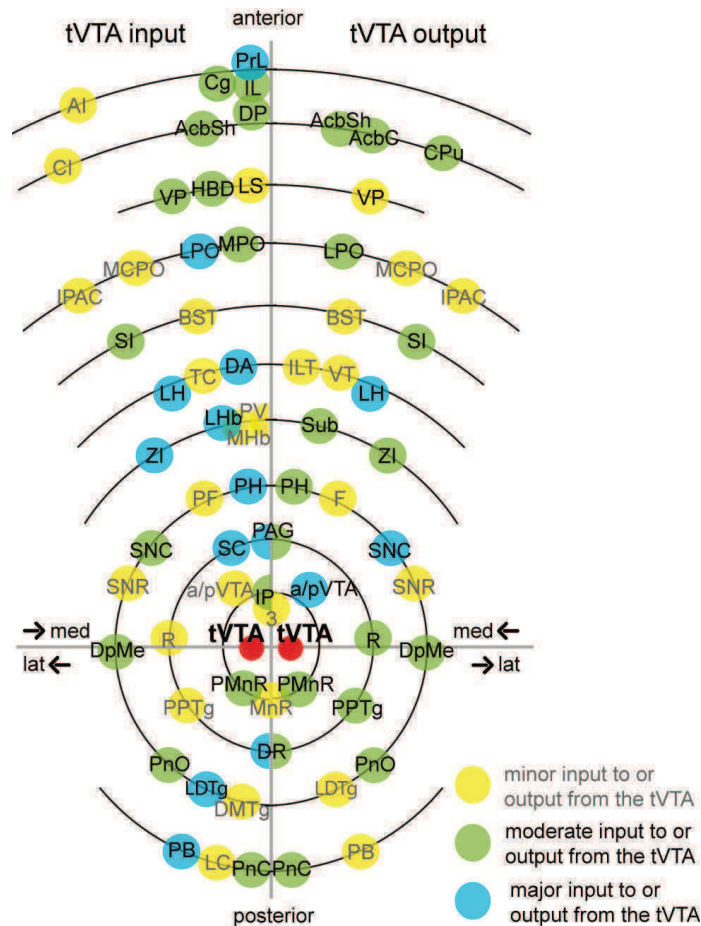
Figure S2 Time course of FosB/ Δ FosB induction in the tVTA. The microphotographs illustrate the induction of FosB/ Δ FosB at various time-points following an injection of cocaine 20 mg·kg⁻¹ (A) or saline (B). The quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole of the tVTA is given in Figure 3 of the main article. Scale bar = 100 μ m in A₁ (applies to all pictures).

Figure S3 Dose-responses of FosB/ Δ FosB induction in the tVTA. The microphotographs illustrate the induction of FosB/ Δ FosB by various doses of cocaine (A) or caffeine (B). The quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole of the tVTA is given in Figure 3 of the main article. Scale bar = 100 μ m in A₁ (applies to all pictures).

Figure S4 FosB/ Δ FosB expression in GABAergic and non-GABAergic neurones from the tVTA. (A) While most of FosB/ Δ FosB-positive nuclei (A1, green) are found in glutamic acid decarboxylase (GAD)-expressing neurones (A2, red), as seen in the merged image (A3), arrowheads point two FosB/ Δ FosB-positive nuclei in GAD-negative neurones. (B) The merged image of another section shows a FosB/ Δ FosB-positive nucleus in a GAD-negative neurone (white arrowhead), a GAD-positive neurone without detectable expression of FosB (red arrowhead), and a GAD-positive neurone expressing FosB in its nucleus (yellow arrowhead). These tVTA pictures are from an animal that received GBR12909 15 mg·kg⁻¹. Scale bars: 50 μ m in A1 (applies to A2 and A3) and B.

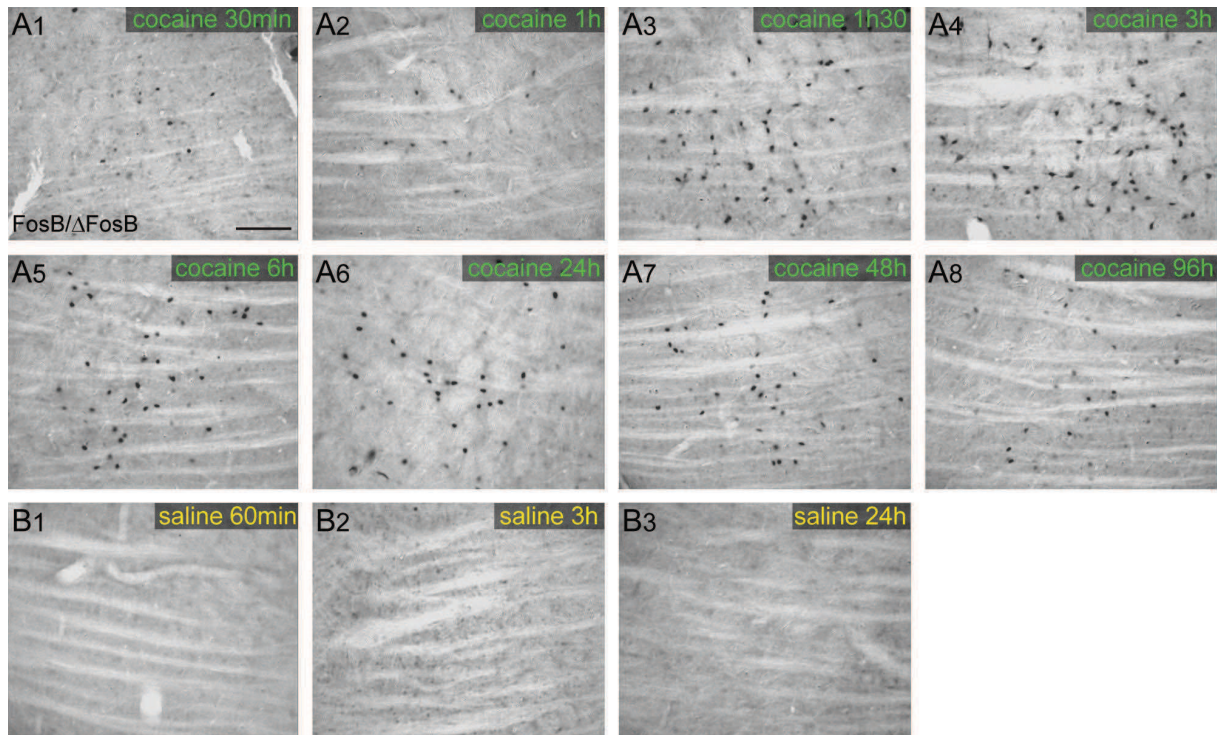
Figure S5 FosB/ Δ FosB induction in the tVTA. High doses of ethanol (5 g·kg⁻¹, A), morphine (50 mg·kg⁻¹, B) or phencyclidine (PCP, 10 mg·kg⁻¹, F) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole extent of the tVTA is given in Figure 5J of the main article; *n* = 3 per group. Abbreviations: cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars = 500 μ m in A₁ (applies to B₁ and C₁); 100 μ m in A₂ (applies to B₂ and C₂). The coloured squares in A₁–C₁ indicate the regions shown at higher magnification in A₂–C₂.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

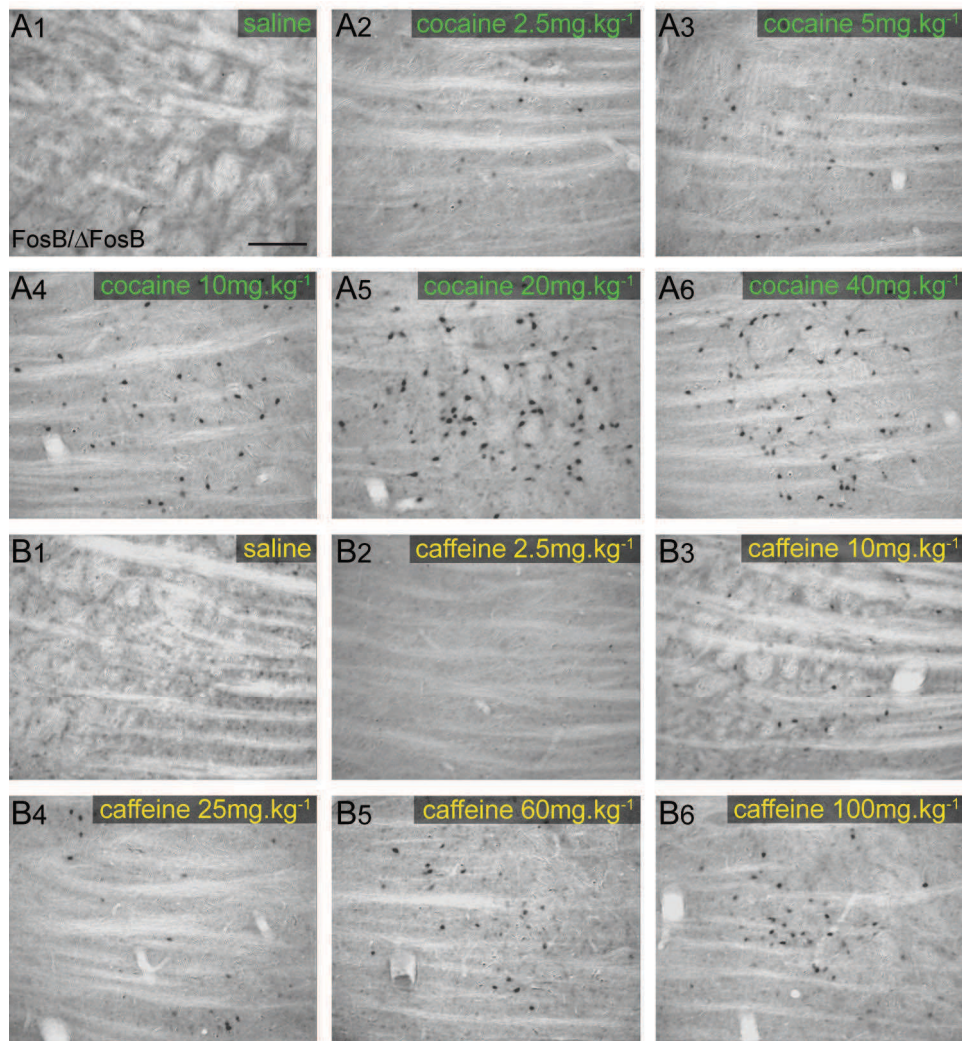


Supplementary Figure 1. Summary of tVTA connections in the rat brain. The structures connected to the tVTA are schematically presented according to their distance to tVTA (1 mm per circle) along the anteroposterior (top-bottom) and lateral (left-right) axis. Colours indicate the relative density of the connections. The afferents are presented on left half of the schematic and the efferents on the right half.

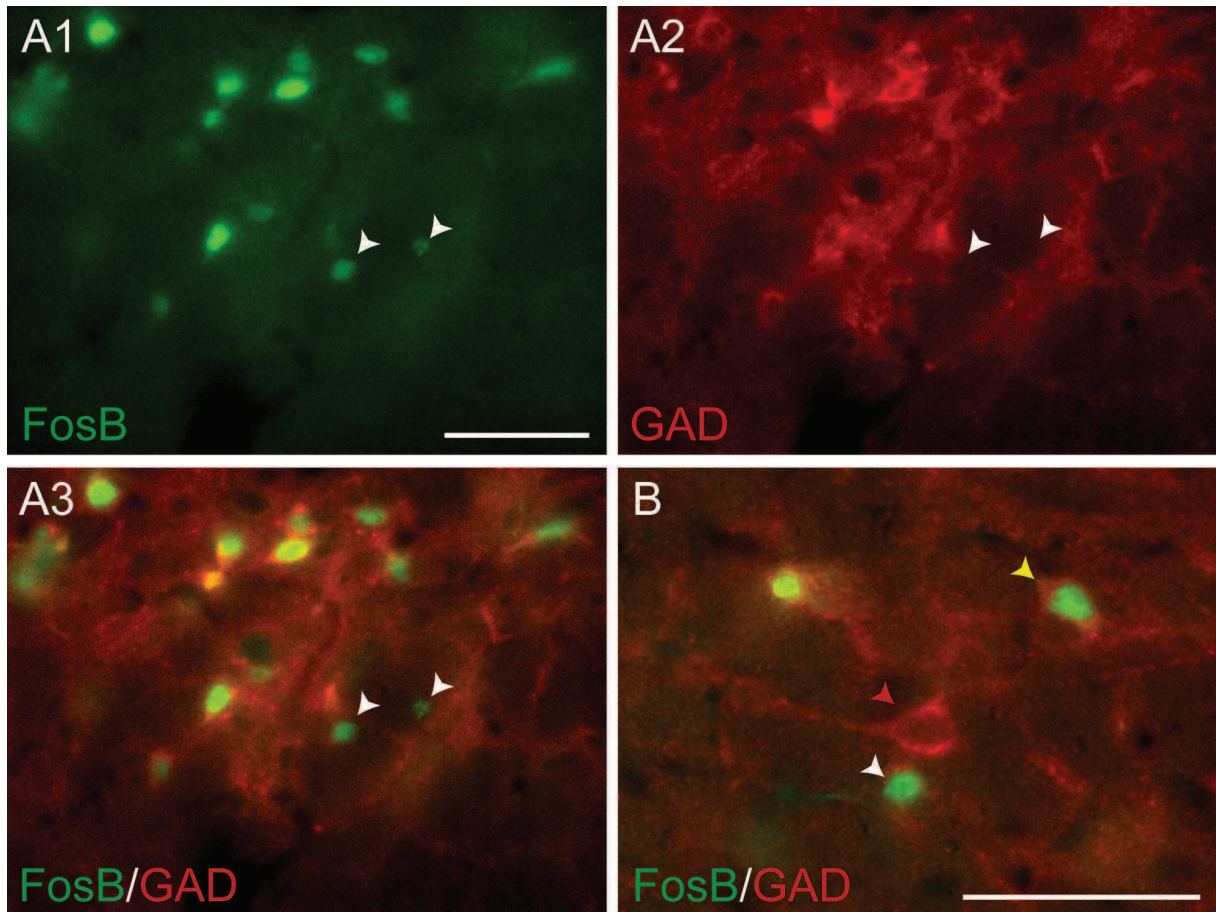
Abbreviations: 3, oculomotor ncl; AcbC, accumbens ncl, core; AcbSh, accumbens ncl, shell; AI, agranular insular cortex; a/pVTA, anterior/posterior VTA; BST, bed ncl of the stria terminalis; Cg, cingulate cortex; Cl, claustrum; CPu, caudate putamen; DA, dorsal hypothalamic area; DMTg, dorsomedial tegmental area; DP, dorsal peduncular cortex; DpMe, deep mesencephalic ncl; DR, dorsal raphe ncl; F, ncl of the fields of Forel; HBD, ncl of the horizontal limb of the diagonal band; IL, infralimbic cortex; ILT, intralaminar thalamic ncl; IP, interpeduncular ncl; IPAC, interstitial ncl of the posterior limb of the anterior commissure; LC, locus coeruleus; LDTg, laterodorsal tegmental ncl; LH, lateral hypothalamic area; Lhb, lateral habenula; LPO, lateral preoptic area; LS, lateral septum; MCPO, magnocellular preoptic ncl; Mhb, medial habenular ncl; MnR, median raphe ncl; MPO, medial preoptic ncl; ncl, nucleus/nuclei; PAG, periaqueductal gray; PB, parabrachial ncl; PH, parafascicular thalamic ncl; PH, posterior hypothalamic area; PnC, pontine reticular ncl, caudal part; PnO, pontine reticular ncl, oral part; PMnR, paramedian raphe ncl; PPTg, pedunculopontine tegmental ncl; PrL, prelimbic cortex; PV, paraventricular thalamic ncl; R, retrorubral field; SC, superior colliculus; SI, substantia innominata; SNC, substantia nigra, compact part; SNR, substantia nigra, reticular part; Sub, submedius thalamic ncl; TC, tuber cinereum area; tVTA, tail of the VTA; VP, ventral pallidum; VT, ventral thalamic ncl; VTA, ventral tegmental area; ZI, zona incerta.



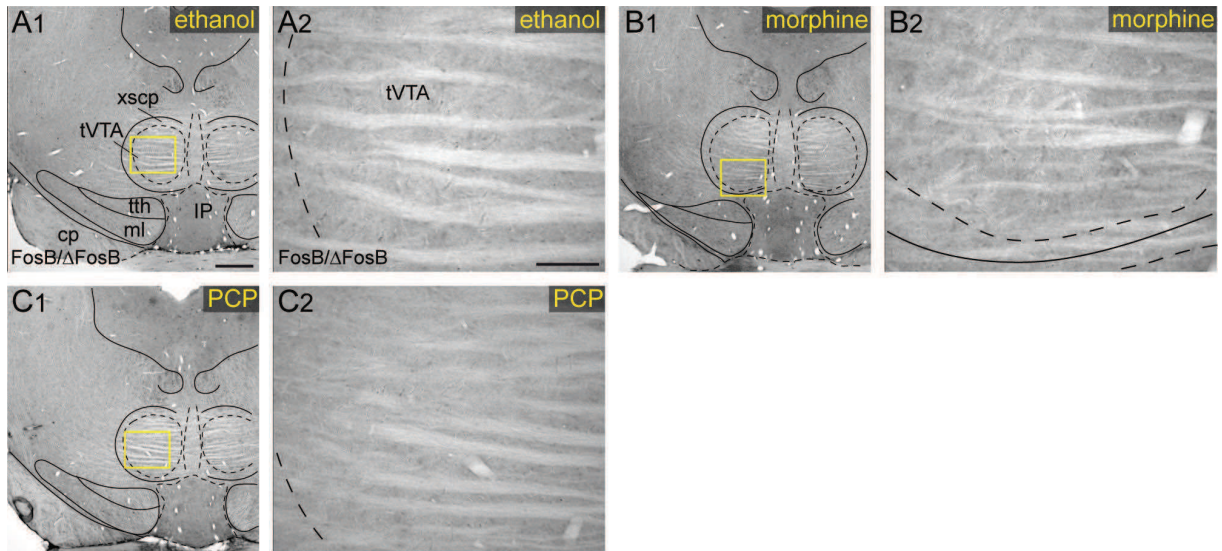
Supplementary Figure 2. Time-course of FosB/ΔFosB induction in the tVTA. The microphotographs illustrate the induction of FosB/ΔFosB at various time-points following an injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹ (A) or saline (B). The quantification of FosB/ΔFosB-positive nuclei over the whole extent of the tVTA is given in Figure 3 of the main article. Scale bar = 100 μm in A₁ (applies to all pictures).



Supplementary Figure 3. Dose-responses of FosB/ΔFosB induction in the tVTA. The microphotographs illustrate the induction of FosB/ΔFosB by various doses of cocaine (A) or caffeine (B). The quantification of FosB/ΔFosB-positive nuclei over the whole extent of the tVTA is given in Figure 3 of the main article. Scale bar = 100 μm in A₁ (applies to all pictures).



Supplementary Figure 4. FosB/ Δ FosB expression in GABAergic and non-GABAergic neurons from the tVTA. (A) While most of FosB/ Δ FosB-positive nuclei (A1, green) are found in glutamic acid decarboxylase (GAD)-expressing neurons (A2, red), as seen in the merged image (A3), arrowheads point two FosB/ Δ FosB-positive nuclei in GAD-negative neurons. (B) The merged image of another section shows a FosB/ Δ FosB-positive nucleus in a GAD-negative neurons (white arrowhead), a GAD-positive neuron without detectable expression of FosB (red arrowhead), and a GAD-positive neuron expressing FosB in its nucleus (yellow arrowhead). These tVTA pictures are from an animal that received GBR12909 15 mg.kg⁻¹. Scale bars: 50 μ m in A1 (applies to A2 and A3) and B.



Supplementary Figure 5. FosB/ Δ FosB induction in the tVTA. High doses of ethanol (5 g.kg^{-1} , A), morphine (50 mg.kg^{-1} , B) or phencyclidine (PCP, 10 mg.kg^{-1} , F) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei over the whole extent of the tVTA is given in Figure 5J of the main article. $n=3$ per group. Abbreviations: cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars = $500 \mu\text{m}$ in A_1 (applies to B_1 and C_1); $100 \mu\text{m}$ in A_2 (applies to B_2 and C_2). The coloured squares in A_1 - C_1 indicate the regions shown at higher magnification in A_2 - C_2 .

G- Discussion

1- Relations entre psychostimulants et induction des protéines Fos dans la tVTA

Quel que soit le mode d'administration utilisé, intrapéritonéal, intraveineux, en passif ou en auto-administration, les psychostimulants sont responsables d'une induction des protéines Fos dans les neurones GABAergiques de la tVTA. Cette induction semble être dépendante de la dopamine car : 1) l'hyperdopaminergie provoquée par une action directe ou indirecte sur le système dopaminergique mésolimbique est un point commun à l'ensemble des psychostimulants testés, 2) nous avons montré que parmi tous les inhibiteurs de recapture des monoamines, seul le GBR12909 était responsable d'une induction de FosB/ Δ FosB et 3) une étude menée au sein du laboratoire a montré qu'une injection intrapéritonéale d'antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1 supprimait l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA en réponse à une injection aiguë de cocaïne (thèse de Jennifer Kaufling, 2010).

La majorité des psychostimulants testés dans notre étude entraîne une augmentation massive des taux extracellulaires de dopamine dans la fente synaptique via une inhibition du transporteur de la dopamine (DAT pour "dopamine transporter") ou une action sur le transporteur vésiculaire de la dopamine. Cette augmentation des taux extracellulaires conduit à une augmentation de l'activation des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques, récepteurs couplés aux protéines G pouvant être responsable de l'activation de voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'expression des protéines Fos. L'activation par la dopamine des récepteurs D1, couplés positivement à l'adénylate cyclase, pourrait conduire à une augmentation intracellulaire des taux d'AMPC entraînant la phosphorylation de CREB par des kinases et le recrutement de co-activateurs et co-répresseurs conduisant à l'expression de FosB. Pour que les protéines Fos soient induites de façon optimale dans les neurones, une entrée glutamatergique active est nécessaire ; or la tVTA reçoit de nombreuses entrées glutamatergiques provenant notamment de la LHb, du cortex frontal et des collicules supérieurs (SC) (Kaufling et al., 2009). Bien que cela n'ait pas été démontré directement, il est possible que l'hyperdopaminergie provoquée localement par les psychostimulants soit suffisante pour induire FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA. Cependant, la localisation des récepteurs dopaminergiques nécessaires pour cette induction n'est pas encore connue dans la tVTA.

Via leur action sur le DAT exprimé par les corps cellulaires et les terminaisons synaptiques des neurones dopaminergiques du mésencéphale, les psychostimulants sont responsables d'une augmentation des taux de dopamine dans les structures cibles ainsi que dans la région des corps cellulaires (libération somato-dendritique). La tVTA reçoit des afférences provenant de la VTA et de la SNc (Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009), deux structures pouvant être sources d'une élévation des taux synaptiques de dopamine en

réponse à l'action des psychostimulants. Cependant, ces afférences à la tVTA sont diffuses et il semble peu probable que celles-ci soient suffisantes pour une forte induction des protéines Fos. Un traitement à la cocaïne est responsable d'une libération somato-dendritique de dopamine par les neurones de la VTA (Kalivas and Duffy, 1988). Les psychostimulants pourraient par conséquent provoquer une telle libération, conduisant à une diffusion volumique de la dopamine vers la tVTA suivie d'une action sur les récepteurs dopaminergiques ci ceux-ci existent dans la tVTA. Enfin, une autre possibilité serait un recrutement moléculaire de la tVTA en réponse à l'activation d'une boucle polysynaptique engageant d'autres structures cérébrales.

Parmi les psychostimulants testés et induisant la protéine FosB/ Δ FosB, on trouve la caféine qui possède un mode d'action différent de la cocaïne et des dérivés amphétaminiques qui agissent directement sur le système dopaminergique. En effet, la caféine agit comme un antagoniste des récepteurs de l'adénosine et bien que cette drogue puisse interagir avec les systèmes dopaminergiques, cette action est indirecte. On peut voir dans notre étude qu'en comparaison avec les autres psychostimulants agissant sur les transporteurs de la dopamine, le taux d'induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA en réponse à la caféine est beaucoup plus faible, quelle que soit la concentration utilisée. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'induction des protéines Fos dans les neurones de la tVTA par les psychostimulants dépend principalement de l'efficacité de leur action sur le système dopaminergique.

2- Signification physiologique de l'induction des protéines Fos dans la tVTA

L'expression des protéines Fos dans la tVTA en réponse aux psychostimulants a permis de délimiter les contours de la structure de manière plus précise. Cependant, la présence de ces protéines dans la tVTA en réponse à des injections de psychostimulants possède une signification physiologique qui n'a pas encore été étudiée à ce jour. La majorité de ce qui est connu sur ce sujet provient d'études s'intéressant aux effets des drogues sur l'induction des protéines Fos dans le NAc (McClung et al., 2004). L'induction des protéines Fos à courte demi-vie dans les neurones de la tVTA sous-tend la présence d'une activité moléculaire intense au sein de la cellule pouvant entraîner des modifications cellulaires rapides, ou l'initiation de processus de plasticité pouvant moduler les futures réponses des neurones aux stimuli. Du fait d'un nombre plus restreint de possibilités de dimérisation de Δ FosB, et par conséquent de gènes cibles potentiels, les conséquences de son induction sont plus faciles à envisager. De plus, une partie de ces gènes cibles ont été identifiés et les conséquences de leur expression ont été étudiées, notamment dans le cadre de la réponse aux drogues.

Un des gènes cibles de cette protéine est le gène de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) du glutamate. La

présence de cette sous-unité dans les récepteurs AMPA est responsable d'une diminution de leur conductance au calcium (Hollmann and Heinemann, 1994; Jonas and Burnashev, 1995). L'expression par les neurones de la tVTA de récepteurs AMPA enrichis en sous-unité GluR2 rendrait ces neurones moins excitables par les entrées glutamatergiques, probablement nécessaires à l'activité basale de la tVTA. Une diminution de l'activité basale de la tVTA aurait pour effet de diminuer l'inhibition tonique que cette structure exerce sur les neurones dopaminergiques (Jalabert et al., 2011) et de conduire à une augmentation de l'activité basale des neurones dopaminergiques de la VTA. Cela pourrait avoir comme conséquence d'augmenter l'effet des psychostimulants au niveau des synapses dopaminergiques dans les structures effectrices. Il existe un lien entre l'activité des neurones de la VTA et la libération transitoire de dopamine dans le NAc induit par la cocaïne, connue pour être impliquée dans les effets comportementaux des drogues (Somers et al., 2009; McCutcheon et al., 2014). Dans ce cas, les conséquences de l'induction de Δ FosB dans les neurones de la tVTA en réponse à des injections répétées de psychostimulants seraient un effet facilitateur de leur action sur le système mésolimbique. Une étude réalisée au sein du laboratoire et non publiée va dans ce sens en démontrant que chez des animaux ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA, une injection aiguë de cocaïne entraîne une augmentation de l'activité locomotrice plus importante que chez les animaux contrôles.

Un autre gène cible du facteur de transcription Δ FosB est *Cdk5* sur lequel il agit comme un activateur transcriptionnel. L'expression de ce gène dans le NAc, en réponse à l'administration chronique de cocaïne est associée à une augmentation de la densité des épines dendritiques, traduisant la mise en place d'une plasticité morphologique. L'augmentation du nombre d'épines dendritiques et de leur largeur est souvent associée à la mise en place d'une potentialisation à long terme, avec une augmentation de la densité post synaptique et du nombre de récepteurs AMPA à la surface des épines (Russo et al., 2010). Cette plasticité à long terme a pour effet de faciliter la transmission glutamatergique via les récepteurs AMPA sur les neurones présentant ce type de plasticité. Une augmentation des épines dendritiques sur les neurones GABAergiques de la tVTA entraînerait par conséquent un renforcement des entrées glutamatergiques sur ces neurones, conduisant à une augmentation de leur excitabilité. Cela provoquerait une augmentation de l'inhibition tonique ou phasique exercée par ces neurones sur les neurones dopaminergiques de la VTA et à une diminution de leur activité.

En fonction des gènes ciblés par le facteur de transcription Δ FosB, son induction dans les neurones GABAergiques de la tVTA pourrait être impliquée soit dans l'augmentation soit dans la diminution des effets des psychostimulants via une action sur l'activité des neurones de la VTA à l'origine du système mésolimbique. Cependant, la part relative de ces deux effets n'est pas connue et de nouvelles recherches seront nécessaires afin de mieux comprendre les conséquences de l'expression de Δ FosB dans la tVTA sur la réponse aux psychostimulants.

3- Couplage entre activité électrophysiologique et induction des protéines Fos : exemple de la tVTA

Bien que l'induction neuronale des protéines Fos soit fréquemment associée à l'activité électrophysiologique des neurones, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, la cocaïne est responsable d'une inhibition des neurones du NAc (White et al., 1993), mais entraîne l'expression des protéines Fos dans la même structure (Hope et al., 1992). Ainsi, il pourrait exister un découplage entre l'activité électrophysiologique et l'activité moléculaire des neurones. La réponse des neurones de la tVTA à la cocaïne constituerait un exemple possible de cette dissociation dans le cadre de la réponse aux drogues (Lecca et al., 2011).

En réponse à la majorité des drogues addictives testées, il existe une corrélation entre l'induction des protéines Fos et l'activité des neurones de la tVTA. De même, en réponse à certaines drogues, il existe une corrélation entre l'absence d'induction des protéines Fos et une diminution de l'activité des neurones. Par exemple, l'administration intraveineuse de morphine n'entraîne pas d'induction des protéines Fos dans les neurones de la tVTA. D'un point de vue électrophysiologique, la morphine est responsable d'une inhibition de la fréquence de décharge des neurones de la tVTA, bloquée par la naloxone (Jalabert et al., 2011; Lecca et al., 2011). Des résultats similaires sont observés avec le THC. En effet, l'injection intrapéritonéale de THC n'entraîne pas d'expression de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA. Une injection intraveineuse de WIN55212-2, un agoniste des récepteurs des cannabinoïdes, entraîne une inhibition des neurones de la tVTA bloquée par le SR141716A, un antagoniste des récepteurs de type CB1 (Lecca et al., 2011). Dans le cas de la nicotine, il existe une corrélation entre l'induction des protéines Fos et l'augmentation de l'activité des neurones. En effet, deux études rapportent une induction potentielle de la protéine c-Fos au sein de neurones non dopaminergiques localisés dans la région de la VTA/tVTA (Pang et al., 1993; Zhao-Shea et al., 2011) en réponse à une administration de nicotine. L'injection intraveineuse de nicotine entraîne une excitation rapide des neurones de la tVTA bloquée par la mecamylamine, un antagoniste non sélectif des récepteurs nicotiques (Lecca et al., 2011).

Contrairement aux autres drogues testées, il pourrait exister dans le cas de la cocaïne une dissociation entre activité moléculaire sous forme de l'induction des protéines Fos et activité électrophysiologique. En effet, la cocaïne injectée en aiguë ou en chronique est responsable d'une induction des protéines FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA. Cependant, une injection intraveineuse de cocaïne semble entraîner une diminution de la fréquence des neurones GABAergiques composant cette structure (Lecca et al., 2011), bien que cela reste à confirmer.

Les couplages/découplages entre activité moléculaire et électrophysiologique observés au sein de la tVTA en réponse aux drogues reflètent ce qui est observé pour les autres structures cérébrales en réponse à des stimuli variés : bien que l'induction des

protéines Fos corresponde souvent à l'activité des neurones, il ne s'agit pas d'une règle générale.

Chapitre 2 :

Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons

Circuits neuronaux sous-tendant l'action aiguë de la morphine sur les neurones dopaminergiques

Marion Jalabert, Romain Bourdy, Julien Courtin, Pierre Veinante, Olivier J. Manzoni, Michel Barrot et François Georges

A- Contexte: Influence des opioïdes sur les neurones de la VTA

Les neurones de la VTA, à l'origine de la voie mésocorticolimbique, sont des cibles importantes pour les propriétés renforçantes des opiacés et des autres drogues d'abus (Wise, 1990; Koob, 1992; Self and Nestler, 1995). Les opioïdes sont responsables de nombreux changements au sein des neurones de la VTA. Ces changements comprennent des modifications moléculaires (Williams et al., 2001), électrophysiologiques (Gysling and Wang, 1983; Matthews and German, 1984; Zhang et al., 2008), structurales (Sklair-Tavron et al., 1996) à l'origine des effets comportementaux des opioïdes.

1- Conséquences physiologiques

a- Effets des opioïdes sur l'activité des neurones de la VTA

La fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA est augmentée en réponse à des injections systémiques ou locales de morphine (Gysling and Wang, 1983; Matthews and German, 1984; Williams et al., 2001). Les neurones dopaminergiques du mésencéphale sont excités, avec une augmentation de la fréquence 2 à 3 fois plus importante des neurones de la VTA en comparaison avec ceux de la SNc en réponse à une injection systémique de morphine, plaçant la VTA comme cible privilégiée des opiacés (Matthews and German, 1984). Une injection systémique aiguë de morphine est suffisante pour entraîner une augmentation de la fréquence de décharge, des bouffées de potentiels d'action (ou "bursts") et des oscillations lentes des neurones dopaminergiques de la VTA chez le rat, et ce pendant au moins trois jours (Zhang et al., 2008). Les opioïdes entraînent une augmentation de la fréquence des neurones dopaminergiques de la VTA mais également une inhibition de la fréquence des inter-neurones GABAergiques de la VTA qui leurs envoient des projections inhibitrices (Johnson and North, 1992). Ces effets opposés sur les neurones dopaminergiques et GABAergiques ont contribué à la mise en évidence du rôle crucial de la transmission GABAergique au sein de la VTA dans les effets des opioïdes sur les neurones dopaminergiques.

Ces résultats électrophysiologiques ont conduit au « modèle de désinhibition » de l'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Selon ce modèle : dans la VTA, les interneurones GABAergiques inhibent de manière tonique les neurones dopaminergiques et les opioïdes excitent les neurones dopaminergiques via l'inhibition des neurones GABAergiques par leur action sur les récepteurs des opioïdes de type mu (Johnson and North, 1992). Dans leur article, Johnson et North montrent, par une approche d'électrophysiologie *in vitro*, que la met-enképhaline et le DAMGO (D-Ala, N-MePhe, Gly-ol enképhaline), un agoniste des récepteurs de type mu, sont responsables d'une

hyperpolarisation des interneurons GABAergiques de la VTA, montrant ainsi que cette hyperpolarisation dépend des récepteurs de type mu exprimés par les neurones de la VTA. Cette découverte a permis d'établir un lien entre les opioïdes, le système GABAergique et les neurones dopaminergiques de la VTA.

b- Conséquences sur le système mésolimbique

Une injection aiguë de morphine ou d'agonistes des récepteurs mu augmente la libération de dopamine dans le NAc (Di Chiara and Imperato, 1988a; Spanagel et al., 1990). Cette action est spécifique des récepteurs de type mu, car les agonistes des récepteurs kappa sont responsables d'une diminution de la libération de dopamine dans la même structure (Di Chiara and Imperato, 1988b). En réalité, c'est l'effet indirect des opioïdes sur le mode de décharge en bouffées de potentiels d'action des neurones dopaminergiques de la VTA qui est responsable de l'augmentation des taux de dopamine dans le NAc (Grenhoff et al., 1986; Spanagel et al., 1990; Kiyatkin and Rebec, 2001). Ces molécules exercent en partie leur effet renforçant par ce biais. De plus, l'action des opiacés sur l'activité des neurones dopaminergiques est responsable d'une modification de l'activité des neurones du striatum ventral. En effet, l'injection de morphine dans la VTA entraîne une inhibition dépendante de la dopamine des neurones spontanément actifs de la coquille du NAc (Hakan and Henriksen, 1989). D'un point de vue moléculaire, les récepteurs mu exprimés par les neurones de la VTA sont impliqués dans l'activation, sous forme de l'induction de protéines Fos, des neurones du complexe striatal en réponse à des injections systémiques de morphine (Bontempi and Sharp, 1997). Ces résultats indiquent que les opioïdes influencent la fonction du système mésolimbique en modifiant le mode de décharge des neurones dopaminergiques à travers leur action sur les récepteurs mu exprimés au sein de la VTA. Cependant, les opioïdes peuvent également agir et exercer leurs effets renforçant indépendamment des récepteurs mu mésencéphaliques, en agissant par exemple directement sur les neurones du striatum ventral (Le Merrer et al., 2009).

2- Effets comportementaux des opioïdes : rôle des récepteurs mu et GABA_A de la VTA

Les récepteurs des opioïdes de type mu exprimés dans la VTA participent aux effets comportementaux des opioïdes. Les animaux s'auto-administrent des agonistes des récepteurs mu directement dans la VTA (Bozarth and Wise, 1981; Devine and Wise, 1994) et les conséquences comportementales d'injections d'opioïdes dans la VTA comprennent des effets locomoteurs ainsi que des effets comportementaux associés à la récompense. Cependant, il existe des différences en fonction du niveau d'antéropostériorité du site d'injection (Sanchez-Catalan et al., 2014). Par exemple, les effets locomoteurs sont plus importants lorsque les injections sont réalisées dans la VTA postérieure en comparaison

avec des injections dans la VTA antérieure (Zangen et al., 2002) et les effets sur la préférence de place conditionnée sont observés uniquement pour des injections d'opioïdes dans la VTA postérieure (Sanchez-Catalan et al., 2014). L'injection d'agonistes des récepteurs mu dans la VTA entraîne de la préférence de place conditionnée ((Phillips and LePiane, 1980; Bals-Kubik et al., 1993) et une augmentation de la consommation et de la recherche de nourriture (Jenck et al., 1986; Mucha and Iversen, 1986). A l'inverse, des injections d'antagonistes des récepteurs de type mu dans la VTA ont un effet opposé sur les comportements associés à la récompense en diminuant par exemple la préférence de place conditionnée à la cocaïne (Soderman and Unterwald, 2008).

D'un point de vue comportemental, l'injection d'agonistes des récepteurs mu dans la VTA a des conséquences similaires à des injections d'antagonistes des récepteurs GABA_A. En effet, les animaux s'auto-administrent des antagonistes des récepteurs GABA_A dans la VTA (David et al., 1997) et l'injection d'antagonistes des récepteurs GABA_A dans la VTA augmente l'activité locomotrice, un effet bloqué par une administration systémique d'antagoniste des récepteur D1 (Mogenson et al., 1979). De plus, l'injection dans la VTA d'antagoniste des récepteurs GABA_A produit une préférence de place conditionnée (Laviolette and van der Kooy, 2004; Laviolette et al., 2004). Ces résultats comportementaux peuvent s'expliquer par le modèle de désinhibition décrit précédemment (Johnson and North, 1992).

B- Objectifs

Les neurones GABAergiques de la tVTA expriment les récepteurs des opioïdes de type mu (Jhou et al., 2009b). Ces neurones projettent de façon massive sur les neurones dopaminergiques de la VTA à l'origine du système mésolimbique (Kaufling et al., 2010) et inhibent les neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca et al., 2011). De manière intéressante, des injections de morphine localisées dans la tVTA sont responsables d'une inhibition de la fréquence des neurones GABAergiques qui la composent (Lecca et al., 2011). Ces données suggèrent une implication potentielle des neurones de la tVTA dans le modèle de désinhibition proposé par Johnson et North (Johnson and North, 1992). L'objectif de cette étude était de vérifier l'hypothèse selon laquelle la morphine excite les neurones dopaminergiques de la VTA en inhibant les neurones GABAergiques de la tVTA et de localiser les récepteurs mu exprimés par ces neurones. Le rôle de la transmission glutamatergique dans cette inhibition a également été étudié.

C- Méthodes

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé des techniques variées comprenant une approche d'électrophysiologie *in vivo*, des expériences de traçage en neuroanatomie et

une approche d'inactivation neuronale ciblée. Ces techniques ont permis de disséquer un circuit neuronal impliquant la tVTA et responsable de l'action aiguë de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA.

D- Résultats

L'injection de picrotoxine (un antagoniste GABA_A) dans la VTA entraîne une augmentation de la fréquence de décharge et des bouffées de potentiels d'action (« bursts ») des neurones dopaminergiques, confirmant *in vivo* qu'il existe un contrôle inhibiteur GABAergique tonique sur les neurones dopaminergiques de la VTA. L'inhibition de la tVTA par l'injection locale de muscimol bodipy (un agoniste marqué des récepteurs GABA_A) est responsable d'une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA, indiquant que ces neurones sont soumis à un contrôle inhibiteur tonique provenant de la tVTA. L'administration systémique ou intra-VTA de morphine entraîne une augmentation de la fréquence de décharge, des bursts et du nombre de potentiels d'action par burst des neurones dopaminergiques de la VTA. Cet effet dépend des récepteurs mu exprimés au sein de la VTA car il est bloqué par une infusion de naltrexone, un antagoniste des récepteurs des opioïdes, directement dans la VTA. Les neurones GABAergiques de la tVTA projetant sur les neurones de la VTA expriment les récepteurs mu au niveau de leurs corps cellulaires et de leurs axones et répondent à la morphine de façon opposée aux neurones dopaminergiques de la VTA. Lors d'une inactivation sélective de la tVTA, une injection locale de morphine dans la VTA perd son effet sur les neurones dopaminergiques. L'activité de la tVTA est donc nécessaire pour l'effet activateur de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Une infusion d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA du glutamate (CNQX+AP5) dans la VTA empêche l'excitation des neurones dopaminergiques de la VTA induite par la morphine, suggérant que la transmission glutamatergique dans la VTA est essentielle pour l'effet excitateur de la morphine sur les neurones dopaminergiques *in vivo*.

E- Contribution

En 2011, nous étions à la recherche de nouveaux marqueurs dans le but de délimiter les contours de la tVTA de manière plus précise. J'ai alors eu l'occasion de tester un nouvel anticorps dirigé contre les récepteurs mu qui fonctionnait. Le marquage était correct chez les souris naïves et absent chez des souris KO pour le récepteur mu. De plus, le marquage mu couvrait la tVTA sur l'ensemble de son antéropostériorité chez le rat. Pendant la même période, à Bordeaux, François Georges et Marion Jalabert, son étudiante en thèse, travaillaient sur cet article ; ils avaient réalisé la quasi-totalité des expériences d'électrophysiologie. Ils souhaitaient obtenir des images de la répartition des récepteurs mu sur la tVTA afin de compléter leurs résultats. J'ai alors réalisé des expériences de

traçage dans lesquels j'ai injecté du dextran amine biotinylé (BDA) dans la tVTA ou le fragment β de la toxine cholérique (CTb) dans la VTA. Après différentes immunohistochimies, les coupes ont été observées au microscope confocal et nous avons pu visualiser la localisation des récepteurs mu sur les neurones de la tVTA. Cette collaboration m'a également permis de réaliser un premier séjour à Bordeaux dans le laboratoire de François Georges au cours duquel j'ai pu apprendre les bases de l'électrophysiologie *in vivo* dans les meilleures conditions.

Dans cet article, j'ai réalisé les expériences et les images des figures 2 et S1 de l'article et les images et l'immunohistochimie de la figure S3 de l'article.

F- Article : Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons

Circuits neuronaux sous-tendant l'action aiguë de la morphine sur les neurones dopaminergiques

Marion Jalabert, Romain Bourdy, Julien Courtin, Pierre Veinante, Olivier J. Manzoni, Michel Barrot and François Georges

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105418108

PNAS September 27, 2011 vol.108 no.39

Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons

Marion Jalabert^{a,b,1}, Romain Bourdy^{c,d,1}, Julien Courtin^{a,b}, Pierre Veinante^{c,d}, Olivier J. Manzoni^e, Michel Barrot^{c,d,2}, and François Georges^{a,f,2,3}

^aUniversité de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; ^bNeurocentre Magendie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U862, F-33076 Bordeaux, France; ^cInstitut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 67084 Strasbourg, France; ^dUniversité de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France; ^eInstitut de Neurobiologie de la Méditerranée, Pathophysiology of Synaptic Plasticity Group, INSERM U901, 13009 Marseille, France; and ^fInstitut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS Unité Mixte de Recherche 5297, F-33076 Bordeaux, France

Edited by Floyd Bloom, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, and approved August 23, 2011 (received for review April 5, 2011)

Morphine is a highly potent analgesic with high addictive potential in specific contexts. Although dopamine neurons of the ventral tegmental area (VTA) are widely believed to play an essential role in the development of drug addiction, neuronal circuits underlying morphine action on dopamine neurons have not been fully elucidated. Here we combined in vivo electrophysiology, tract-tracing experiments, and targeted neuronal inactivation to dissect a neural circuit for acute morphine action on dopamine neurons in rats. We found that in vivo, morphine targets the GABAergic tail of the VTA, also called the rostromedial tegmental nucleus, to increase the firing of dopamine neurons through the activation of VTA μ opioid receptors expressed on tail of the VTA/rostromedial tegmental nucleus efferents. Our data also reveal that in the absence of VTA glutamatergic tone, there is no morphine-induced activation of dopamine neurons. These results define the anatomical organization and functional role of a neural circuit for acute morphine action on dopamine neurons.

glutamate | NMDA | AMPA | GABAA | in vivo recordings

Dopamine (DA) neurons within the ventral tegmental area (VTA) play a central role in motivated behaviors (1, 2), natural reward processing (3, 4), and development of drug addiction (5, 6). Addictive properties of opiates (e.g., morphine, heroin) rely on μ opioid receptor (μ OR) activation (7) and are probably associated with their ability to activate VTA-DA neurons (8). γ -Aminobutyric acid (GABA) transmission in the VTA is critical for morphine-induced activation of DA neurons (9). Indeed, a broadly accepted circuit model for morphine action on DA neurons suggests that morphine excites VTA-DA neurons by a disinhibitory mechanism involving neighboring GABA neurons (10).

A newly defined structure with dense μ OR immunoreactivity (11), the tail of the VTA (tVTA), also called the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), has recently been proposed to be a potential inhibitory control center for dopaminergic activity (12–14). However, it remains unclear whether μ OR activation on tVTA/RMTg GABA neurons can account for morphine-induced activation of VTA-DA neurons.

In addition to potent tonic GABAergic modulation (15), VTA-DA neurons receive glutamatergic inputs from diverse brain nuclei (16) and from VTA glutamatergic neurons (17). One role of this glutamatergic influence is to mediate a switch from pacemaker to high-frequency bursts of activity, leading to a large increase in DA release in target areas (18, 19). Glutamate transmission is a key component of the regulation of dopamine cells and is known to play an important role in the actions of many drugs of abuse (1, 5). In the VTA, the persistent potentiation of DA neuron excitatory synapses contributes to pathological drug-seeking behavior (5). Furthermore, several lines of evidence also indicate a critical role for VTA glutamate receptors in morphine rewarding properties (20–23), but the crucial role of VTA glutamatergic transmission for in vivo effects of morphine on DA neurons has not been demonstrated.

In the present study, we used tract-tracing approaches and in vivo electrophysiological recordings to demonstrate that morphine-induced excitation of VTA-DA neurons results from an inhibition of the tVTA/RMTg GABAergic tone and is dependent on NMDA/AMPA receptor activation within the VTA.

Results

Morphine-Induced Activation of VTA-DA Neurons Is Mediated by μ Opioid Receptors Expressed on tVTA/RMTg Efferents. The majority of the afferents to DA neurons are GABAergic and inhibitory (24), and it has been demonstrated in ex vivo preparations that GABAergic inputs control the firing pattern of DA neurons (25). We recorded extracellular activity from single VTA-DA neurons identified according to their electrophysiological properties (*SI Materials and Methods*) and their neurochemical identity through single-cell labeling and immunohistochemistry (Fig. S1 and Fig. 1D–F). Here we show that picrotoxin (GABA_A receptor antagonist) microinfusion within the VTA produced an increase in firing rate (+59.3%) and bursting activity (+123.4%) of VTA-DA neurons (Fig. S2A–C). These results confirmed in vivo that the firing pattern of VTA-DA neurons is tonically controlled by GABAergic inputs (25, 26). Previous work demonstrated that the tVTA/RMTg, a GABAergic structure, projects mainly onto VTA-DA neurons (12, 13). A recent in vivo electrophysiological study showed that tVTA/RMTg stimulation was able to phasically silence VTA-DA neurons (14). To examine the impact of tVTA/RMTg activity on tonic VTA-DA neurons in vivo, we selectively inhibited tVTA/RMTg neurons using microinjection of a labeled GABA_A receptor agonist (muscimol-bodipy). Like picrotoxin infusion within VTA, tVTA/RMTg inactivation produced a marked increase in firing rate (+34%) and bursting rate (+67%), but also in the number of spikes per burst (+16%) of VTA-DA neurons (Fig. S2D–F). In addition to a phasic influence of the tVTA/RMTg onto VTA-DA neurons (14), our results show that VTA-DA neurons are under tonic inhibitory control originating in the tVTA/RMTg.

Opiates have powerful reinforcing actions within the VTA (27) and activate VTA-DA neurons through disinhibition processes (10). We examined in vivo the role of the VTA μ OR in morphine-induced activation of VTA-DA neurons. We confirmed that systemic morphine increased the impulse activity, bursting rate, and number of spikes per burst of VTA-DA neurons (Fig. 1G) (28),

Author contributions: M.B. and F.G. designed research; M.J., R.B., J.C., P.V., and F.G. performed research; M.J., R.B., J.C., and F.G. analyzed data; and M.J., R.B., O.J.M., M.B., and F.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹M.J. and R.B. contributed equally to this work.

²M.B. and F.G. contributed equally to this work.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: francois.georges@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1105418108/-DCSupplemental.

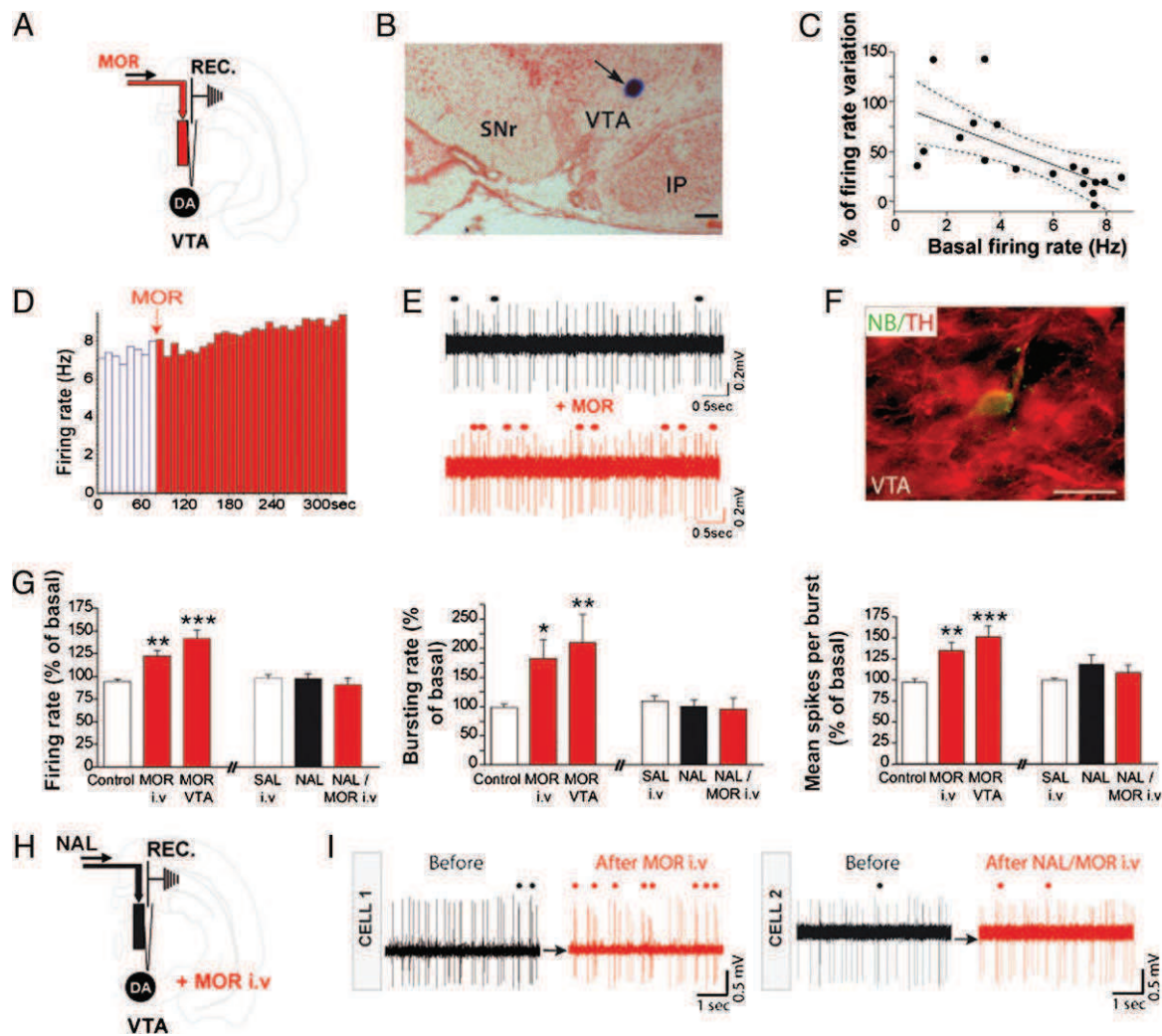


Fig. 1. Morphine-induced excitatory effects on VTA-DA neurons involve intra-VTA μ ORs. (A) Experimental protocol. (B) Microphotograph of a coronal section through the VTA showing the recording site (blue spot at arrow). IP, interpeduncular nucleus; SNr, substantia nigra pars reticulata. (Scale bar, 250 μ m.) (C) Firing rate in response to intra-VTA morphine as a function of the basal activity of VTA-DA neurons. There is a correlation between the variation of VTA-DA neuron-firing activity by morphine and the basal firing rate of VTA-DA neurons. Pearson's correlation calculation; Pearson's $r = -0.65$, $P < 0.01$. Solid line, regression curve; area between dotted lines, 95% confidence intervals; $n = 18$. (D–F) Example of VTA-DA neuron activity following an intra-VTA infusion of morphine (1 mg/mL, 60 nL). This neuron, juxtacellularly injected with neurobiotin (NB), was immunohistochemically identified as dopaminergic (TH; tyrosine hydroxylase). Individual channels for TH and NB are shown in Fig. S1. (Scale bar, 40 μ m.) (E) Representative traces before and after intra-VTA morphine infusion. Dots indicate burst occurrences. (G) Analysis of firing rate, bursting activity, and mean spikes per burst (i) after control conditions (saline i.v. condition pooled with intra-VTA artificial cerebrospinal fluid (aCSF) condition because of the lack of significant difference), after i.v. injection of morphine, and after intra-VTA morphine ejection, and (ii) after i.v. injection of saline, after intra-VTA naltrexone injection, and after i.v. morphine injection following naltrexone injection within the VTA. One-way ANOVA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$. Statistical analysis is shown in SI Materials and Methods. (H) Experimental protocol. (I) Representative traces of two VTA-DA neurons before and after i.v. morphine injection (cell 1) or after i.v. morphine injection following an intra-VTA injection of naltrexone (cell 2). Circles above traces represent burst occurrence.

and we observed similar effects with morphine delivery directly into the VTA (+47% for firing rate, +111% for bursting activity, and +54% for the number of spikes per burst) (Fig. 1). In line with the disinhibition model (10), we show that the magnitude of the morphine-induced activation of VTA-DA neurons was inversely correlated to their basal firing activity (Fig. 1C). A typical example of an individually recorded DA neuron labeled with neurobiotin and showing an increase in firing rate and bursting activity after intra-VTA morphine is reported in Fig. 1D–F. Furthermore, systemic morphine-induced activation of VTA-DA neurons was blocked by naltrexone infusion, an OR antagonist, within the VTA (Fig. 1H and I). Altogether, these experiments indicate that targeting VTA μ ORs is necessary for an *in vivo* excitatory effect of morphine on VTA-DA neurons.

Previous studies showed that tVTA/RMTg heavily projects to the VTA (11) and that it is a highly immunoreactive structure for μ ORs (11). Thus, we investigated whether tVTA/RMTg GABA neurons projecting to the VTA contain μ ORs. μ OR immunoreactivity was detected in the majority of GABAergic neurons of the tVTA/RMTg (Fig. 2A and Fig. S3). We traced tVTA/RMTg-VTA projection by injecting the anterograde tracer biotinylated dextran amine into the tVTA/RMTg (Fig. 2B) or the retrograde tracer cholera toxin B subunit into the VTA (Fig. 2C). μ OR immunoreactivity was detected within tVTA/RMTg anterogradely labeled axons in the VTA (Fig. 2B) and within 76% of retrogradely labeled cell bodies in the tVTA/RMTg (712/930 cells analyzed, $n = 5$ rats) (Fig. 2C). Supporting these anatomical data and consistent with a previous study (14), local infusion of morphine into the tVTA/

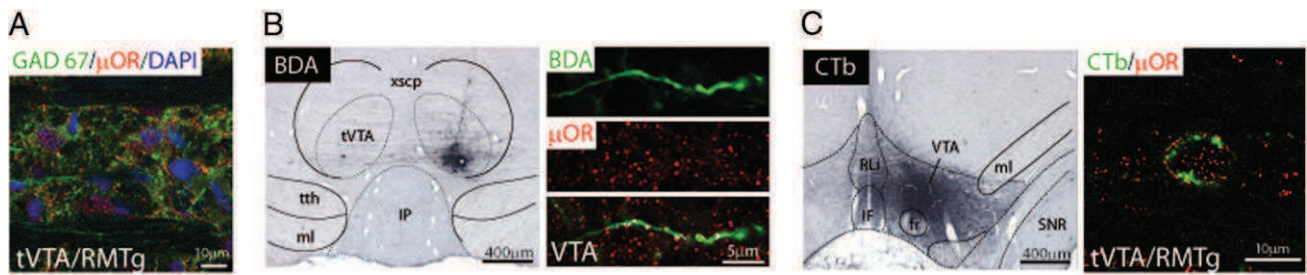


Fig. 2. tVTA/RMTg efferents in the VTA express μ ORs. (A) Microphotographs illustrating the GAD67 and μ OR double labeling in the tVTA/RMTg at a cellular level. GAD67, glutamic acid decarboxylase 67 kDa. (B) Following BDA injection into tVTA/RMTg (Left), μ ORs were detected within anterogradely labeled axons in the VTA (Right). (C) Following CTb injection into VTA (Left), μ ORs were observed in retrogradely labeled cell bodies in the tVTA/RMTg (Right). fr, fasciculus retroflexus; IF, interfascicular nucleus; ml, medial lemniscus; RLi, rostral linear nucleus of the raphe; th, trigeminothalamic tract; xscp, superior cerebellar peduncle decussation.

RMTg decreased the impulse activity of tVTA/RMTg neurons (-61% ; Fig. S4 D and E). Morphine was applied onto 6 of the 32 tVTA/RMTg recorded neurons. As previously shown (14), excitatory response at a short latency (<8 ms) evoked by lateral habenula (LHb) stimulation was used to identify tVTA/RMTg neurons (Fig. S4 A–C). VTA-DA and tVTA/RMTg neurons thus display an opposite response to morphine (Fig. S4 F), consistent with the hypothesis that an inhibition of tVTA/RMTg neurons by morphine may contribute to VTA-DA neuron excitation. During the recording of tVTA/RMTg neurons (Fig. S5), we established their electrophysiological signatures. The mean firing rate of recorded tVTA/RMTg neurons was 18.2 ± 3 Hz, the mean of interspike intervals was 73 ± 26 ms, and the mean duration of their action potential measured from peak to trough was 1 ± 0.03 ms, which is consistent with previous studies (12, 14). The basal firing rate of tVTA/RMTg neurons ranged from 1 to 60 Hz. Furthermore, histological controls confirmed the tVTA/RMTg location of all recorded neurons (Fig. S5 C and D). Finally, to directly address the contribution of tVTA/RMTg neurons in morphine-induced activation of VTA-DA neurons, we locally infused morphine onto VTA-DA neurons after selective inactivation of the tVTA/RMTg (Fig. 3 A and B). In this case, morphine failed to increase VTA-DA neuron activity (Fig. 3 C and D). Thus, morphine excitation of VTA-DA neurons in vivo requires the activity of GABAergic tVTA/RMTg neurons.

Mesencephalic Glutamatergic Transmission Is Required for the in Vivo Excitatory Effect of Morphine. tVTA/RMTg tonic activity appears important for morphine-induced responses of VTA-DA neurons. Does this result preclude a role for VTA glutamatergic transmission in the morphine effect? To address the implication of glutamatergic transmission in morphine-induced activation of VTA-DA neurons, we explored whether blocking ionotropic glutamate receptors in the VTA (Fig. 4 A) modulates the DA excitatory properties of morphine. In the VTA, NMDA and AMPA receptor activation was found to be necessary for morphine-conditioned place preference (21). In our study, blocking VTA NMDA and AMPA receptors produced a small but nonsignificant decrease in bursting activity (bursting rate, -21% ; number of spikes per burst, -7% ; $n = 12$). Whereas a systemic injection of morphine increased the firing and bursting activity of VTA-DA neurons (Fig. 4 B and D), an intra-VTA infusion of both AMPA and NMDA receptor antagonists prevented morphine-induced excitation of VTA-DA neurons (Fig. 4 C and D). These results suggest that VTA glutamatergic transmission is crucial for the in vivo excitatory effect of morphine.

Discussion

In line with the disinhibition model (10), our work reveals a neural circuitry for morphine action on VTA-DA neurons. We provide in vivo electrophysiological evidence showing that acute morphine

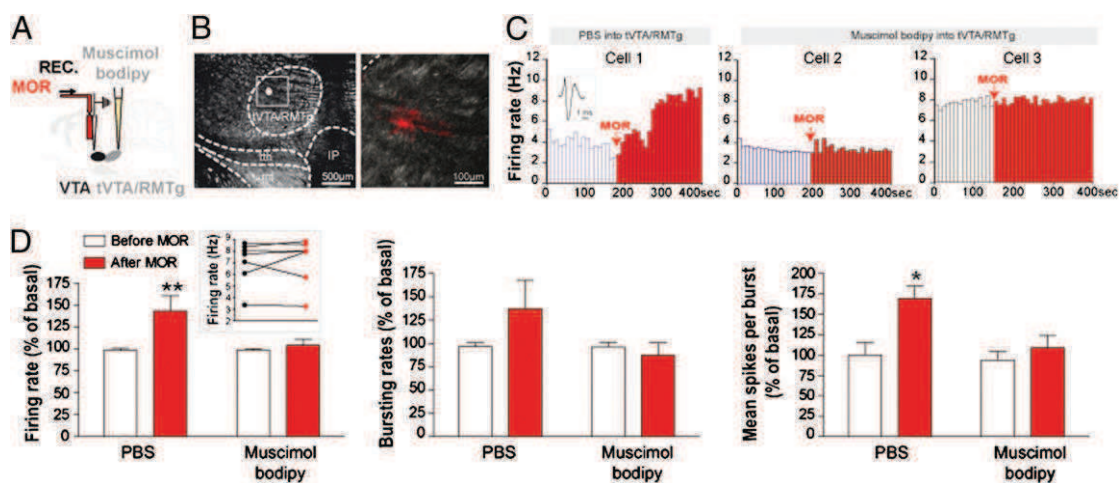


Fig. 3. tVTA/RMTg inactivation prevents morphine-induced excitatory effect on VTA-DA neurons. (A) Experimental protocol. (B) Dark-field images showing a muscimol-bodipy injection within tVTA/RMTg (white spot). (C) Examples of VTA-DA neuron activities following an intra-VTA infusion of morphine, after PBS (cell 1) or muscimol-bodipy infusion (cells 2 and 3) into the tVTA/RMTg. (Inset) A spike of a representative VTA-DA neuron. (D) After tVTA/RMTg inactivation, morphine failed to increase VTA-DA neuron activity. Graphs represent mean \pm SEM. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. (Inset) The firing rate of VTA-DA neurons before (black dots) and after morphine injection (red dots) following the inactivation of the tVTA/RMTg. Statistical analysis is shown in SI Materials and Methods.

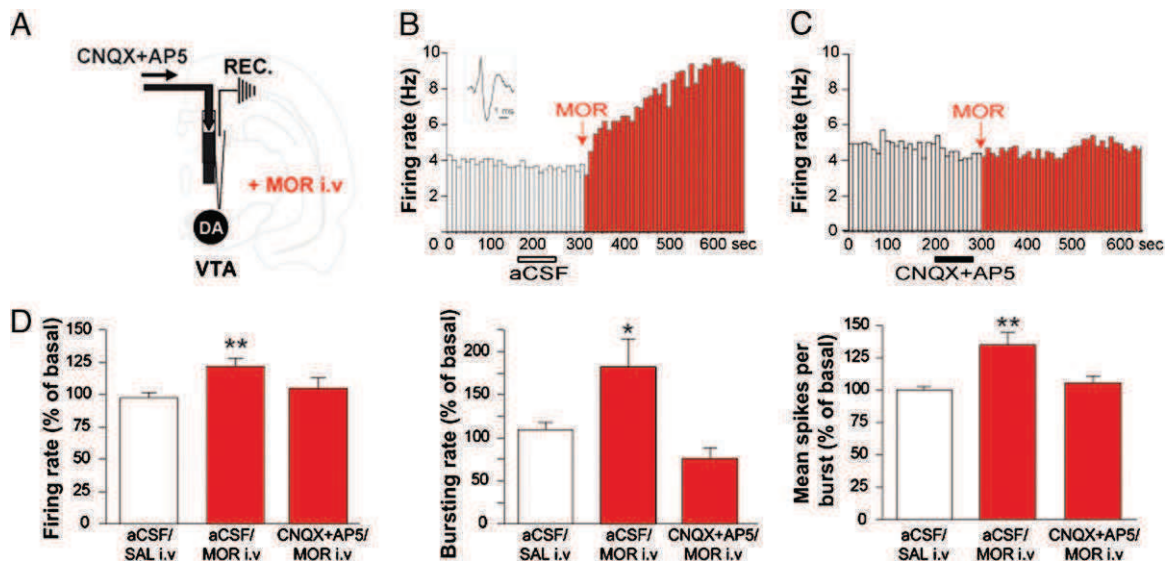


Fig. 4. Morphine activation of VTA-DA neurons depends on VTA glutamatergic tone. (A) Experimental protocol. (B and C) Example of systemic morphine effect on VTA-DA neurons following intra-VTA infusion of CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)+AP5 [(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid] or aCSF. (B) (Inset) A spike of a representative VTA-DA neuron. (D) Blockade of intra-VTA ionotropic glutamate receptors prevented systemic morphine-induced activation of VTA-DA neurons. Graphs represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Statistical analysis is shown in *SI Materials and Methods*.

targets the GABAergic tVTA/RMTg, disrupting the balance between inhibition and excitation on VTA-DA neurons. We show that the inhibition of tVTA/RMTg GABAergic transmission cannot be responsible alone for morphine excitatory effects on VTA-DA neurons, and that another component, VTA glutamatergic transmission, is required.

In this study, we confirmed anatomical data showing that VTA is under an important GABAergic input coming from the tVTA/RMTg (12, 13). We propose that the role of tVTA/RMTg may not be simply to suppress the spiking of single VTA-DA neurons (14) but also to change the pattern of activity of a large assembly of VTA-DA neurons leading to a new steady-state level of tonic activity (Fig. S2 D–F). Thus, inhibition of the tVTA/RMTg GABAergic tone by morphine could play a fundamental role in the synchrony of dopamine neurons to efficiently reset their tonic properties and thus facilitate the processing of learning signals (27). Our work shows that (i) intra-VTA infusion of morphine activates VTA-DA neurons, (ii) systemic morphine-induced activation of VTA-DA neurons is prevented by intra-VTA naltrexone, and (iii) inhibiting the tVTA/RMTg blocks the excitation of VTA-DA neurons by morphine. On this basis, we propose that morphine increases firing of VTA-DA neurons through the activation of VTA μ ORs expressed on afferents from the tVTA/RMTg. Another interpretation of the failure of morphine to excite VTA-DA neurons following tVTA/RMTg inactivation could be that VTA-DA neurons have reached their limits of discharge. However, this occlusion of response seems unlikely because (i) high-firing VTA-DA neurons (7–8 Hz) still show an increase in their activity after intra-VTA morphine (Fig. 1 C and D and Fig. S4F) and (ii) morphine also fails to increase the activity of slow-firing VTA-DA neurons after tVTA/RMTg inactivation (cell 2 in Fig. 3C).

The unique inhibitory neuronal pathway proposed for acute morphine's action on VTA-DA neurons is fully consistent with the disinhibition model proposed by Johnson and North (10). In fact, the *in vitro* recordings of this pioneer study have been performed in midbrain horizontal slices that most probably contain a significant amount of tVTA/RMTg neurons and the majority of the tVTA/RMTg terminal field. Moreover, the rostral-most third of the tVTA/RMTg is in fact embedded within the posterior VTA (29). So, an alternate interpretation of the Johnson and North

study would be that synaptic mechanisms previously attributed to VTA GABA-containing neurons may be mediated by efferents from tVTA/RMTg. VTA non-DA neurons are clearly hyperpolarized and inhibited by morphine (Fig. S6) (10). However, despite a moderate density of intrinsic GABAergic synaptic connections onto VTA-DA neurons (30), the physiological influence of local VTA-GABA neurons onto VTA-DA neurons is not evident. Three strong anatomical observations suggest a weak influence of VTA-GABA neurons on VTA-DA neuron activity. First, VTA-GABA neurons preferentially make synapses onto dendritic shafts of VTA-DA neurons (30), suggesting a preferential role in fine-tuning excitability rather than a drastic influence on spiking. Second, the close contacts of tVTA/RMTg terminals are on soma and proximal dendrites of VTA-DA neurons, confirming the strong influence of the tVTA/RMTg on VTA-DA neuron activity (Fig. S2 D–F) (14). Finally, in comparison with the other GABAergic sources of the VTA, GABA efferents from the tVTA/RMTg target VTA-DA neurons with a higher specificity (31). Moreover, a recent study using highly specific optogenetic stimulation demonstrated that nucleus accumbens GABA neurons, which are inhibited by a μ OR agonist, target VTA GABA-containing neurons but not VTA-DA neurons (32). This evidence supports our hypothesis that morphine increases the firing of VTA-DA neurons through the activation of VTA μ ORs expressed on tVTA/RMTg efferents and not on VTA GABA-containing neurons or nucleus accumbens efferents.

An important and somewhat unexpected finding from the present study is that blocking glutamatergic signaling in the VTA suppresses VTA-DA neuron excitation by morphine. This is consistent with studies reporting a critical role for VTA glutamate receptors in morphine rewarding properties (20–23). For instance, applying CNQX and AP5 within the VTA blocks the ability of morphine to establish conditioned place preference (21). In summary, morphine acts by disrupting the inhibition/excitation balance onto VTA-DA neurons. Indeed, our findings strongly indicate that morphine-induced excitation of VTA-DA resulted from simultaneous cessation of GABA receptor activation and NMDA/AMPA receptor activation. These inputs may thus work in series rather than in parallel, both inputs being necessary for morphine activation of VTA-DA neurons.

A common feature of all addictive drugs as well as stress is that they trigger adaptive synaptic plasticity in the VTA (33, 34). A single cocaine exposure, known to trigger synaptic plasticity in excitatory afferents onto VTA-DA neurons (34), also enhances opioid-induced affective responses through a circuit involving the VTA (35). Thus, in light of the present findings, it is tempting to propose that the amplitude of morphine's response on VTA-DA neurons may depend on the internal excitatory state of VTA-DA neurons. It will be important in future studies to test this idea by examining whether the excitatory context of dopamine neurons tunes the addictive potency of morphine.

Materials and Methods

Drugs. Systemic drug injection. Morphine hydrochloride (1 mg/kg) was administered intravenously.

Local drug microinjection. Double-barrel pipettes were used to infuse drugs during recordings (36). The microejected drugs were morphine hydrochloride (1 mg/mL), naltrexone (100 μ M), picrotoxin (1 mM), and a mixture of 100 μ M AP5 and 50 μ M CNQX. See *SI Materials and Methods* for details.

VTA and tVTA/RMTg Recordings. Stereotaxic surgeries were performed under halothane anesthesia. A glass micropipette was lowered into the VTA or

tVTA/RMTg. Extracellular single-unit recordings were performed as described previously (36). See *SI Materials and Methods* for details.

tVTA/RMTg Inactivation. An injection pipette was filled with GABA_A agonist ejected in the tVTA/RMTg. See *SI Materials and Methods* for details.

Electrical Stimulation of the Lhb. As previously shown (14), excitatory response evoked by Lhb stimulation was used to identify tVTA/RMTg neurons. See *SI Materials and Methods* for details.

Tract Tracing. The anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) and the retrograde tracer cholera toxin B subunit (CTb) were iontophoretically delivered as previously described (29). See *SI Materials and Methods* for details.

Histochemistry. Coronal sections were incubated using appropriate antibodies and processed for immunocytochemistry as previously described (29). See *SI Materials and Methods* for details.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. C. Herry for helpful discussions and comments and Lesley Graham for editorial assistance. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Région Aquitaine, Centre National de la Recherche Scientifique, and Université de Strasbourg.

- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 30:289–316.
- Wang DV, Tsien JZ (2011) Convergent processing of both positive and negative motivational signals by the VTA dopamine neuronal populations. *PLoS One* 6:e17047.
- Bayer HM, Glimcher PW (2005) Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron* 47:129–141.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36:241–263.
- Chen BT, et al. (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59:288–297.
- Ikemoto S, Wise RA (2004) Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):190–201.
- Pasternak GW, ed (2011) *The Opiate Receptors* (Humana, Totowa, NJ).
- Wise RA (1989) Opiate reward: Sites and substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 13:129–133.
- Madhavan A, Bonci A, Whistler JL (2010) Opioid-induced GABA potentiation after chronic morphine attenuates the rewarding effects of opioids in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 30:14029–14035.
- Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483–488.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513:566–596.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61:786–800.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) γ -Aminobutyric acid cells with cocaine-induced Δ FosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67:88–92.
- Lecca S, et al. (2011) Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36:589–602.
- Paladini CA, Tepper JM (1999) GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* 32:165–176.
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27:5730–5743.
- Dobi A, Margolis EB, Wang HL, Harvey BK, Morales M (2010) Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J Neurosci* 30:218–229.
- Gonon FG (1988) Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24:19–28.
- Zweifel LS, et al. (2009) Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7281–7288.
- Carlezon WA, Jr., et al. (1997) Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* 277:812–814.
- Harris GC, Wimmer M, Byrne R, Aston-Jones G (2004) Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience* 129:841–847.
- Popik P, Kolasiewicz W (1999) Mesolimbic NMDA receptors are implicated in the expression of conditioned morphine reward. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:288–294.
- Xi ZX, Stein EA (2002) Blockade of ionotropic glutamatergic transmission in the ventral tegmental area reduces heroin reinforcement in rat. *Psychopharmacology (Berl)* 164:144–150.
- Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ (2006) Excitability of dopamine neurons: Modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:79–97.
- Lobb CJ, Wilson CJ, Paladini CA (2010) A dynamic role for GABA receptors on the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 104:403–413.
- Ikemoto S, Kohl RR, McBride WJ (1997) GABA(A) receptor blockade in the anterior ventral tegmental area increases extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens of rats. *J Neurochem* 69:137–143.
- Rompé PP, Wise RA (1989) Opioid-neuroleptic interaction in brainstem self-stimulation. *Brain Res* 477:144–151.
- Georges F, Le Moine C, Aston-Jones G (2006) No effect of morphine on ventral tegmental dopamine neurons during withdrawal. *J Neurosci* 26:5720–5726.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597–621.
- Omelchenko N, Sesack SR (2009) Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 63:895–906.
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2011) The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol* 519:1143–1164.
- Xia Y, et al. (2011) Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 31:7811–7816.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577–582.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583–587.
- Kim JA, Pollak KA, Hjelmstad GO, Fields HL (2004) A single cocaine exposure enhances both opioid reward and aversion through a ventral tegmental area-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5664–5669.
- Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: A novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173–5187.

Supporting Information

Jalabert et al. 10.1073/pnas.1105418108

SI Materials and Methods

Animals. Ninety adult male Sprague–Dawley rats (275–300 g; Elvage Janvier) were used. They were housed three or four per cage under controlled conditions (22–23 °C, 40% relative humidity, a 12-h light/dark cycle with light on at 7:00 AM, and food and water ad libitum) and were acclimatized to laboratory conditions 1 wk before use.

Drugs. Systemic drug injection. The jugular vein was cannulated for i.v. administration of morphine hydrochloride (1 mg/kg) prepared in isotonic saline.

Local drug microinfusion. Double-barrel pipettes were used to infuse drugs while simultaneously recording ventral tegmental area (VTA) or the tail of the VTA (tVTA)/rostromedial tegmental nucleus (RMTg) firing activity (1). Microinjections were performed using brief pulses of pneumatic pressure allowing an ejection rate of 10 nL in 5 s (Picospritzer; Intracel). The microejected drugs in this study were morphine hydrochloride (1 mg/mL, 60 nL), naltrexone (100 μ M), picrotoxin (1 mM, 60 nL), and a mixture of 100 μ M AP5 and 50 μ M CNQX (60 nL) (Sigma-Aldrich) and artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 60 nL). All drugs were dissolved in aCSF.

Surgery. Stereotaxic surgeries for electrophysiology were performed under halothane anesthesia as previously described (1). Microelectrodes (recording and stimulating) and ejection pipettes were lowered into the VTA, the tVTA/RMTg, or the lateral habenula (LHb) at the following coordinates: VTA: –5.3 mm from bregma, 0.7 mm from midline, 7.5 mm from brain surface; tVTA/RMTg: –6.8 mm from bregma, 0.4 mm from midline, 7.4 mm from brain surface; LHb: –3.2 mm from bregma, 0.8 mm from midline, 4.5 mm from brain surface. Stereotaxic surgeries for tract-tracing experiments were performed under ketamine (87 mg/kg)/xylozine (13 mg/kg) anesthesia as previously described (2).

VTA and tVTA/RMTg Recordings. VTA-dopamine neuron recordings. A glass micropipette (tip diameter, 2–3 μ m; 4–6 M Ω) filled with 2% pontamine sky blue solution in 0.5 M sodium acetate was lowered into the VTA. VTA-DA (dopamine) neurons were identified according to well-established electrophysiological features (3, 4): (i) an action potential width \geq 1.1 ms (measured from the start of action potential to the negative trough); (ii) slow spontaneous firing rate (<10 Hz); (iii) single and burst spontaneous firing patterns (characterized by spike–amplitude decrement); and (iv) inhibition of spontaneous activity by DA receptor agonists and subsequent reversal by DA receptor antagonists (data not shown). Characteristic waveforms of VTA-DA neuron spikes are shown in the *Insets* of Figs. 3C and 4B. Through these electrodes, the extracellular potential was recorded with an Axoclamp2B amplifier (Axon Instrument) in the bridge mode versus a reference electrode maintained in contact with the skull. The extracellular potential amplified 10 times by the Axoclamp2B amplifier was further amplified 100 times and filtered (low-pass filter at 300 Hz and high-pass filter at 0.5 kHz) via a differential AC amplifier (model 1700; A-M Systems). Single-neuron spikes were discriminated and digital pulses were collected online using a laboratory interface and software (CED 1401, Spike2; Cambridge Electronic Design).

VTA-DA neuron juxtacellular labeling. A glass micropipette (tip diameter, 2–3 μ m; 4–6 M Ω) filled with 2% neurobiotin (Vector Labs; solution in 0.5 M sodium acetate) was lowered into the VTA. Recordings were similar to those described above for VTA-DA

neurons. Once the activity of a putative VTA-DA neuron was recorded, juxtacellular injection of neurobiotin was achieved, as previously described (5), by applying positive current pulses (1–4 nA, 500 ms, 50% duty cycle for 1–4 min) through the bridge circuitry of the amplifier.

tVTA/RMTg neuron recordings. A glass micropipette (tip diameter, 2 μ m; 10–12 M Ω) was lowered into the tVTA/RMTg. Recordings were similar to those described above for VTA-DA neurons.

tVTA/RMTg Inactivation. An injection pipette (tip diameter, 30 μ m) was filled with the GABA_A agonist muscimol covalently attached to a fluorescent tag (bodipy; Molecular Probes). For inactivation of tVTA/RMTg, 1 mg of muscimol-bodipy was dissolved in 2 mL of 0.01 M phosphate-buffered 0.9% saline (PBS) (0.8 mM; 500 nL). VTA-DA neuron recordings were performed during a 60-min period following the muscimol-bodipy infusion. One hour after tVTA/RMTg inactivation, rats were perfused and their brain collected to control the location and the extent of muscimol-bodipy infusion. Brain slices containing the tVTA/RMTg were imaged at 5 \times magnification in transmission light (black field) and at 40 \times magnification using a Leica DMR epifluorescence microscope.

Electrical Stimulation of the LHb. As previously shown (6), excitatory response at a short latency (<8 ms), evoked by LHb stimulation, was used to identify tVTA/RMTg neurons. Bipolar electrical stimulation of the LHb was conducted with a concentric electrode (250- μ m diameter overall, 100- μ m diameter inner electrode which extended 100 μ m beyond the outer electrode; Phymep). This electrode was inserted into the LHb. Electrical stimulation (0.2–1.0 mA, 0.5 Hz, 0.5-ms duration pulses) was administered using a square pulse stimulator (CED 1401, Spike2; Cambridge Electronic Design) and stimulus isolator (DS3; Digitimer). Responses to electrical stimulation of the LHb were evaluated and a peristimulus time histogram (PSTH) was generated online (Spike2 software; Cambridge Electronic Design) for each neuron.

Histology. At the end of each recording experiment, the electrode placement was marked with an iontophoretic deposit of pontamine sky blue dye (–20 μ A, continuous current for 12–15 min). To mark electrical stimulation sites, +20 μ A of positive current was passed through the stimulation electrode for 2 min. After dye ejection, rats were deeply anesthetized with halothane (5%) and decapitated. Brains were removed, snap-frozen in isopentane at –80 °C, sectioned (30- μ m coronal sections), mounted, and stained with neutral red to enable histological determination of recording and stimulation electrode sites.

Tract Tracing. The anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) (molecular weight 10,000; 5% in 0.25 M potassium acetate; Molecular Probes) or the retrograde tracer cholera toxin B subunit (CTb) (0.25% in 0.1 M Tris, 0.1% NaCl; Sigma) were iontophoretically delivered (1–6 μ A, 7-s on/off cycles for 15 min) with glass micropipettes (tip diameter, 10–40 μ m) as previously described (2).

Histochemistry. The rat perfusion was done under anesthesia 1–2 wk after surgery. Coronal sections of the brain (40- μ m) were obtained on a vibratome (VT1000S; Leica). BDA and neurobiotin histochemistry was done as described (2, 5, 7) with streptavidin Alexa Fluor 488 (Invitrogen; S32354; 1/400). Immunohistochemistry was done as previously described (2, 7). Primary antibodies were specific for CTb (Sigma; C3062; 1/20,000), μ -opioid receptor (Chemicon; AB1774; 1/5,000), tyrosine hydroxylase (TH) (Chemicon; AB1542; 1/500), or glutamic acid decarboxylase 67

kDa (GAD67) (Chemicon; MAB5406; 1/10,000). Fluorescent revelation was carried out with fluorophore-labeled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch; Cy3- or FITC-labeled antibodies from donkey; 1/400). Colorimetric revelation was carried out with a biotinylated secondary antibody (Vector Labs; anti-guinea pig; 1/200), avidin biotin peroxidase complex (ABC Elite; Vector Labs), and hydrogen peroxide with diaminobenzidine as chromogene.

Data Analysis. For in vivo electrophysiological experiments, three parameters of VTA-DA neuron impulse activity were computed before and after drug administration: firing rate, bursting rate (number of burst events over time), and mean number of spikes per burst (mean spikes per burst). The onset of a burst was defined as the occurrence of two spikes with an interspike interval <80 ms (3). Cumulative PSTHs (5-ms bin width) of VTA-DA neuron activity were generated during electrical stimulation of the LHB for each neuron recorded. Results are expressed throughout as mean \pm SEM. When two means were compared, the statistical significance of their difference was assessed using Student's *t* tests. For multiple comparisons, values were subjected to a one- or two-way ANOVA followed by post hoc Newman–Keuls tests. For tract-tracing experiments, microphotographs for fluorescence double labeling were taken using a Leica SP5 II confocal microscope. ImageJ (National Institutes of Health) was used to adjust contrast, brightness, and sharpness. For merged pictures, the plugin colocalization finder was used to point out the colocalized pixels in white. Counting analysis and juxtacellular identification were done using a Leica DMRD epifluorescence microscope. Microphotographs in direct light were taken using a Leica microscope with a digital camera. For these pictures, Adobe Photoshop 7.0 was used to adjust contrast, brightness, and sharpness. Abbreviations and structure limits are based on frontal diagrams from rat brain atlas (8).

Statistical Analysis. Fig. 1G: Analysis of the firing rate (% of basal firing rate) and bursting activity (% of basal bursting rate; % of the mean spikes per burst) of VTA-DA neurons after control conditions (saline i.v. condition pooled with intra-VTA aCSF condition because of the lack of significant difference), i.v. injection of morphine, and intra-VTA morphine ejection. Firing-rate values (%): control, 94.3 ± 2.6 , $n = 29$; i.v. morphine, 122.1 ± 6.1 , $n = 11$; intra-VTA morphine, 141.4 ± 9.5 , $n = 14$; one-way ANOVA, $F_{2,53} = 21.91$, $P < 0.0001$; post hoc Newman–Keuls tests, $**P <$

0.01 , $***P < 0.005$. Bursting-rate values (%): control, 98.6 ± 5.3 , $n = 29$; i.v. morphine, 182.3 ± 32.36 , $n = 11$; intra-VTA morphine, 209.5 ± 49.1 , $n = 14$; one-way ANOVA, $F_{2,53} = 6.02$, $P < 0.005$; post hoc Newman–Keuls tests, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. Mean spikes per burst values (%): control, 97.0 ± 4.4 , $n = 29$; i.v. morphine, 134.8 ± 9.9 , $n = 11$; intra-VTA morphine, 151.2 ± 13 , $n = 14$; one-way ANOVA, $F_{2,53} = 13.96$, $P < 0.0001$; post hoc Newman–Keuls tests, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$.

Fig. 3D: Analysis of the firing rate (% of basal firing rate) and bursting activity (% of basal bursting rate; % of the mean spikes per burst) of VTA-DA neurons after intra-tVTA/RMTg infusion of PBS or muscimol-bodipy followed by intra-VTA infusion of morphine. Firing-rate values (%): PBS intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $98.3 \pm 2.4/143.0 \pm 17.7$, $n = 5$; muscimol-bodipy intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $98.4 \pm 2.0/104.0 \pm 7.05$, $n = 7$; two-way ANOVA, $F_{1,20} = 8.6$ for interaction, $P < 0.05$; post hoc Newman–Keuls tests, $**P < 0.01$. Bursting-rate values (%): PBS intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $96.7 \pm 4.0/137.0 \pm 30.7$, $n = 5$; muscimol-bodipy intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $96.3 \pm 4.9/87.2 \pm 13.4$, $n = 7$; two-way ANOVA, $F_{1,20} = 1.03$, not significant. Mean spikes per burst values (%): PBS intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $100.0 \pm 15.4/169.2 \pm 15.4$, $n = 5$; muscimol-bodipy intra-tVTA/RMTg, before/after morphine, $93.7 \pm 10.9/108.9 \pm 15.3$, $n = 7$; two-way ANOVA, $F_{1,20} = 8.51$, $P < 0.01$; post hoc Newman–Keuls tests, $*P < 0.05$.

Fig. 4D: Analysis of the firing rate (% of basal firing rate), the bursting activity (% of basal bursting rate; % of the mean spikes per burst) of VTA-DA neurons, after intra-VTA infusion of aCSF or CNQX+AP5 followed by systemic injection of morphine (1 mg/kg i.v.) or an equal amount of saline 0.9%. Firing-rate values (%): aCSF-VTA/saline i.v., 97.7 ± 4.0 , $n = 13$; aCSF-VTA/morphine i.v., 122.1 ± 6.1 , $n = 11$; CNQX+AP5-VTA/morphine i.v., 105.1 ± 7.9 , $n = 6$; one-way ANOVA, $F_{2,29} = 5.75$, $P < 0.01$; post hoc Newman–Keuls tests, $**P < 0.01$. Bursting-rate values (%): aCSF-VTA/saline i.v., 109.7 ± 8.2 , $n = 13$; aCSF-VTA/morphine i.v., 182.3 ± 32.4 , $n = 11$; CNQX+AP5-VTA/morphine i.v., 76.1 ± 12.6 , $n = 6$; one-way ANOVA, $F_{2,29} = 5.47$, $P < 0.05$; post hoc Newman–Keuls tests, $*P < 0.05$. Mean spikes per burst values (%): aCSF-VTA/saline i.v., 100.0 ± 0.0 , $n = 13$; aCSF-VTA/morphine i.v., 134.8 ± 9.9 , $n = 11$; CNQX+AP5-VTA/morphine i.v., 105.6 ± 5.6 , $n = 6$; one-way ANOVA, $F_{2,29} = 8.92$, $P < 0.01$; post hoc Newman–Keuls tests, $**P < 0.01$.

- Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: A novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173–5187.
- Kauffling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513: 597–621.
- Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons—1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10: 301–315.
- Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* 303:2040–2042.
- Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113–136.
- Lecca S, et al. (2011) Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36:589–602.
- Kauffling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) γ -Aminobutyric acid cells with cocaine-induced Δ FosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67:88–92.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, San Diego, CA), 4th Ed.

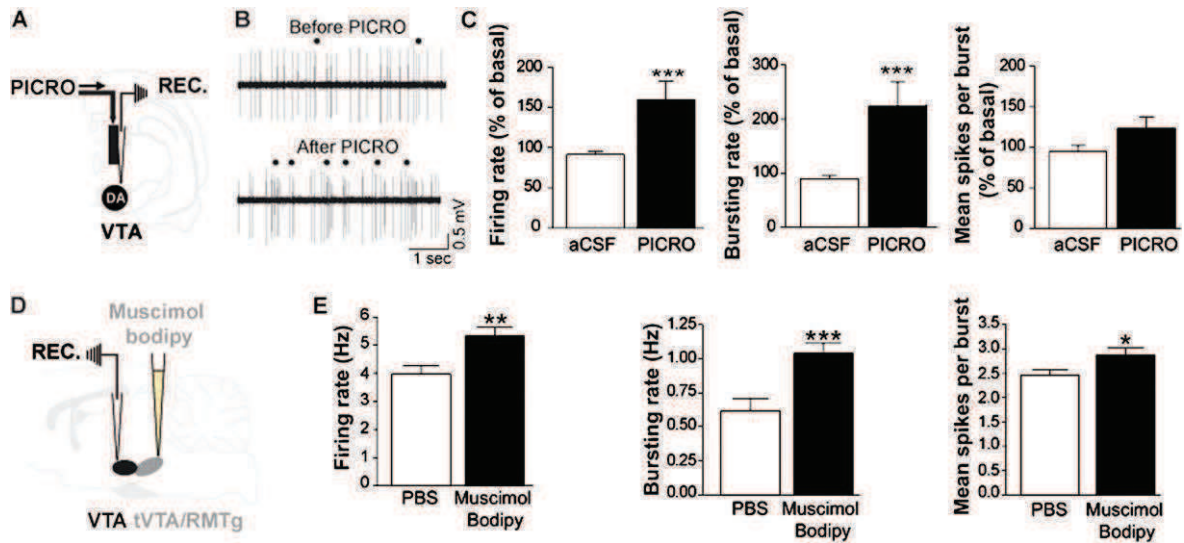


Fig. 52. tVTA/RMTg induced an inhibitory tone onto VTA-DA neurons. (A) DA neurons were recorded while microinjecting the GABA_A receptor antagonist picrotoxin (PICRO; 1 mM) or aCSF in their vicinity. Picrotoxin (60 nL) was microinfused through a pipette adjacent to the recording electrode. (B) Representative traces of a VTA-DA neuron before and after intra-VTA infusion of picrotoxin. Circles above traces represent burst occurrences. (C) Analysis of firing rate (% of basal), bursting activity (% of basal), and mean spikes per burst (% of basal) after intra-VTA ejection of aCSF (*n* = 16) or picrotoxin (*n* = 5). Injection of picrotoxin within the VTA increased the VTA-DA neuron firing rate (aCSF: 91.62 ± 3.4; picrotoxin: 159.3 ± 23.00; Student's *t* test, ****P* < 0.01) and bursting activity (aCSF: 91.86 ± 6.114; picrotoxin: 223.4 ± 45.15; Student's *t* test, ****P* < 0.005). Note that mean spikes per burst does not change after picrotoxin ejection. (D) tVTA/RMTg was inactivated by muscimol, a GABA_A agonist, covalently attached to a fluorescent tag (bodipy, 0.8 mM, 500 nL). The control experiment consisted of ejecting PBS within the tVTA/RMTg. VTA-DA neurons were recorded within the first hour following muscimol-bodipy (*n* = 54) or PBS (*n* = 44) infusion into tVTA/RMTg. (E) Inactivation of tVTA/RMTg increased VTA-DA neuron firing rate (PBS: 3.9 ± 0.3 Hz; muscimol-bodipy: 5.3 ± 0.3 Hz; Student's *t* test, ***P* < 0.01), bursting activity (PBS: 0.6 ± 0.1 Hz; muscimol-bodipy: 1.0 ± 0.08 Hz; Student's *t* test, ****P* < 0.005), and mean spikes per burst (PBS: 2.5 ± 0.2; muscimol-bodipy: 2.9 ± 0.2; Student's *t* test, **P* < 0.05).

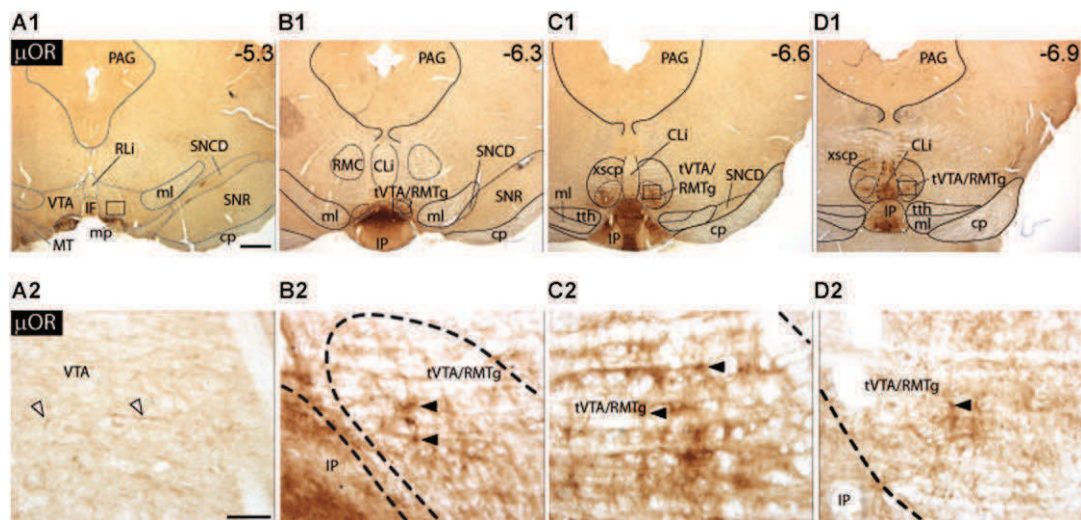


Fig. 53. μ opioid receptor (μOR) staining is detected throughout the rostrocaudal extent of the tVTA/RMTg. (A1–D1) Microphotographs illustrating μOR staining on coronal sections at the VTA (A1) and tVTA/RMTg (B1–D1) levels. (Scale bar, 500 μm.) (A2–D2) Magnifications of boxed areas in A1–D1 showing μOR-positive fibers in the VTA (white arrowheads) and μOR-positive cell bodies in the tVTA/RMTg region (black arrowheads). (Scale bar, 100 μm.) Numbers refer to the antero-posterior distance from the bregma in millimeters. Dashed lines indicate structures boundaries. CLI, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IF, interfascicular nucleus; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; mp, mammillary peduncle; MT, medial terminal nucleus of accessory optic tract; PAG, periaqueductal gray; RLI, rostral linear nucleus of the raphe; RMC, red nucleus, magnocellular part; SNCD, substantia nigra pars compacta dorsal part; SNR, substantia nigra pars reticulata; tth, trigeminothalamic tract; xscp, superior cerebellar peduncle decussation.

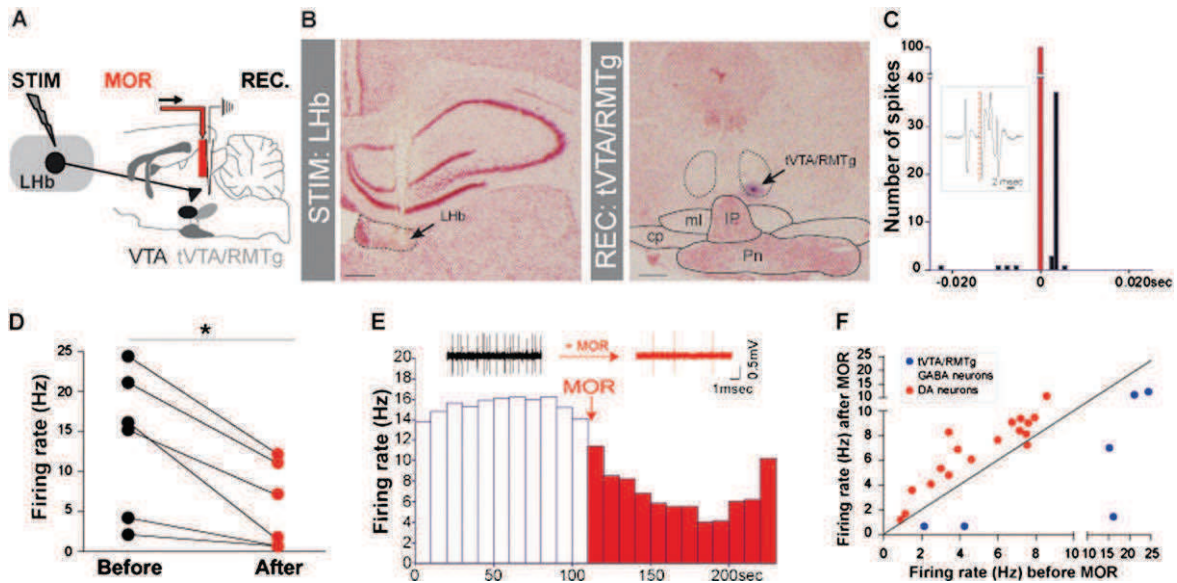


Fig. 54. Local infusion of morphine decreases tVTA/RMTg GABA neuron activity. (A) Experimental protocol. As previously shown (6), only tVTA/RMTg neurons with a robust excitatory response to Lhb stimulation were selected in this experiment. (B) (Left) Electrical stimulation site in the Lhb (lesioned area, black arrow). (Right) Recording location for a tVTA/RMTg neuron (blue spot, black arrow). (Scale bars, 500 μ m.) (C) Typical PSTH showing Lhb-evoked response in a VTA-DA neuron. Each bin represents 1 ms. In red is represented the bar corresponding to the stimulus artifact. (Inset) Orthodromic spikes evoked by stimulation of Lhb (red bar). (D) Effect of local infusion of morphine (1 mg/mL, 60 nL) on tVTA/RMTg neuron firing rate. Morphine infused locally induced a 61% decrease in tVTA/RMTg neuron firing rate. Firing-rate values (Hz): before morphine, 13.9 ± 3.7 , $n = 6$; after morphine, 5.5 ± 2.2 , $n = 6$; Student's t test, $*P < 0.05$. (E) Example of tVTA/RMTg neuron activity following an intra-tVTA/RMTg infusion of morphine (1 mg/mL, 60 nL). Above, two traces of the same tVTA/RMTg neuron before and after morphine ejection are represented. (F) Scatter plot depicting activity changes for VTA-DA (red dots) and tVTA/RMTg (blue dots) neurons following local morphine infusion. Pn, pontine nuclei.

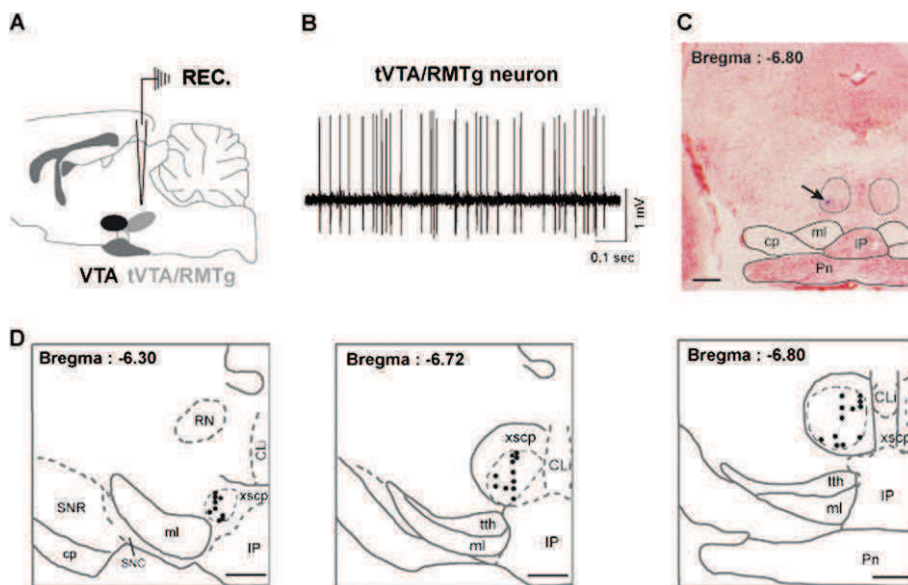


Fig. 55. Electrophysiological parameters for tVTA/RMTg neuron recordings. (A) Experimental protocol. (B) Trace of a representative tVTA/RMTg neuron. (C) Microphotograph of a coronal section through the tVTA/RMTg (dotted black line). Recording location for a tVTA/RMTg neuron (blue spot) at black arrow. (Scale bar, 500 μ m.) (D) Schematic presentation of neuronal recording sites in the tVTA/RMTg. tVTA/RMTg neurons are represented by black dots. Numbers refer to stereotaxic coordinates. RN, red nucleus. (Scale bars, 200 μ m.)

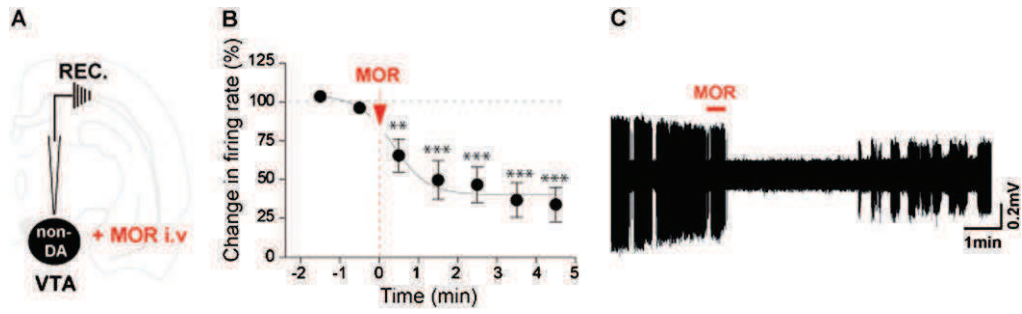


Fig. 56. Local morphine injection decreases non-DA VTA neuron activity. (A) Experimental protocol. (B) Effect of local morphine injection (1 mg/mL) on non-DA VTA neuron firing rate in function of time (min). A one-way ANOVA was performed on repeated measures followed by a Dunnet post hoc test. $P < 0.0001$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. (C) Traces of a non-DA VTA neuron before, during, and after morphine injection within the VTA. Note that morphine blocks its activity within minutes.

G- Discussion : Substrats neuroanatomiques clés pour l'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Figure 3)

1- Structures locales

a- Neurones GABAergiques de la tVTA

En parallèle de la publication de l'article, nos résultats ont été confirmés par le groupe de Williams par une approche de patch clamp (Matsui and Williams, 2011). Dans cet article, la stimulation optogénétique de la tVTA entraîne des courants post synaptiques inhibiteurs dépendants des récepteurs GABA_A dans les neurones dopaminergiques de la VTA et ces courants sont inhibés par le DAMGO, un agonistes des récepteurs mu. Ces résultats ont apporté la confirmation qu'il existait une connexion fonctionnelle GABAergique sensible aux opioïdes entre la tVTA et les neurones dopaminergiques de la VTA. Récemment, le même groupe a été plus loin dans l'étude du rôle de la tVTA dans la réponse aux opioïdes en montrant que parmi les afférences GABAergiques de la VTA sensibles à ces composés, la tVTA était la plus importante devant les neurones épineux moyens (MSNs) du NAc et les interneurones GABAergiques de la VTA. En effet, les entrées provenant de la tVTA sont inhibées de manière plus importante par les opioïdes que celles provenant des autres structures testées, démontrant un rôle prédominant de cette structure dans la désinhibition aiguë des neurones dopaminergique par les opioïdes (Matsui et al., 2014).

b- Interneurones GABAergiques de la VTA

La morphine est responsable d'une hyperpolarisation ainsi que d'une inhibition de la fréquence de décharge des interneurones GABAergiques de la VTA (Johnson and North, 1992; Jalabert et al., 2011). D'après nos résultats, la tVTA joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'action de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Cependant, il n'est pas exclu que les neurones GABAergiques de la VTA aient un rôle à jouer dans cette inhibition, notamment dans des mécanismes de régulation fine. Bien que les interneurones GABAergiques de la VTA semblent plutôt correspondre à des neurones de projection, ils émettent de nombreuses collatérales sur les neurones dopaminergiques locaux avant de projeter sur leurs structures cibles. D'un point de vue neuroanatomique, les terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de la VTA contactent les neurones dopaminergiques et GABAergiques de la VTA au niveau de leur arbre dendritique, ce qui est plus propice à une régulation fine (Omelchenko et al., 2009). En revanche, les neurones de la tVTA, réalisent leurs synapses sur les dendrites proximales et le soma des neurones

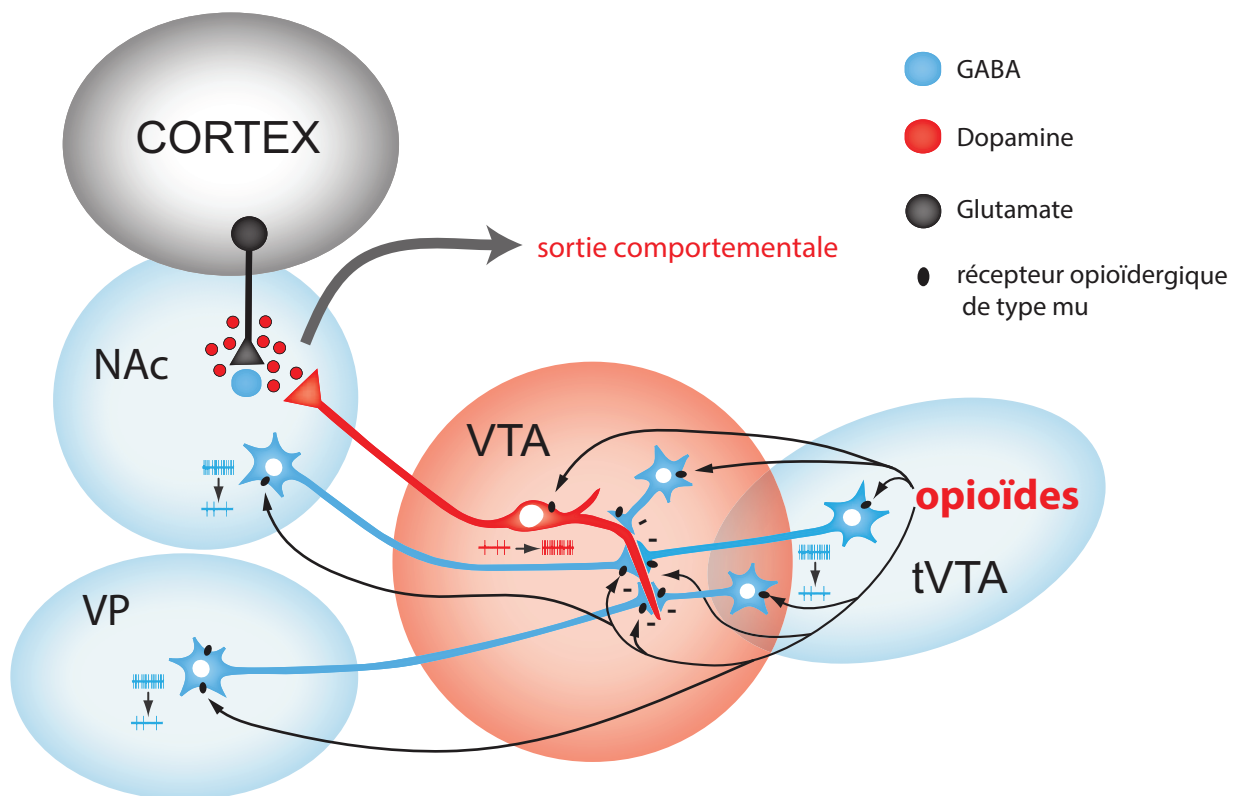


Figure 3 : Mise à jour du modèle de désinhibition de l'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA.

D'après le modèle de désinhibition original proposé par Johnson et North, les opioïdes augmentent la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA en hyperpolarisant et en diminuant la fréquence de décharge des interneurons GABAergiques de la VTA (Johnson and North, 1992). Ce modèle a ensuite été mis à jour par des études démontrant qu'en plus des interneurons GABAergiques de la VTA, les neurones GABAergiques de la tVTA jouent un rôle crucial dans ce mécanisme (Jalabert et al., 2011 ; Matsui et al., 2011 ; Bourdy and Barrot, 2012). En effet, l'inactivation ciblée de la tVTA est responsable d'une perte des effets excitateurs de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA. La tVTA semble être impliquée de manière prédominante dans l'action aiguë des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA en comparaison avec d'autres entrées GABAergiques de la VTA sensibles aux opioïdes comme les interneurons GABAergique de la VTA et les terminaisons GABAergiques du NAc (Matsui et al., 2014). De manière intéressante, il a été montré récemment que les opioïdes peuvent agir directement sur certains neurones GABA-ergiques et dopaminergiques de la VTA en les excitant ou en les inhibant (Margolis et al., 2014). L'excitation directe des neurones dopaminergiques de la VTA est possible, mais ne semble pas suffisante pour être responsable de l'excitation des neurones dopaminergiques observée en réponse aux opioïdes. La désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA par les opioïdes pourrait également être due à une action de ces composés sur les afférences GABAergiques provenant de structures externes comme le NAc et le VP. Le NAc envoie des projections GABAergiques sensibles aux agonistes des récepteurs mu sur les neurones de la VTA, mais cible de manière préférentielle les neurones GABAergiques (Xia et al., 2011). De plus, ces neurones semblent peu impliqués dans les effets aigus des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA . En effet, l'inhibition par la morphine des potentiels postsynaptiques inhibiteurs provoqués par une activation du NAc est plus de 2 fois moins importante que celle observée en réponse à une activation de la tVTA (Matsui et al., 2014). Le VP est une afférence GABAergique de la VTA sensible aux opioïdes. Comme la tVTA, cette structure cérébrale semble jouer un rôle important dans le mécanisme d'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Hjelmstad et al., 2013). Dans chaque cas, l'action des opioïdes par désinhibition des afférences GABAergiques sensibles à ces composés pourrait avoir lieu sur les corps cellulaires des neurones et/ou sur leurs terminaisons synaptiques localisées dans la VTA. La désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA par ces mécanismes pourrait conduire à une augmentation de la libération de dopamine dans le NAc, conduisant à une modulation des entrées corticales sur les neurones GABAergiques de cette structure, entraînant ainsi des modifications comportementales associées à la prise de drogue.

VTA : aire tegmentale ventrale ; **tVTA** : queue de l'aire tegmentale ventrale ; **NAc** : noyau accumbens ; **VP** : pallidum ventral.

dopaminergiques de la VTA (Balcita-Pedicino et al., 2011), ce qui est plus adapté à une régulation puissante de l'activité générale des neurones. De plus, des données récentes de la littérature confirment fonctionnellement ces données neuroanatomiques : les courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) observés dans les neurones dopaminergiques de la VTA suite à l'activation sélective de la libération de GABA à partir des interneurones GABAergiques sont quasiment insensibles à la morphine. En effet, l'inhibition de ces IPSCs par la morphine n'est que de 11%, alors qu'elle est de 46% lorsque les IPSCs sont provoqués par une stimulation optogénétique spécifique de la tVTA (Matsui et al., 2014). Bien que les interneurones GABAergiques de la VTA soient impliqués dans la régulation des neurones dopaminergiques de la VTA, ils semblent jouer un rôle mineur dans le mécanisme de désinhibition induit par les opioïdes.

c- Neurones de la VTA (Margolis et al., 2014)

Le modèle actuel du mode d'action des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA est celui d'une action indirecte via des entrées GABAergiques sensibles aux opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Récemment, ce modèle a été remis en question par une étude démontrant un mode d'action direct des opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, les neurones de la VTA expriment des récepteurs mu et l'application de DAMGO (agoniste des récepteurs mu) sur des tranches de cerveau contenant la VTA est responsable d'une excitation postsynaptique directe de 19,3 % des neurones de la tVTA dont 20 % de neurones dopaminergiques et ce malgré un blocage des récepteurs GABA_A. A l'opposé, le DAMGO est responsable d'une inhibition postsynaptique directe de 51,7% des neurones de la VTA, dont 40,9 % de neurones dopaminergiques. Il semble que la plupart des neurones de la VTA réagissent à de faibles doses de DAMGO par des inhibitions et excitations postsynaptiques concurrentes. Ces résultats indiquent que les agonistes des récepteurs mu peuvent agir directement sur les neurones de la VTA pour moduler l'activité des neurones GABAergiques et dopaminergiques. L'activation directe en local des récepteurs mu exprimés par les neurones dopaminergiques de la VTA peut à elle seule être responsable de leur excitation sans l'intervention d'une activation présynaptique des récepteurs mu exprimés par les terminaisons GABAergiques provenant d'autres structures. L'activation directe des récepteurs mu postsynaptiques nécessite une concentration moins élevée de DAMGO que celle des récepteurs présynaptiques des entrées GABAergiques. Cependant, bien que ce mécanisme existe, l'inhibition présynaptique des entrées GABAergiques semble essentielle pour l'effet de la morphine sur l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA. Nous avons montré que l'inactivation sélective *in vivo* de la tVTA supprimait l'excitation des neurones dopaminergiques de la VTA par la morphine. L'excitation des neurones dopaminergiques par désinhibition via l'activation des récepteurs mu exprimés par les afférences GABAergiques reste par conséquent un mécanisme d'action des opioïdes essentiel *in vivo* et la seule action directe des opioïdes sur les neurones de la VTA ne semble pas suffisante pour exciter les neurones dopaminergiques.

2- Structures externes

La tVTA joue un rôle important dans l'action de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Cependant, ces neurones reçoivent des entrées de structures GABAergiques externes sensibles aux opioïdes et capables d'influencer les neurones dopaminergiques de la VTA.

a- Le noyau accumbens

Si l'anatomie et la fonction des projections des neurones dopaminergiques de la VTA vers le NAc ont été largement étudiées, il existe moins de données sur les connexions réciproques entre le NAc et les neurones de la VTA. Les neurones GABAergiques de la VTA projettent sur le NAc. Une partie des MSNs du NAc projettent de façon réciproque sur la VTA (Kalivas et al., 1993). Les neurones GABAergiques du NAc, inhibés par les agonistes des récepteurs mu ciblent spécifiquement les neurones GABAergiques de la VTA (Xia et al., 2011). Ces caractéristiques neuroanatomiques sont opposées à ce qui est observé avec les neurones de la tVTA, qui ciblent les neurones dopaminergiques avec une plus grande spécificité (Balcita-Pedicino et al., 2011). De ce fait, il semble peu probable que l'inhibition des terminaisons ou des corps cellulaires des MSNs du NAc par les opioïdes soit responsable d'une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, une telle inhibition aurait pour effet d'exciter les neurones GABAergiques de la VTA, entraînant plutôt une inhibition des neurones dopaminergiques or ces neurones sont excités par les opioïdes. Cependant, les neurones GABAergiques de la VTA émettent également des collatérales sur des interneurones GABAergiques voisins ce qui pourrait entraîner une excitation des neurones dopaminergiques suite à une inhibition des MSNs projetant à la VTA par les opioïdes. Cette hypothèse reste peu probable dans la mesure où les interneurones GABAergiques de la VTA semblent eux même peu impliqués dans la désinhibition des neurones dopaminergiques induite par les opioïdes.

b- Le pallidum ventral (Hjelmstad et al., 2013)

Récemment, une étude a démontré que le pallidum ventral constituait une source externe de GABA jouant un rôle important dans la régulation des neurones dopaminergiques de la VTA par les opioïdes. Le pallidum ventral est une source importante d'opioïdes endogènes pour la VTA (Kalivas et al., 1993). La stimulation optogénétique des fibres provenant de cette structure entraîne la formation d'IPSCs dépendants des récepteurs GABA_A dans les neurones dopaminergiques de la VTA. L'application de DAMGO, un agoniste des récepteurs mu est responsable d'une diminution de ces IPSCs et d'une hyperpolarisation des neurones du pallidum ventral projetant à la VTA. Comme la tVTA, le pallidum ventral envoie des projections GABAergiques sensibles aux opioïdes sur les neurones dopaminergiques de la VTA. La stimulation de ces deux structures a des

conséquences similaires sur les IPSCs dépendants du récepteur GABA_A dans les neurones dopaminergiques de la VTA, inhibés par le DAMGO dans les deux cas. A l'heure actuelle, la tVTA et le pallidum ventral semblent être les entrées GABAergiques à la VTA les plus aptes à permettre l'action des opioïdes par désinhibition sur les neurones dopaminergiques de la VTA.

Chapitre 3 :

Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area

Contrôle de l'activité des neurones nigrostriataux et de la fonction motrice par la queue de l'aire tegmentale ventrale

Romain Bourdy, Maria -José Sanchez-Catalan, Jennifer Kaufling, Judith J Balcita-Pedicino, Marie-José Freund-Mercier, Pierre Veinante, Susan R Sesack, François Georges et Michel Barrot

A- Contexte bibliographique : les ganglions de la base

1- Anatomie des ganglions de la base

(Pour revue : Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, Part A1.)

a- Généralités

Les ganglions de la base, également appelés noyaux gris centraux, correspondent à un ensemble de structures cérébrales interconnectées servant de relais entre le cortex cérébral et des systèmes neuronaux impliqués dans le comportement. Parmi les structures effectrices ciblées par les ganglions de la base, on trouve des noyaux thalamiques projetant à leur tour sur des régions corticales jouant un rôle dans la planification et l'exécution de l'action ainsi que des structures mésencéphaliques comme les SC et le noyau tegmental pédonculopontin (PPN) impliqués respectivement dans l'orientation des yeux et le mouvement (Figure 4A). Les ganglions de la base projettent également sur l'hypothalamus, impliqué dans les fonctions autonomes. Les neurones corticaux ciblés par les ganglions de la base, impliqués dans la planification et l'exécution du mouvement, projettent à leur tour directement dans la moelle épinière pour générer le mouvement. Par leur connectivité, les ganglions de la base permettent la mise en place d'interactions entre des circuits fonctionnels variés, comme par exemple les systèmes limbiques et non limbiques. L'organisation fonctionnelle du cortex cérébral se retrouve au sein des ganglions de la base et les différents noyaux qui les composent projettent de manière organisée sur les structures effectrices.

Les ganglions de la base comprennent une partie dorsale, impliquée dans les processus moteurs qui nous intéresse ici, mais aussi une partie ventrale (NAc, pallidum ventral) impliquée dans les processus motivationnels et émotionnels.

Les ganglions de la base sont constitués d'un ensemble de structures, ayant chacune un rôle bien précis. Parmi ces structures, on trouve le striatum (noyau caudé et putamen), le segment externe du globus pallidus (GPe), le segment interne du globus pallidus (GPi), le noyau subthalamique (ST) et la substance noire comprenant la SNc et la SNr. Il existe des différences dans l'organisation neuroanatomique des ganglions de la base entre le rongeur et le primate. Par exemple, chez le primate, le noyau caudé et le putamen sont séparés par la capsule interne ce qui permet de les distinguer d'un point de vue anatomique. Chez le rongeur, cette démarcation n'existe pas, ce qui a conduit à attribuer à l'ensemble de ces deux noyaux le nom de caudé-putamen. Une autre différence majeure entre les rongeurs et les primates concerne le GPi. Chez le primate, ce noyau est situé à proximité du GPe, alors que chez le rongeur, il est séparé du segment externe. Bien que les fonctions de ce noyau chez le rongeur soient similaires à celles du GPi chez le primate, il a été nommé "noyau entopédonculaire".

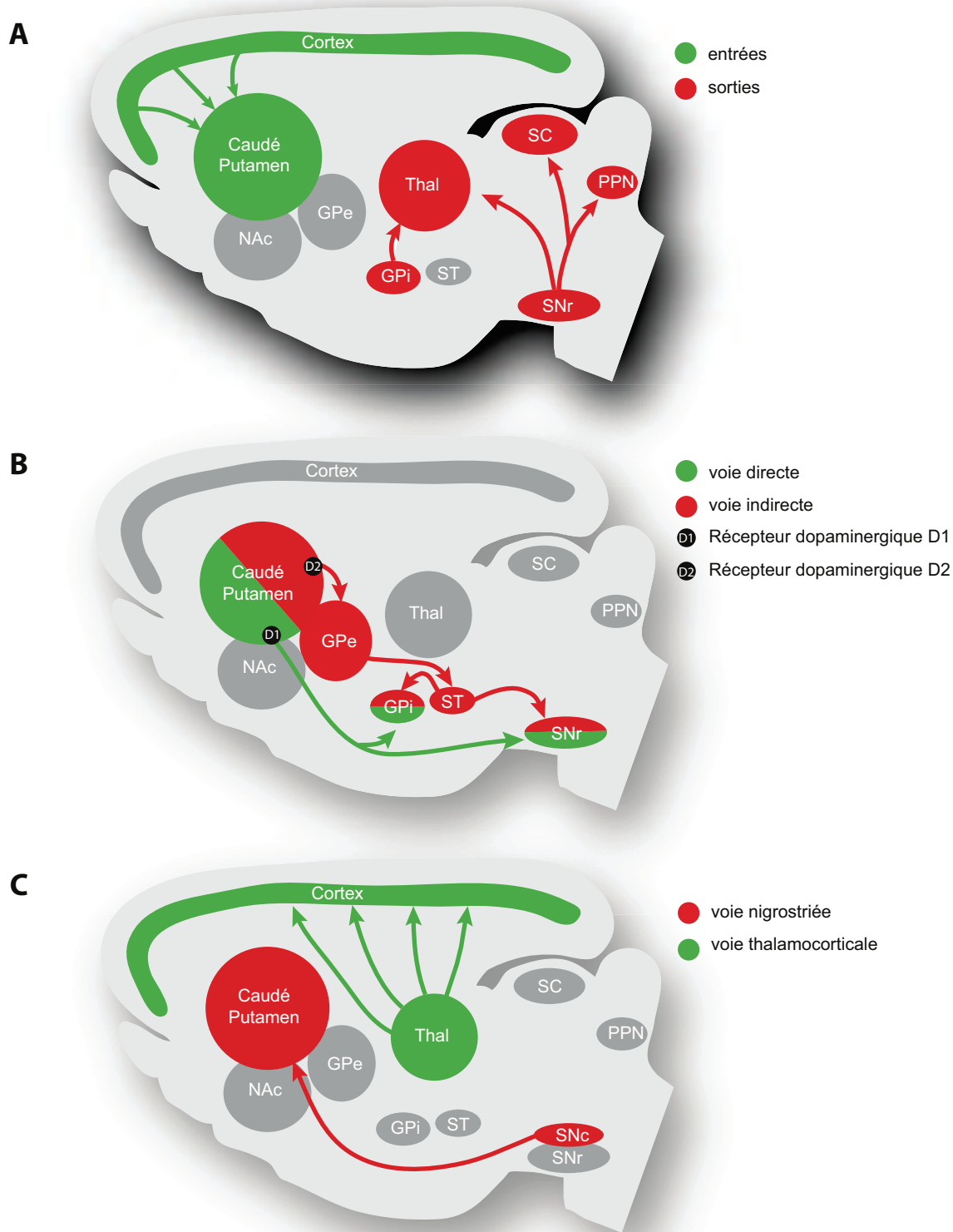


Figure 4 : Schéma représentant l'anatomie générale des ganglions de la base (Pour des raisons de clarté, seules les connexions principales sont représentées). **Figure 4A.** Entrées et sorties des ganglions de la base. Le cortex cérébral constitue l'entrée principale des ganglions de la base. Les noyaux de sortie des ganglions de la base sont le segment interne du globus pallidus (GPI) et la substance noire réticulée (SNr), qui projettent à leur tour au thalamus (Thal). En plus de ses projections thalamiques, la SNr projette aux collicules supérieurs (SC) au noyau tegmental pédonculo-pontin (PPN). **Figure 4B.** Voies directe et indirecte des ganglions de la base. Les neurones striatonigraux du noyau caudé/putamen exprimant les récepteurs dopaminergiques D1 forment la voie directe en projetant à la SNr et au GPI. Les neurones striatopallidaux du noyau caudé/putamen exprimant les récepteurs D2 sont à l'origine de la voie indirecte via leurs projections au segment externe du globus pallidus (GPe). Les neurones du GPe projettent ensuite au noyau subthalamique (ST). Le ST projette aux noyaux de sortie des ganglions de la base : le GPI et la SNr. **Figure 4C.** Rétrocontrôles des ganglions de la base. Le thalamus reçoit des afférences provenant des noyaux de sortie des ganglions de la base et projette au cortex. Les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) envoient leur projections dopaminergiques aux neurones du caudé/putamen.

b- Composantes des ganglions de la base et connectivité

b1- Le cortex cérébral

Bien que ne faisant pas partie des ganglions de la base, le cortex cérébral en constitue l'entrée majeure. Les neurones glutamatergiques de la couche 5 mais aussi de la couche 3 du néocortex (Figure 4A). Ces neurones sont localisés dans les cortex sensoriel, moteur, prémoteur et limbique. On distingue 2 sous-types de neurones : les neurones du tractus pyramidal corticostriatal, localisés dans le cortex frontal et projetant directement dans le tronc cérébral et la moelle épinière avec des collatérales vers le striatum, et les neurones corticostriataux interencéphaliques situés dans les régions corticales et projetant bilatéralement sur le cortex et le striatum. Ces deux types de neurones corticostriataux projettent sur des compartiments différents du striatum.

b2- Le striatum

Les projections corticales sur le striatum, ou voie corticostriatale, sont organisées de manière topographique et forment dans cette structure des territoires fonctionnels variés comprenant des territoires sensorimoteur, associatif et limbique. Ainsi, le striatum peut traiter et transmettre en parallèle des informations relatives à chaque territoire fonctionnel (Selemon and Goldman-Rakic, 1985; Donoghue and Herkenham, 1986; McGeorge and Faull, 1989). Cette organisation topographique est ensuite maintenue dans les projections striato-pallidales. Le striatum est composé à 95% de neurones GABAergiques de projection (Kita and Kitai, 1988) appelés neurones épineux moyens (MSNs). Les MSNs reçoivent également des afférences du thalamus, de l'amygdale et des neurones dopaminergiques qui modulent leur réponse aux entrées glutamatergiques. On distingue 2 types de MSNs en fonction de leurs projections, leur expression de neuropeptides et de leur équipement en récepteurs dopaminergiques (Loopuijt and van der Kooy, 1985; Beckstead and Cruz, 1986; Gerfen and Young, 1988; Kawaguchi et al., 1990). Ces deux types de MSN sont à l'origine de deux voies principales, essentielles dans les ganglions de la base : la voie directe et la voie indirecte (Figure 4B). Les MSNs du premier type se distinguent par leur expression de substance P, de dynorphine, et de récepteurs dopaminergiques de type D1. Ces neurones sont à l'origine de la voie directe, projetant leurs axones en dehors du striatum, vers le GPi et la SNr. Ces neurones sont appelés neurones striatonigraux. La voie directe est appelée ainsi car les MSNs projettent directement sur les noyaux GABAergiques de sortie des ganglions de la base (Fig 4B). Le deuxième type de MSN exprime des enképhalines, ainsi que des récepteurs dopaminergiques de type D2 et sont à l'origine de la voie indirecte, projetant sur le GPe. Ces neurones sont appelés neurones striatopallidaux. Les neurones du GPe projettent en retour sur le striatum, la SNr et le GPi et surtout sur le ST qui projette sur les noyaux de sortie des ganglions de la base (Fig 4B). La ségrégation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 entre les neurones MSNs à l'origine des voies directe et indirecte (Gerfen et al., 1990) joue un rôle central dans la fonction des ganglions de la base. En effet, la dopamine réalise une modulation positive des neurones striatonigraux via

son action sur les récepteurs D2. Les MSNs exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 sont répartis de manière homogène dans l'ensemble du striatum et ne dépendent pas de son organisation en compartiments de type striosome et matrice (voir plus bas).

Les 5% de neurones striataux restants sont des interneurones (DiFiglia et al., 1976; Bishop et al., 1982) projetant à l'intérieur du striatum et qui contactent pour la plupart les MSNs. Ces interneurones se distinguent par leur morphologie, ainsi que par leur neurochimie et peuvent être répartis en plusieurs classes. Parmi ces interneurones, on trouve des interneurones cholinergiques larges sans épines (Bolam et al., 1984; Kubota and Kawaguchi, 1993) et des neurones moyens sans épines GABAergiques (DiFiglia et al., 1976; Bishop et al., 1982; Kita, 1993). D'autres interneurones sont caractérisés par l'expression de neuropeptides et des composés qu'ils contiennent comme par exemple le monoxyde d'azote (Kita, 1993; Kubota et al., 1993).

Une des caractéristiques du striatum est son organisation particulière en compartiments de type striosome et matrice. Bien que le striatum paraisse homogène, ces compartiments peuvent être révélés par des marqueurs neurochimiques. En effet, la matrice peut être marquée par la calbindine (Gerfen et al., 1985) et les striosomes par les récepteurs des opioïdes de type mu (Herkenham and Pert, 1981) ou la cholécystokinine. Ces compartiments sont ciblés spécifiquement par les entrées corticales et par différents sous-types de neurones dopaminergiques (Gerfen et al., 1987) (voir 2-a- de ce chapitre). Les sorties du striatum sont également organisées en fonction des compartiments de type striosome et matrice. Les projections des striosomes ciblent principalement les neurones du tiers ventral de la SNc, alors que celles de la matrice ciblent le GPi et le GPe ainsi que la SNr (Gerfen, 1985).

b3- Le globus pallidus

Le globus pallidus correspond à la partie dorsale du pallidum. D'un point de vue fonctionnel, il est associé aux fonctions sensorimotrice et associative, alors que le pallidum ventral est associé aux fonctions limbique et préfrontale. Le globus pallidus est composé de deux segments ; un segment interne (GPi) et un segment externe (GPe). La plupart des neurones pallidaux sont positifs pour la GAD et utilisent le GABA comme neurotransmetteur (Pasik et al., 1988). Il existe 2 types de neurones GABAergiques dans le GPe qui peuvent être différenciés d'un point de vue morphologique (Kita and Kitai, 1994). Les cellules du premier type ont un soma d'une taille moyenne à large, ne possèdent pas d'épines dendritiques et présentent des varicosités. Certains de ces neurones non épineux sont caractérisés par un champ dendritique hélicoïdal. Les neurones pallidaux du deuxième type sont caractérisés par la présence de nombreuses épines dendritiques et leur corps cellulaire est plus petit que celui des neurones du premier type. Il existe également des différences neurochimiques (Kita and Kitai, 1994) ainsi que des différences de projection. En effet, les neurones du premier type synthétisent de la parvalbumine, ce qui n'est pas le cas des neurones du deuxième type. Le GPe projette sur le GPi et le ST. Le GPi, qui fait quant à lui partie des noyaux de sortie des ganglions de la base avec la SNr, projette essentiellement sur les noyaux thalamiques (Figure 4A). Les noyaux thalamiques ciblent les neurones corticaux impliqués dans la planification et l'exécution de l'action, formant la

voie thalamocorticale (Figure 4C).

b4- Le noyau subthalamique

Le ST est composé de neurones glutamatergiques qui semblent d'un seul type (Kita et al., 1983). De nombreuses expériences d'électrophysiologie démontrent la nature excitatrice de ces neurones (Nakanishi et al., 1987; Robledo and Féger, 1990). Morphologiquement, les neurones glutamatergiques du ST sont de taille moyenne, ovoïdes et possèdent quelques épines dendritiques rares sur la partie distale des dendrites. Les neurones du ST reçoivent des afférences inhibitrices du GPe (Kita et al., 1983) et des afférences excitatrices du cortex (Kita et al., 1983; Nakanishi et al., 1987, 1988). Le ST projette sur les deux segments du globus pallidus, sur la substance noire et envoie des projections plus diffuses sur le striatum (Nakanishi et al., 1987). Ces projections constituent une entrée excitatrice pour toutes ces structures effectrices.

b5- La substance noire

De la même manière que le GPi, la substance noire constitue une structure de sortie des ganglions de la base, une interface entre ce système et les structures externes comme le thalamus et des structures mésencéphaliques comme le SC et le PPN (Fig 4A). La substance noire est constituée de deux structures ayant des fonctions différentes : la SNr composée principalement de neurones GABAergique similaires à ceux du GPi (Ribak et al., 1979; Oertel and Mugnaini, 1984; Pasik et al., 1988) permettant la sortie des informations provenant des ganglions de la base, et la SNc constituée de neurones dopaminergiques constituant la source principale de dopamine au sein des ganglions de la base (Lindvall et al., 1984) (Figure 4C). La SNr GABAergique reçoit des afférences inhibitrices du GPe et du striatum, et des entrées excitatrices provenant du ST. Elle projette au thalamus, aux couches intermédiaires du SC et au PPN. Les afférences des neurones dopaminergiques de la SNc sont globalement similaires à celles de la SNr. Les afférences provenant du striatum constituent une entrée majeure de la SNc (Smith and Bolam, 1990). Il existe également d'autres entrées à la SNc qui n'existent pas pour la SNr : des entrées cholinergiques provenant du PPN, des entrées provenant de l'amygdale et des entrées de la LHB (Herkenham and Nauta, 1979). La sortie majeure de la SNc est dirigée vers les MSNs du striatum dorsal (Figure 4C).

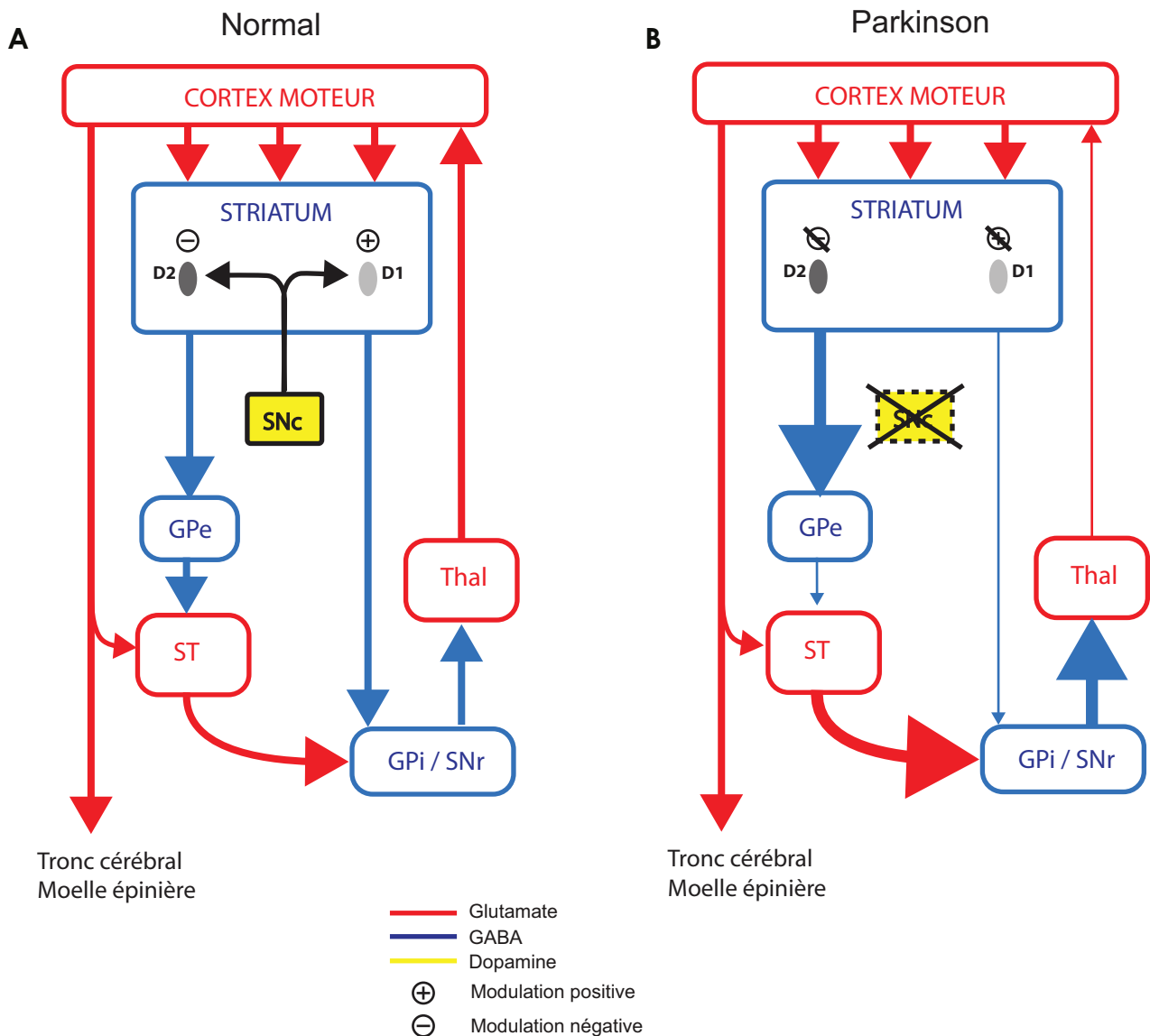


Figure 5 : Modèle général du rôle moteur de la dopamine dans les ganglions de la base en conditions normales et dans la maladie de Parkinson. Figure 1A. Dans les conditions normales, la dopamine est libérée par les terminaisons de la SNc dans le striatum dorsal. La dopamine module positivement les neurones striatonigraux en agissant sur les récepteurs D1. Les neurones striatonigraux inhibent les noyaux de sortie des ganglions de la base (GPI et SNr). Cela provoque une levée d'inhibition sur le thalamus, qui devient plus actif et excite le cortex moteur de manière plus importante. D'autre part, la dopamine module négativement les neurones striatopallidaux via son action sur les récepteurs dopaminergiques D2. L'inhibition exercée sur le GPe diminue, conduisant à une inhibition augmentée du GPe sur le ST. Le ST excite de manière moins importante les noyaux de sortie des ganglions de la base, conduisant à une levée d'inhibition sur le thalamus et à une excitation augmentée du cortex moteur. **Figure 1B.** Dans la maladie de Parkinson, les neurones de la SNc dégénèrent et la dopamine perd son effet modulateur sur les neurones striataux. L'inhibition exercée par les neurones striatonigraux sur les noyaux de sortie des ganglions de la base diminue, conduisant à une augmentation de leur activité et de l'inhibition exercée sur le thalamus. Le thalamus est moins actif ce qui entraîne une diminution de leur effet exciteur sur le cortex moteur, aboutissant à une activité diminuée des neurones corticaux. D'autre part, l'inhibition exercée par les neurones striatopallidaux sur le GPe augmente, conduisant à une levée de l'inhibition exercée par le GPe sur le STN. Le STN est alors plus actif, entraînant une excitation plus importante des noyaux de sortie des ganglions de la base. L'inhibition exercée par le GPI et la SNr sur le thalamus augmente et le thalamus, moins actif, excite de manière moins importante le cortex moteur. La perte des neurones dopaminergiques de la SNc conduit par conséquent à une activation réduite du cortex moteur, ce qui pourrait être à l'origine de certains symptômes de la maladie de Parkinson comme la bradykinésie et l'akinésie. **SNc** : substance noire compacte ; **SNr** : substance noire réticulée ; **GPe** : segment externe du globus pallidus ; **GPI** ; segment interne du globus pallidus ; **Thal** : thalamus ; **ST** : noyau subthalamique.

2- La dopamine et les ganglions de la base

a- Innervation dopaminergique des ganglions de la base

Les neurones dopaminergiques projetant sur le striatum sont localisés dans les trois groupes définis par Daelström et Fuxe sur la base de leur localisation régionale : les groupes dopaminergiques A8 (correspondant à l'aire rétro-rubrale), A9 (correspondant à la SNc) et A10 (correspondant à la VTA). Dans l'étude des ganglions de la base, il existe une classification plus adaptée de ces neurones basée sur la morphologie de leurs dendrites, l'expression de la calbindine et leurs projections vers les compartiments de type striosome et matrice au sein du striatum (Gerfen et al., 1987). Sur la base de ces caractéristiques, on distingue deux ensembles de neurones dopaminergiques : les neurones du tiers dorsal et les neurones du tiers ventral. Les neurones dopaminergiques du tiers dorsal projettent principalement sur le compartiment striatal de type matrice et comprennent des neurones appartenant à la VTA, la partie dorsale de la SNc et l'aire rétro-rubrale. Ces neurones possèdent d'autres caractéristiques comme des dendrites situées dans le plan de la SNc et l'expression de calbindine. Les neurones dopaminergiques du tiers ventral projettent principalement sur le compartiment striatal de type striosome et comprennent des neurones appartenant à la partie ventrale de la SNc ainsi que des neurones dopaminergiques situés au cœur de la SNr. Leurs dendrites se situent ventralement, dans la SNr et ces neurones n'expriment pas la calbindine. Cependant, une étude plus récente a montré que des neurones dopaminergiques du tiers ventral et du tiers dorsal pouvaient projeter à la fois dans les compartiments de type striosome et matrice (Matsuda et al., 2009).

b- Rôle moteur de la dopamine dans les ganglions de la base

b1- Exemple de la maladie de Parkinson (Figure 5)

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative affectant dans un premier temps les neurones dopaminergiques de la substance noire et qui entraîne des troubles de la fonction motrice, du langage et de la cognition (Jankovic, 2008). Chez l'homme, la maladie de Parkinson est caractérisée par des symptômes moteurs comme une rigidité musculaire, un tremblement de repos, un ralentissement des mouvements (bradykinésie), une instabilité posturale et dans certains cas une perte des mouvements (akinésie). Les premiers symptômes de la maladie sont le résultat d'une diminution de l'activation du cortex moteur par les ganglions de la base causée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, ce qui conduit à une diminution de l'action de la dopamine dans le striatum. Les conséquences de la perte des neurones dopaminergiques de la SNc sur la bradykinésie et l'akinésie peuvent en partie s'expliquer par la théorie des troubles du mouvement (Albin et al., 1989) (Figure 5).

Dans le modèle classique de l'action de la dopamine sur les ganglions de la base, la dopamine libérée dans les conditions physiologiques par les terminaisons striatales module positivement les MSNs à l'origine de la voie striatonigrale via son action sur les récepteurs

D1 couplés aux protéines Gs, et module négativement les MSNs à l'origine de la voie striatopallidale via son action sur les récepteurs D2 couplés aux protéines Gi (Fig 5A). Les neurones striatonigraux GABAergiques modulés positivement par l'action de la dopamine sur les récepteurs D1 inhibent de manière plus importante les noyaux de sortie (GPi et SNr) ce qui entraîne une levée de l'inhibition exercée sur le thalamus. Les neurones du thalamus sont alors excités et stimulent les neurones du cortex moteur. Les neurones striatopallidaux à l'origine de la voie indirecte sont modulés négativement par la dopamine, entraînant une levée d'inhibition sur le GPe. Le GPe inhibe de manière plus importante le ST conduisant à une diminution de l'activité des noyaux de sortie. Le thalamus est moins inhibé, donc plus actif et excite le cortex moteur. L'exécution correcte du mouvement dépend de l'action de la dopamine sur ces deux voies (Figure 5A).

La théorie des troubles du mouvement (Albin et al., 1989) stipule que ces troubles résultent d'un déséquilibre entre l'activité des voies directe et indirecte. Dans la maladie de Parkinson, dont l'un des symptômes est la bradykinésie, la théorie suggère que la perte des entrées dopaminergiques au striatum due à la dégénérescence de la SNc est à l'origine d'une inhibition de l'activité des neurones striatonigraux et d'une augmentation de l'activité des neurones striatopallidaux. L'inhibition des neurones striatonigraux à l'origine de la voie directe conduit à une levée d'inhibition sur les noyaux de sortie, ce qui entraîne une augmentation de l'inhibition exercée par ces noyaux sur le thalamus. L'excitation exercée par le thalamus sur le cortex moteur est diminuée, ce qui entraîne un effet inhibiteur sur l'initiation motrice (Figure 5B). D'autre part, la déplétion en dopamine est responsable d'une diminution de la modulation négative exercée sur les neurones striatopallidaux. Ces neurones sont donc plus actifs et l'inhibition qu'ils exercent sur le GPe est augmentée. Cela entraîne une levée d'inhibition sur le ST dont l'action excitatrice sur les noyaux de sortie des ganglions de la base est augmentée. L'action inhibitrice du GPi et de la SNr sur le thalamus augmente, conduisant *in fine* à une diminution de l'excitation du cortex moteur (Figure 5B). La déplétion dopaminergique observée dans la maladie de Parkinson est par conséquent responsable d'un déficit moteur via une altération de la physiologie des voies directe et indirecte. Le système dopaminergique nigrostrié et la libération de dopamine dans le striatum dorsal sont ainsi essentiels dans la motricité. Le modèle théorique présenté précédemment (Albin et al., 1989) a permis de mieux comprendre certaines conséquences motrices de la maladie de Parkinson mais possède ses limites. En effet, il ne permet pas d'expliquer certains symptômes comme les tremblements et la rigidité observés chez l'homme ou dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson. Un autre exemple est l'élimination des dyskinésies induites par la L-DOPA en réponse à des lésions du GPi, une observation incompatible avec un modèle qui associe une inhibition excessive des noyaux de sortie des ganglions de la base et une diminution de leur activité efférente avec les dyskinésies (Bezard and Przedborski, 2011).

b2- Modélisation de la maladie de Parkinson

De nombreuses données concernant le rôle moteur de la dopamine dans le système nigrostrié ont été obtenues dans le cadre de recherches sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Bien qu'il soit peu probable qu'un seul modèle animal reflète une

maladie aussi complexe, chaque modèle a contribué à mieux comprendre certains aspects de son étiologie et de ses traitements. On distingue globalement trois principaux types de modèles animaux de la maladie de Parkinson : les modèles pharmacologiques, les modèles lésionnels utilisant des toxines pour réaliser des lésions dopaminergiques de la voie nigrostriée et les modèles génétiques chez la souris caractérisés par des mutations de gènes impliqués dans certaines formes de la maladie de Parkinson (Le et al., 2014).

Les modèles pharmacologiques comprennent l'utilisation d'agents qui interfèrent avec le stockage des monoamines dans les vésicules synaptiques (réserpine) ou qui inhibent la tyrosine hydroxylase, une enzyme de synthèse des catécholamines (alpha-méthyl-para-tyrosine). Ces composés sont responsables d'une déplétion en catécholamine transitoire, laissant les neurones dopaminergiques intacts. Une déplétion en dopamine dans le striatum est responsable d'une diminution de l'activité motrice spontanée (hypokinésie) chez le rongeur (Bezard and Przedborski, 2011). Le modèle de la réserpine a d'ailleurs contribué à l'utilisation de la L-DOPA chez les patients parkinsoniens (Bezard and Przedborski, 2011). Ces modèles pharmacologiques ne sont plus utilisés dans la modélisation de la maladie de Parkinson du fait de leur écart avec la physiopathologie de la maladie.

Concernant les modèles lésionnels, les toxines les plus fréquemment utilisées sont la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). Parmi ces modèles, le modèle de lésion dopaminergique unilatérale par la 6-OHDA proposé par Ungerstedt en 1970 (Ungerstedt, 1968) a été le seul modèle validé dans les années 80. Les rats présentant des lésions bilatérales de la SNc présentent en effet un taux de mortalité élevé et ne peuvent donc pas être utilisés en tant que modèles (Bezard and Przedborski, 2011). En plus d'être tolérées par l'animal, les lésions unilatérales sont réalisées dans un hémisphère, l'autre hémisphère pouvant être utilisé comme contrôle interne. La 6-OHDA est une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques utilisée initialement dans les lésions du système nigrostrié chez le rat (Ungerstedt, 1968). Elle a une structure similaire à celle de la dopamine et de la noradrénaline, ce qui rend possible la recapture de cette toxine par les transporteurs des monoamines pour lesquels elle possède une grande affinité. Une fois à l'intérieur du neurone, la 6-OHDA s'accumule dans le cytoplasme des neurones où elle est oxydée, conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de paraquinone hautement toxique ce qui entraîne la mort de la cellule (Javoy et al., 1976; Blandini and Armentero, 2012). La 6-OHDA ne passe pas la barrière hématoencéphalique mais peut être injectée dans le cerveau ; dans le faisceau médian du télencéphale, la SNc ou le striatum dans le but de léser les neurones dopaminergiques de la SNc directement ou via une dégénérescence rétrograde des fibres conduisant à une déplétion dopaminergique (Sauer and Oertel, 1994).

L'administration systémique de MPTP chez l'homme ou le singe reproduit la plupart des caractéristiques cliniques et pathologiques de la maladie de Parkinson. Chez le singe, l'administration de MPTP peut entraîner des modifications de l'activité locomotrice et dans certains cas des caractéristiques de bradykinésie, de posture anormale, de tremblements, de dyskinésies et de stéréotypies. Ces caractéristiques sont moins claires chez la souris (Le et al., 2014). Ce composé entraîne également une dégénérescence des neurones

dopaminergiques chez la souris, mais cet effet n'est pas observé chez le rat, sauf lorsque le MPTP est injecté directement dans la SNc (Blandini and Armentero, 2012). C'est la raison pour laquelle cette toxine est généralement utilisée chez le singe. En plus de léser les neurones dopaminergiques, le MPTP détruit d'autres noyaux catécholaminergiques également touchés dans la maladie de Parkinson, ce qui est probablement à l'origine des conséquences de cette toxine sur l'apparition de symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson chez le singe (Bezard and Przedborski, 2011). La MPTP passe la barrière hématoencéphalique et peut donc être injectée de manière systémique. Dans le cerveau, elle est transformée par la monoamine oxydase de type B (MAOB) en MPP⁺ (ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium). Le MPP⁺ est transporté par le transporteur de la dopamine dans les neurones dopaminergiques de la SNc où cet ion inhibe l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela entraîne la libération d'espèces réactives de l'oxygène et réduit la production d'ATP, conduisant à la mort de la cellule.

Cependant, l'utilisation de toxines comme la 6-OHDA et la MPTP est responsable d'une dégénérescence rapide des neurones dopaminergiques, ce qui ne reflète pas la dégénérescence progressive observée dans la maladie de Parkinson. D'autre part, elles n'induisent pas de formation de corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la SNc, qui font partie des caractéristiques de la maladie de Parkinson.

Certains patients atteints de la maladie de Parkinson ont une forme monogénique de la maladie et les modèles génétiques visent à modifier l'expression de ces gènes chez l'animal. Ces modifications sont généralement réalisées chez la souris, bien que des modèles aient été réalisés chez le rat (Blandini and Armentero, 2012), la drosophile et le nématode. Les mutations de l' α -synucléine sont un exemple de modèle génétique de la maladie de Parkinson. Cette protéine est connue comme étant essentielle dans la physiopathologie des formes familiale et sporadique de cette maladie et correspond à la composante principale des corps de Lewy (Bezard and Przedborski, 2011). La duplication ou triplication de ce gène peut causer la maladie de Parkinson, suggérant que le niveau d'expression de cette protéine est également un facteur causal de la maladie. Il existe de nombreuses souris transgéniques pour l' α -synucléine, mais bien que l'expression de la tyrosine hydroxylase soit diminuée chez ces souris, elles ne présentent pas de dégénérescence de la voie nigrostriée (Chesselet, 2008). L'expression d' α -synucléine dans les neurones corticaux et sous-corticaux entraîne la formation d'inclusions dans le bulbe olfactif, la SNc et le locus coeruleus ainsi qu'une diminution des taux de dopamine striataux et un ralentissement des mouvements (Lam et al., 2011). De manière intéressante, certains de ces modèles reproduisent également des symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson. Il existe de nombreux modèles génétiques se basant sur d'autres gènes impliqués directement ou indirectement dans la maladie de Parkinson dont l'utilisation contribue à améliorer les connaissances sur la physiopathologie et les traitements potentiels de la maladie.

Récemment, un modèle combinant les approches lésionnelle et génétique est apparu. Ce modèle consiste à faire exprimer de l' α -synucléine humaine par les neurones dopaminergiques de la SNc. Pour cela, des adénovirus associés contenant le gène humain de l' α -synucléine sont injectés dans la SNc dans le but de surexprimer la protéine dans les

neurones de cette structure. Cette surexpression a pour conséquences une perte importante des neurones dopaminergiques de la SNc ainsi que des perturbations motrices comparable celles observées chez des rats ayant subi des injections intrastriatales de 6-OHDA. De plus, le profil temporel de la dégénérescence neuronale est progressif et les animaux présentent des inclusions protéiques intracellulaires dans la SNc, ce qui est plus proche de la pathologie (Decressac et al., 2012; Lindgren et al., 2012; Van der Perren et al., 2014).

b3- Conséquences motrices de lésions dopaminergiques unilatérales chez le rongeur

Les animaux ayant subi des lésions dopaminergiques unilatérales possèdent certains troubles moteurs comme une diminution de l'activité locomotrice générale et une diminution des performances dans le test du rotarod (Monville et al., 2006; Shiotsuki et al., 2010). Dans ce modèle, des asymétries spontanées des membres correspondant à une atteinte motrice des membres controlatéraux à la lésion sont également présents et peuvent être évalué par différents tests comportementaux (Blandini and Armentero, 2012). Ces conséquences motrices sont dues à une perte sévère des neurones dopaminergiques conduisant à un déficit de fonction des projections nigrostriées du côté de la lésion (Le et al., 2014). Cependant, les tests moteurs classiques permettant d'évaluer les conséquences de lésions dopaminergiques unilatérales sur le comportement moteur ne sont pas toujours efficaces et donnent des résultats souvent variables en fonction des laboratoires. C'est pourquoi, pour évaluer les troubles moteurs chez les modèles animaux de la maladie de Parkinson, on utilise la mesure du comportement de rotation suivant une lésion unilatérale de la voie nigrostriée. Ce comportement est reproductible et relativement simple à quantifier, mais présente le défaut de ne fournir qu'une mesure indirecte des conséquences motrices de lésions du système nigrostrié. Dans ce modèle, une injection d'amphétamine à des animaux lésés de manière unilatérale dans la SNc (rats "hémiparkinsoniens") entraîne un comportement typique et quantifiable appelé comportement de rotation (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970) dans le sens de la lésion (côté ipsilatéral à la lésion). Ce comportement est dû à une asymétrie des taux de dopamine entre les deux côtés du striatum dorsal avec une augmentation de la libération de dopamine du côté où la voie nigrostriée est intacte et une absence de dopamine du côté où la SNc est lésée (Zetterström et al., 1986). Cela provoque un comportement de rotation du côté de la lésion, c'est à dire du côté où la transmission dopaminergique est la plus faible (Da Cunha et al., 2008) (Figure 6A). Ce modèle a permis de mieux comprendre le rôle du système nigrostrié dans la motricité et de tester l'efficacité de nouvelles drogues (Jiang et al., 1993), de greffes ou de thérapies géniques (Bjorklund et al., 2002; Kirik et al., 2002) sur les troubles moteurs provoqués par la perte des neurones dopaminergiques de la SNc. Le modèle du comportement de rotation chez les rats ayant subi une lésion unilatérale du système nigrostrié est décrit dans cette introduction car il a été utilisé dans notre étude (chapitre 3 F-) dans le but de mettre en évidence une influence comportementale de la tVTA via ses projections sur le système nigrostrié (Figure 6B). Néanmoins, il existe d'autres méthodes permettant de détecter des symptômes moteurs plus proches de ceux observés chez les

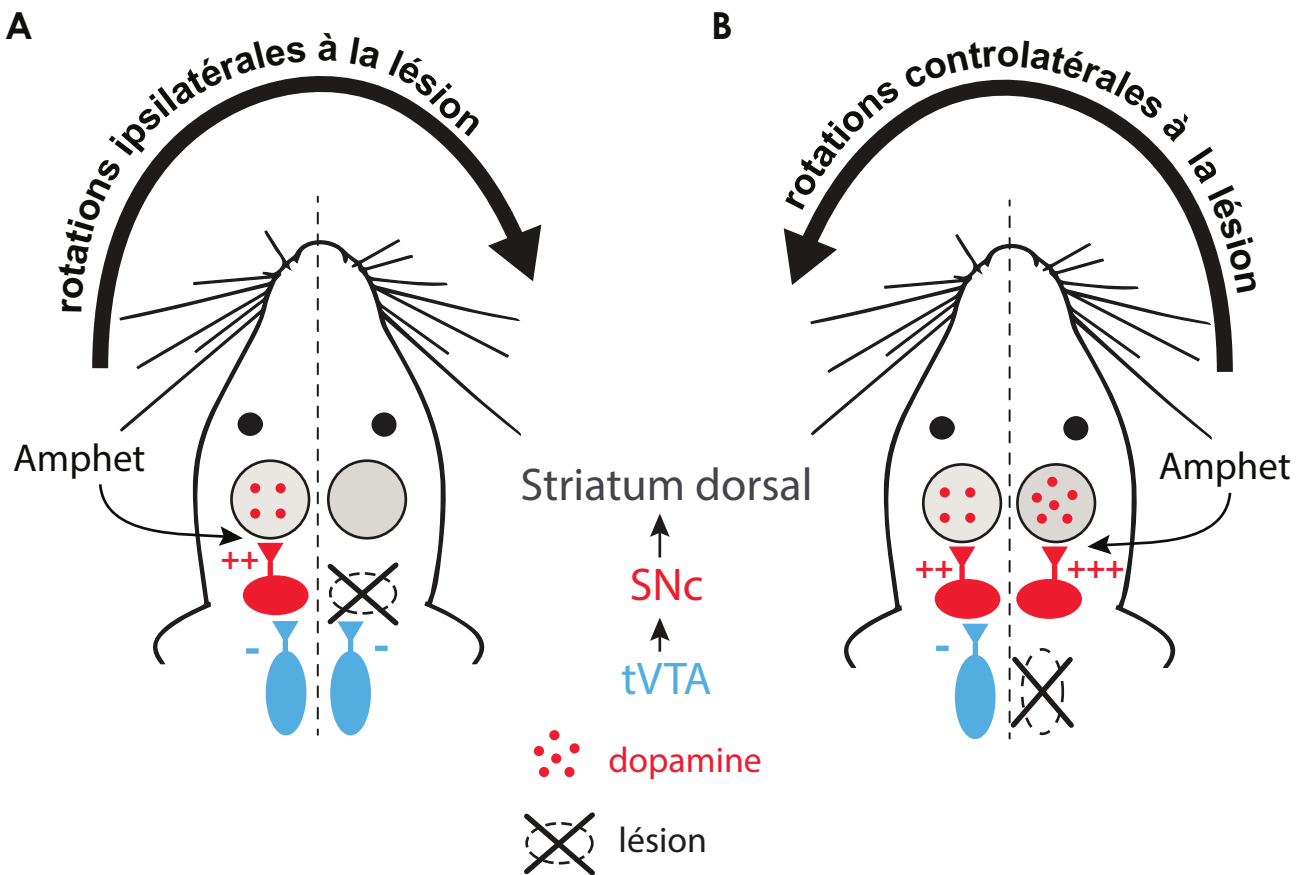


Figure 6 : Schéma explicatif du comportement de rotation en réponse à une lésion unilatérale de la SNc et en réponse à une lésion de la tVTA. Figure 1A. Une injection unilatérale de 6-OHDA dans la SNc ou dans le striatum dorsal provoque une dégénérescence des neurones dopaminergiques et de leurs projections. Cela entraîne une diminution des taux de dopamine dans le striatum dorsal du côté de la lésion, conduisant à un déséquilibre des taux de dopamine entre les deux côtés du striatum dorsal. Une injection d'amphétamine entraîne une augmentation de la libération de dopamine et une inhibition de sa recapture dans le striatum dorsal du côté où la SNc est intacte, mais ne possède aucun effet du côté où la SNc est lésée. L'amphétamine augmente le déséquilibre des taux de dopamine dans le striatum dorsal entre les deux hémisphères, conduisant à un comportement de rotation ipsilatéral à la lésion, c'est à dire du côté de la lésion, où les taux de dopamine dans le striatum dorsal sont plus faibles. **Figure 1B.** Une lésion unilatérale de la tVTA (dans l'hémisphère droit sur le schéma) supprime l'inhibition tonique exercée par cette structure sur les neurones dopaminergiques de la SNc. Cela entraîne une augmentation de la fréquence de décharge et des bouffées de potentiels d'action de ces neurones, conduisant à une augmentation de la libération de dopamine dans le striatum dorsal du côté de la lésion. Cela provoque un déséquilibre des taux de dopamine dans le striatum dorsal entre les deux hémisphères. L'injection d'amphétamine est responsable d'une accentuation de la différence des taux de dopamine dans le striatum dorsal entre les deux hémisphères. En effet, l'amphétamine augmente la libération de dopamine des deux côtés, mais son action sur l'inhibition de recapture conduit à des taux plus importants dans le striatum dorsal situé du côté de la lésion de la tVTA dus à une activité plus importante des neurones de la SNc de ce côté. Ce déséquilibre conduit à un comportement de rotation controlatéral à la lésion, c'est à dire du côté opposé à la lésion, toujours du côté où la transmission dopaminergique est la plus faible.
6-OHDA : 6-hydroxydopamine ; **SNc** : substance noire compacte ; **tVTA** : queue de l'aire tegmentale ventrale ; **amphet** : amphétamine

Parkinsoniens. Par exemple, le rotarod, le test du cylindre, le test de la barre ("beam walking test") ou le test de la grille qui permettent de mesurer la coordination, la perte de l'utilisation volontaire des membres antérieurs et l'équilibre. La marche des animaux peut également être analysée par la mesure de la longueur des pas réalisés par les pattes antérieures lorsque les animaux marchent en ligne droite sur une feuille de papier avec les pattes recouvertes d'encre (Taylor et al., 2010; Le et al., 2014). Ces tests peuvent être automatisés et les mouvements des animaux peuvent aujourd'hui être monitorés et analysés de façon très précise.

b4- Rôle de la dopamine dans l'apprentissage moteur

L'apprentissage moteur est une fonction clé des ganglions de la base dans la motricité (Graybiel, 2005). Le test du rotarod nécessite un apprentissage de combinaisons de postures et de pas conduisant à une augmentation des performances avec la répétition des entraînements. Des lésions unilatérales de la SNc sont responsables d'une altération progressive de l'apprentissage des compétences motrices dans le test du rotarod (Shiotsuki et al., 2010; Gambhir et al., 2011). D'autre part des lésions bilatérales partielles de la SNc, entraînant un déficit modéré de la libération de dopamine dans le striatum, n'altèrent pas les fonctions motrices générales mais sont responsables d'une altération de l'acquisition des compétences motrices dans le test du rotarod (Ogura et al., 2005). L'acquisition des compétences motrices permise par le striatum semble donc plus sensible à une déplétion modérée en dopamine que le contrôle moteur.

D'un point de vue physiologique, de nombreuses études suggèrent que la libération de dopamine par les terminaisons de la SNc dans le striatum joue un rôle dans la modulation de l'activité des neurones striataux pendant l'apprentissage moteur (Schultz et al., 2003; Graybiel, 2005). En réalité, la libération de dopamine dans le striatum dorsal est impliquée dans la mise en place d'une plasticité à long terme des synapses glutamatergiques corticostriatales, et ces mécanismes contribuent à l'apprentissage moteur (Pisani et al., 2005; Dang et al., 2006; Bromberg-Martin et al., 2010). L'apprentissage moteur précoce dans le test du rotarod dépend à la fois des MSNs exprimant les récepteurs D1 à l'origine de la voie directe et les MSNs exprimant les récepteurs D2 à l'origine de la voie indirecte (Durieux et al., 2012). Contrairement à ce qui est observé en réponse à la suppression des MSNs exprimant les récepteurs D2, pour laquelle on observe une amélioration progressive des performances motrices des animaux de jour en jour avec la répétition des tests, la suppression des MSNs exprimant les récepteurs D1 altère l'apprentissage précoce mais provoque également un déficit permanent des performances dans le test du rotarod. De manière intéressante, ce déficit est observé du premier au sixième jour d'apprentissage lorsque la suppression a lieu dans le striatum dorsolatéral mais n'a pas lieu lors d'une suppression de ces neurones dans le striatum dorsomédian. La fonction est donc également dépendante des sous-régions striatales. D'autre part, ce type d'ablation dans l'ensemble du striatum chez des souris entraînées de manière intensive est responsable d'une diminution de leurs performances lorsqu'elles sont retestées. Les résultats de souris ayant subi une ablation des MSNs exprimant les récepteurs

D2 obtenus dans les mêmes conditions ne diffèrent pas des contrôles. Ces résultats indiquent que les MSNs du striatum à l'origine de la voie directe jouent un rôle dans l'acquisition progressive des compétences motrices et dans l'exécution de séquences motrices apprises et que les MSNs à l'origine de la voie indirecte sont plutôt impliqués dans l'initiation de l'apprentissage moteur.

B- Objectifs

Les neurones de la tVTA projettent sur les neurones dopaminergiques de la SNc, impliqués dans la motricité. Précédemment, les fonctions de la tVTA ont été principalement étudiées dans le traitement des signaux aversifs dans le circuit LHb/tVTA/VTA (Jhou et al., 2009a; Hong et al., 2011). Cependant, malgré ses projections massives sur la SNc, le rôle de la tVTA dans le contrôle du système nigrostrié reste inconnu. Les objectifs de cette étude ont été de mettre en évidence le rôle de la tVTA dans le contrôle du système nigrostrié d'un point de vue anatomique, physiologique et comportemental.

C- Méthodes

Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé des approches variées. Dans le but de montrer l'existence d'une continuité neuroanatomique entre la tVTA et le système nigrostrié, nous avons utilisé une approche de double traçage en neuroanatomie. Cette approche a été complétée par une étude de microscopie électronique réalisée en collaboration avec l'université de Pittsburg. Une approche d'électrophysiologie *in vivo* chez l'animal anesthésié réalisée en collaboration avec l'université de Bordeaux nous a permis d'étudier le contrôle exercé par les neurones GABAergiques de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la SNc. Afin de mettre en évidence le rôle comportemental de la tVTA à travers ses projections sur le système nigrostrié, nous avons étudié les conséquences de lésions unilatérales de la tVTA sur le comportement de rotation, connu comme étant dépendant de l'intégrité du système nigrostrié (Figure 6B). Enfin, les conséquences de lésions bilatérales de la tVTA ont été étudiées dans le test moteur du rotarod en utilisant des protocoles permettant la mesure des performances motrices et de l'apprentissage moteur.

D- Résultats

Suite à l'injection d'un traceur antérograde dans la tVTA et d'un traceur rétrograde dans le striatum dorsolatéral nous avons visualisé des neurones positifs pour le traceur rétrograde dans la SNc recevant des appositions de fibres positives pour le traceur

antérograde. Il existe par conséquent une continuité neuroanatomique tVTA/SNc/striatum dorsal. La microscopie électronique a confirmé la présence de synapses entre les axones de la tVTA et les neurones dopaminergiques de la SNc. En réponse à une stimulation électrique de la tVTA, 96 % des neurones dopaminergiques de la SNc répondent par une inhibition. De la même façon, une stimulation chimique de la tVTA en utilisant le L-Glutamate entraîne une inhibition majeure des neurones de la SNc. A l'inverse, l'inhibition de la tVTA par le muscimol bodipy a entraîné une augmentation significative de l'activité des neurones de la SNc. Ces résultats prouvent que la tVTA exerce un tonus inhibiteur GABAergique sur les neurones dopaminergiques de la SNc et que cette structure peut potentiellement influencer les comportements dépendants du système nigrostrié. Les lésions unilatérales de la tVTA, par injection intracérébrale d'acide iboténique, entraînent un biais de rotation sous amphétamine dans une direction contralatérale à la lésion. Ce biais est opposé à celui observé après lésion de la SNc (biais ipsilatéral à la lésion, lié à une déplétion dopaminergique). De plus, une lésion de la tVTA réalisée du même côté qu'une lésion partielle de la SNc permet de compenser le biais de rotation ipsilatérale provoqué par l'injection d'amphétamine. La tVTA exerce par conséquent une influence comportementale via ses projections sur le système nigrostrié. De façon surprenante, les animaux ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA ont montré des performances motrices significativement supérieures à celles des animaux contrôles dans le test du rotarod. Ces résultats ont été observés dans le protocole de performances motrices, mais également dans le protocole d'apprentissage moteur. Les effets de lésions bilatérales de la tVTA sur les performances motrices et l'apprentissage moteur sont comparables à ceux observés en réponse à une injection d'amphétamine à une dose adaptée, suggérant un effet "dopant" de ces lésions. Les mêmes expériences réalisées sur des animaux ayant subi des lésions du striatum dorsal, une structure de projection de la SNc impliquée dans la motricité, conduisent à des résultats opposés à ceux observés après une lésion de la tVTA avec une diminution des performances motrices. L'ensemble de ces résultats comportementaux pourrait s'expliquer par le fait que la suppression de l'inhibition réalisée par la tVTA sur les neurones de la SNc entraîne une augmentation de leur activité basale, conduisant à une augmentation des taux de dopamine dans le striatum dorsal responsable d'une facilitation de l'initiation motrice et de l'apprentissage moteur.

E- Contribution

Cet article sur le rôle de la tVTA dans le contrôle du système nigrostrié est l'article principal de ma thèse. La majorité des expériences concernant le comportement de rotation ont été réalisées lors de mon stage de master2 dont l'objectif était d'étudier les influences comportementales de la tVTA. J'ai ensuite continué à travailler sur l'influence de la tVTA sur la motricité tout au long de mon doctorat jusqu'à la première soumission de l'article. J'ai réalisé les études de traçage en neuroanatomie à Strasbourg, puis la majorité des études d'électrophysiologie *in vivo* à Bordeaux, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du docteur François Georges en 2012. Suite à la soumission de l'article dans

"Neuropsychopharmacology", le travail demandé par les membres du comité de lecture a été réalisé par Maria José Sanchez-Catalan, alors en postdoctorat dans l'équipe. En plus d'apporter de nouvelles informations, les résultats obtenus ont confirmé le biais de rotation controlatéral dans le modèle de comportement de rotation chez les animaux présentant une lésion unilatérale de la tVTA et l'augmentation des performances motrices et de l'apprentissage moteur des animaux présentant des lésions bilatérales de la tVTA. La reproduction de ces résultats dans d'autres mains a permis de confirmer les résultats comportementaux.

Dans cet article, j'ai réalisé les expériences de double traçage et les figures correspondantes (Figure 1 a-c ; Figure S1), la majorité des expériences d'électrophysiologie *in vivo* et les figures correspondantes (Figure 2 de l'article; Figure S2 a-g de l'article), la majorité des expériences de comportement de rotation et les figures correspondante (Figure 3 a-e de l'article) et les expériences de rotarod et les figures correspondantes (Figures 4, 5 de l'article).

F- Article : Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area

Contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques nigrostriés et de la fonction motrice par la queue de l'aire tegmentale ventrale.

Romain Bourdy, Maria-José Sanchez-Catalan, Jennifer Kaufling, Judith J Balcita-Pedicino, Marie-José Freund-Mercier, Pierre Veinante, Susan R Sesack, François Georges et Michel Barrot

2014 American College of Neuropsychopharmacology
Neuropsychopharmacology (2014) 39, 2788-2798

Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area

Romain Bourdy^{1,2,6}, María-José Sánchez-Catalán^{1,6}, Jennifer Kaufling^{1,3}, Judith J Balcita-Pedicino⁴, Marie-José Freund-Mercier^{1,2}, Pierre Veinante^{1,2}, Susan R Sesack⁴, François Georges^{3,5,7} and Michel Barrot^{*1,7}

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Centre National de la Recherche Scientifique, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France; ⁴Department of Neuroscience and Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA; ⁵Université de Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France

Midbrain dopamine neurons are implicated in various psychiatric and neurological disorders. The GABAergic tail of the ventral tegmental area (tVTA), also named the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), displays dense projections to the midbrain and exerts electrophysiological control over dopamine cells of the VTA. However, the influence of the tVTA on the nigrostriatal pathway, from the substantia nigra pars compacta (SNc) to the dorsal striatum, and on related functions remains to be addressed. The present study highlights the role played by the tVTA as a GABA brake for the nigrostriatal system, demonstrating a critical influence over motor functions. Using neuroanatomical approaches with tract tracing and electron microscopy, we reveal the presence of a tVTA–SNc–dorsal striatum pathway. Using *in vivo* electrophysiology, we prove that the tVTA is a major inhibitory control center for SNc dopamine cells. Using behavioral approaches, we demonstrate that the tVTA controls rotation behavior, motor coordination, and motor skill learning. The motor enhancements observed after ablation of the tVTA are in this regard comparable with the performance-enhancing properties of amphetamine, a drug used in doping. These findings demonstrate that the tVTA is a major GABA brake for nigral dopamine systems and nigrostriatal functions, and they raise important questions about how the tVTA is integrated within the basal ganglia circuitry. They also warrant further research on the tVTA's role in motor and dopamine-related pathological contexts such as Parkinson's disease.

Neuropsychopharmacology (2014) **39**, 2788–2798; doi:10.1038/npp.2014.129; published online 25 June 2014

INTRODUCTION

Dopamine regulation of basal ganglia circuitry is critical to fine motor control and to associated pathologies such as Parkinson's disease (Albin *et al*, 1989; Redgrave *et al*, 2010). In this circuit, the nigrostriatal pathway from dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) to the dorsal striatum is controlled by various inhibitory GABAergic afferents (Tepper and Lee, 2007). The striatum, the external globus pallidus, and the substantia nigra pars reticulata are major contributors to this GABAergic control of SNc dopaminergic activity. Within the midbrain, the tail of the ventral tegmental area (tVTA) (Kaufling *et al*, 2009, 2010a; Perroti *et al*, 2005) also named the rostromedial tegmental (RMTg) nucleus (Jhou *et al*, 2009a, 2009b) appears as a GABAergic inhibitory structure displaying

heavy projections to the VTA and the SNc, suggesting that the tVTA could regulate the activity of dopamine systems (Barrot *et al*, 2012; Bourdy and Barrot, 2012). In the previous years, this inhibitory control has been investigated in the contexts of VTA responses to drugs of abuse (Jalabert *et al*, 2011; Jhou *et al*, 2012, 2013; Lecca *et al*, 2011, 2012; Matsui and Williams, 2011) and of the habenulo–VTA pathway in avoidance behavior (Stamatakis and Stuber, 2012) and in reward prediction error (Hong *et al*, 2011), demonstrating that the tVTA is indeed an important GABA brake for VTA dopamine neurons. However, the influence of the tVTA on the nigrostriatal pathway and on motor functions remains to be explored.

In the present study, we combined neuroanatomical, electrophysiological, and behavioral approaches to demonstrate the functional role played by the tVTA as a GABA brake for the nigrostriatal system and motor function. With pathway tract tracing, electron microscopic analysis of synapses and *in vivo* extracellular single-cell recordings, we demonstrate the inhibitory connectivity between tVTA efferent fibers and SNc dopamine neurons. Moreover, the experimental ablation of tVTA reveals a major influence of this structure on motor skill learning and on motor performance.

*Correspondence: Dr M Barrot, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR3212, 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg 67084, France. Tel: +33 368 851 450; Fax: +33 388 613 347; E-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 28 February 2014; revised 16 May 2014; accepted 29 May 2014; accepted article preview online 4 June 2014

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Experiments were performed in adult male Sprague–Dawley rats (Janvier, France). The rats were habituated to the facilities for at least a week before starting the procedures, and the animals were 7–9 weeks old (ie, 250–350 g) at surgery time or at testing time when no surgery was involved. They were housed under standard conditions (22 °C, 12-hour light/dark cycle). The experiments were in accordance with the CNRS and European community's council directives, with animal facilities and procedures approved by regional veterinary office and with scientists having the legal certificate for experimentation on living animals.

Drugs

Ibotenic acid (1% in phosphate-buffered saline (PBS) 0.1 M; 0.3 µl) was injected unilaterally into the VTA and unilaterally or bilaterally into the tVTA using Hamilton syringes with 33-gauge needles. Control animals received 0.3 µl of PBS. The 6-hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA; 0.25% in 0.9% NaCl with 0.01% ascorbic acid) was injected unilaterally into the SNc (4 µl for large lesion or 2 µl for partial lesion) or bilaterally into the dorsolateral striatum (2 µl/hemisphere). D-amphetamine sulfate was injected intraperitoneally (i.p., in 0.9% NaCl) at 3 mg/kg for rotational behavior and 1 mg/kg for rotarod experiments.

Surgery

Rats were anesthetized under ketamine/xylazine (87 mg/kg and 13 mg/kg respectively, i.p.) for tract tracing and 6-OHDA surgeries, under isoflurane for electrophysiology (3% for induction, 2% for surgery) and under sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) for ibotenic acid lesions. Stereotaxic coordinates relative to bregma were adjusted to the animal weight, coordinates (in mm) were as follows (Paxinos and Watson, 2007): tVTA, anteroposterior (AP) = -6.5, lateral (L) = ±1.5, ventral (V) = -7.8, ±6° lateral angle and dorsolateral striatum, AP = +1, L = ±4.3, V = -4, ±6° lateral angle for tract tracing and behavior; tVTA, AP = -7, L = +0.4, V = -7.4 and SNc, AP = -5, L = ±1.5, V = -7.5 for electrophysiology; SNc, AP = -5.2, L = ±2.6, V = -7.6, ±6° lateral angle and VTA, AP = -5, L = ±1.6, V = -7.5, ±6° lateral angle for behavior. Verticality was taken from the dura.

Tract Tracing

Biotinylated dextran amine (BDA; 5% in 0.25 M potassium acetate), Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PhaL; 2.5% in 10 mM sodium phosphate buffer) and cholera toxin β-subunit (CTb; 0.25% in 0.1 M Tris) were iontophoretically delivered (+1 to +6 µA, 7–10 s on/off cycles for 10–20 min) with glass micropipettes (10–40 µm tip diameter) as previously described (Balcita-Pedicino *et al*, 2011; Kaufling *et al*, 2009; Omelchenko *et al*, 2009).

Histochemistry

One week following tracer injection or immediately after behavioral testing, rats were anesthetized with sodium

pentobarbital and perfused with 100 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) followed by 500 ml of a paraformaldehyde solution (4% in phosphate buffer). Brains were collected, postfixed overnight, and coronal sections (40 µm) were cut on a vibratome. Histochemistry for BDA and immunohistochemistry was done as previously described (Kaufling *et al*, 2009, 2010a; Omelchenko *et al*, 2009). Primary antibodies were directed against: CTb (Sigma C3062, 1/20000), tyrosine hydroxylase (TH) (Millipore-Chemicon MAB318, 1/2500), or NeuN (Millipore MAB377, 1/5000). Visualization was performed with biotinylated secondary antibodies and peroxidase/DAB reaction after avidin-biotin-peroxidase complex amplification (ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Electron Microscopy

Rats were a subset of those used for the prior study of the tVTA/RMTg projection to the VTA (Balcita-Pedicino *et al*, 2011). For the present analysis, four animals were chosen as also having good transport of PhaL to the SNc. Ultrathin sections (60 nm) were cut from the core of the SNc (with slight inclusion of the immediately adjacent pars reticulata), stained with heavy metals, and examined by electron microscopy as previously described (Balcita-Pedicino *et al*, 2011). Primary antibodies were specific for PhaL (Vector AS-2300, 1/1000) and TH (MAB318, 1/5000). PhaL visualization was performed with biotinylated secondary antibodies and peroxidase/DAB reaction after avidin-biotin-peroxidase complex amplification. Then, the sections were processed for TH immunogold-silver staining, using gold-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit (Aurion, Electron Microscopy Science, 1/50, Hatfield, PA, USA) and IntenSE M silver kit reagent (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) for the silver intensification of gold label. The semiquantitative ultrastructural analysis was done as previously described (Omelchenko *et al*, 2009; Balcita-Pedicino *et al*, 2011).

Electrophysiology

A glass micropipette (2–3 µm tip diameter; 4–6 MΩ) filled with 2% pontamine sky blue in 0.5 M sodium acetate was lowered into the SNc. Dopamine neurons were identified according to their electrophysiological features (Ungless *et al*, 2004). The extracellular potential was recorded with an Axoclamp2B (Axon Instrument) or Neurodata IR283 (Cygny Technology; experiment Figure 4b) amplifier in the bridge mode vs a reference electrode in contact with the skull (×10 gain). The signal was further amplified (×100 gain) and filtered (low-pass 300 Hz, high-pass 0.5 kHz) via a differential amplifier (AC amplifier 1700, A-M Systems; or Brownlee Precision 440, Instrumentation Amplifier). Single neuron spikes were discriminated and digital pulses were collected online using a laboratory interface and software (CED1401, Spike2; Cambridge Electronic Design; or Data-pac 2K2, Run Technologies). The chemical manipulation of the tVTA was done on one cell only per animal. The electrical stimulation of the tVTA and the lesion study allowed multiple recordings from the same animal in which case recording tracks were done 100 µm apart along the mediolateral and/or AP axes. At the end of the experi-

ments, the recording electrode placement was marked by iontophoretic deposit of pontamine sky blue ($-20\ \mu\text{A}$, continuous current, 12–15 min). Electrical stimulation sites were marked by electrolytic lesion ($+20\ \mu\text{A}$, continuous current, 2 min). Rats were deeply anesthetized with isoflurane (5%) and decapitated. Brains were removed, snap-frozen in isopentane at $-80\ ^\circ\text{C}$, sectioned ($30\ \mu\text{m}$ coronal sections), mounted, and stained with neutral red to visualize recording, stimulation, and injection sites.

Electrical stimulation of the tVTA was conducted with a concentric bipolar electrode ($250\ \mu\text{m}$ diameter overall, $100\ \mu\text{m}$ diameter inner electrode that extended $100\ \mu\text{m}$ beyond the outer electrode; Phymep). Stimulations (100 , 0.2 – $1.0\ \text{mA}$, $0.5\ \text{Hz}$, $0.5\ \text{ms}$ duration pulses) were administered using a square pulse stimulator and stimulus isolator. In one set of experiments, we delivered single pulses of stimulation and in an independent experiment we delivered trains of three consecutive pulses of stimulations, separated by $50\ \text{ms}$, at $1\ \text{mA}$. Responses to electrical stimulation of the tVTA were evaluated and a peristimulus time histogram (PSTH) was generated online (Spike2 software) for each neuron.

An injection pipette ($30\ \mu\text{m}$ tip diameter) was used for chemical manipulation of tVTA activity, either stimulation by injecting $60\ \text{nl}$ of L-glutamate ($100\ \text{mM}$ in PBS) or inactivation by injecting $120\ \text{nl}$ of muscimol-BODIPY ($0.8\ \text{mM}$ in PBS).

Rotometer

Each animal was introduced into a cylindrical plastic chamber ($40\ \text{cm}$ diameter, $46\ \text{cm}$ high) placed under a camera. The number of contralateral and ipsilateral rotations was counted. Rats were first tested for baseline rotation, which allowed the exclusion of rats showing spontaneous rotation bias. The chosen time window ($30\ \text{min}$) for maximal locomotor activity was between 25 and $55\ \text{min}$ post injection. In a first set of experiments, rats underwent stereotaxic surgery for unilateral lesion of the tVTA, of the SNc or of the VTA. After 2 weeks of recovery, rats were tested in the rotometer following an acute injection of saline or amphetamine ($3\ \text{mg/kg}$, i.p.). In a second set of experiments, we compared animals with unilateral partial lesion of the SNc to animals with concomitant ipsilateral lesion of the tVTA, the test was done 1 week after the surgeries. The lesions were visualized by using immunohistochemistry directed against TH or NeuN. The extent of the partial unilateral SNc lesion was evaluated by counting the number of SNc TH-positive cells on both sides of the brain, analyzing one section every $160\ \mu\text{m}$ over the full AP extent of the SNc.

Rotarod

Experiment 1. At least 2 weeks after bilateral lesion of the tVTA or the dorsolateral striatum, we assessed the overall rotarod performance (ORP) (Roto-Rod Series 8), a motor parameter shown to be affected in a rat model of Parkinsonism (Rozas *et al*, 1997). Rats were first trained at low speed (5 rotations per minute (r.p.m.)) to remain on the rod for $5\ \text{min}$. Each fall was recorded and the animal immediately put back on the rotarod until the end of the $5\ \text{min}$ training. On day 2, animals were tested at successively

incremented rotation speeds with a $5\ \text{min}$ cut off. ORP was calculated as the area under the curve for time against speed plot. On day 3, animals were tested with an accelerating speed ramp (0 – $45\ \text{r.p.m.}$, $120\ \text{s}$). The locomotor activity was also measured during $2\ \text{h}$ through a photocell system.

Experiment 2. A separate set of animals was used to assess the effect of bilateral tVTA lesion on motor skill learning. They were tested repeatedly on the rotarod under an accelerating speed ramp, allowing the measurement of increased performance over days (0 – $45\ \text{r.p.m.}$, $5\ \text{min}$ cut off, 3 consecutive times per day, over 4 days). The daily values correspond to the average of the three consecutive daily exposures to the rotarod.

Experiment 3. To assess the effect of amphetamine on motor skill learning, rats were tested repeatedly for performance on an accelerating speed ramp (0 – $45\ \text{r.p.m.}$, $180\ \text{s}$) over two days (3 sessions/day, $45\ \text{min}$ between sessions). On the first day, a single injection of amphetamine was delivered immediately after the second session.

Experiment 4. The effect of amphetamine on motor performance was assessed in a separate group of animals. Rats were first overtrained with an accelerating speed ramp (0 – $45\ \text{r.p.m.}$, $120\ \text{s}$) during 4 days, which allowed stable performances. On day 5, the animals were tested $30\ \text{min}$ after saline or amphetamine injection.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistics are given in figure legends. We used Student's *t*-test or ANOVA to analyze the electrophysiological data. We performed LSD *post hoc* for the analysis of the SNc neuron evoked activity after electrical stimulation and Dunnett *post hoc* for the analysis of neuron activity after chemical manipulation. For the behavioral experiments, we used Student's *t*-test, test of comparison between the mean and a standard value (rotation experiments and tVTA vs DLS comparison), and ANOVAs followed by Duncan *post hoc* when applicable.

RESULTS

The tVTA Neurons Project to the Nigrostriatal System

Using tract tracing, a projection from the posterior end of the VTA to the SNc had been previously described (Ferreira *et al*, 2008). This SNc projecting region extends beyond the VTA *per se*, encompassing the newly described GABAergic tVTA (Jhou *et al*, 2009a; Kaufling *et al*, 2009, 2010a). Consistent with this view, we injected the anterograde tracers BDA (Supplementary Figure S1) or PhaL (Figure 1d–g) into the tVTA, and highlighted a plexus of fibers in the SNc with appositions onto dopamine neurons and processes. To identify the specific link with the nigrostriatal pathway, we then delivered the retrograde tracer CTb into the dorsolateral striatum together with BDA into the tVTA. tVTA fibers displayed appositions onto striatum-projecting SNc neurons (Figure 1a–c). In order to evaluate whether the bouton contacts between tVTA fibers and dopamine neurons were actual synapses, we analyzed the

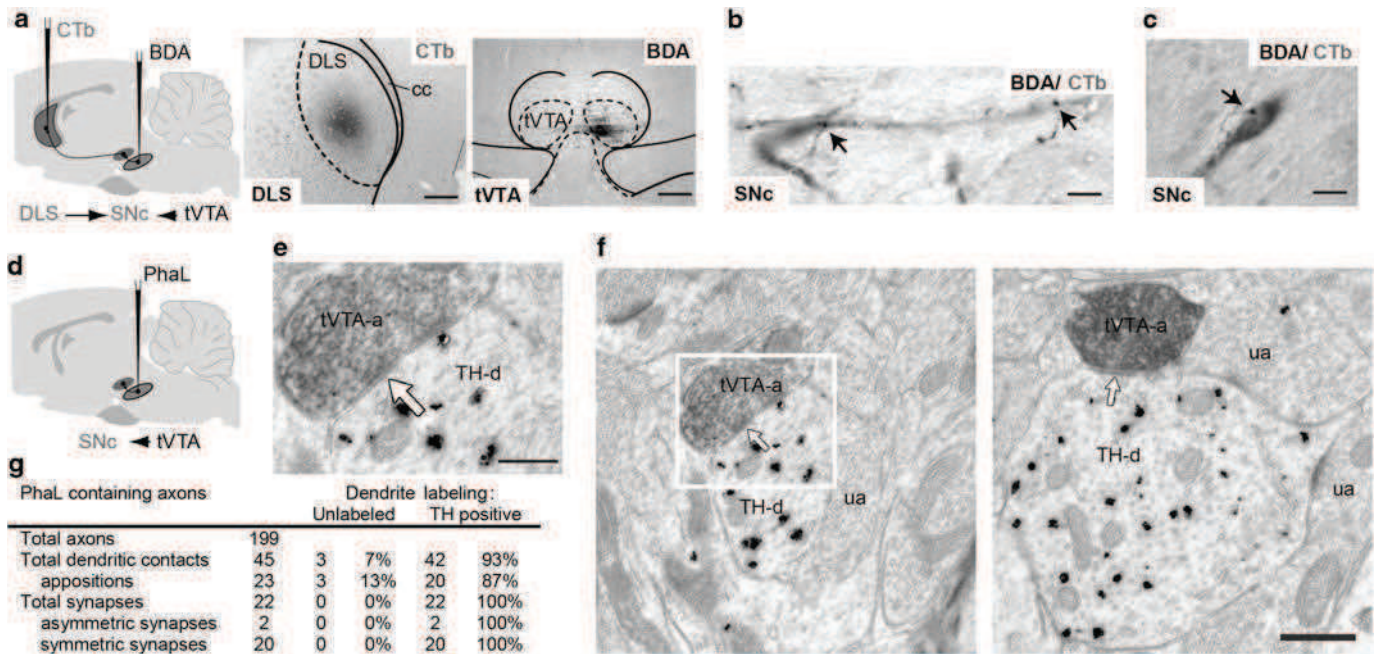


Figure 1 The tVTA neurons project to the nigrostriatal system. (a) Injection of the anterograde tracer BDA into the tVTA and of the retrograde tracer CTb into the dorsolateral striatum ($n=5$). (b and c) tVTA terminals (arrows) contact dendrites and cell soma of striatum-projecting SNc neurons. (d) Injection of the anterograde tracer PhaL into the tVTA ($n=4$). (e and f) Electron micrographs showing tVTA axon terminals (tVTA-a) forming synapses (arrow) onto SNc dendrites labeled for tyrosine hydroxylase (TH-d) and contacted by additional unlabeled axons (ua) (f, larger view; (e), details of boxed area). (g) Quantitative analysis of the electron microscopy experiment. Most of the tVTA terminals synapse onto dendrites in the SNc that are immunoreactive for TH. BDA, biotinylated dextran amine; cc, corpus callosum; CTb, cholera toxin β -subunit; DLS, dorsolateral striatum; PhaL, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. Scale bars, 500 μm (a), 20 μm (b, c), 0.25 μm (e), 0.5 μm (f).

SNc by electron microscopy after PhaL delivery into the tVTA. Most tVTA axons formed symmetric synapses with SNc dendrites immunoreactive for the dopamine synthetic enzyme TH (Figure 1d–g), showing that the tVTA–SNc projection is organized similarly to the tVTA–VTA projection (Balcita-Pedicino *et al*, 2011).

The tVTA Controls the Activity of SNc Dopamine Neurons

To examine the functional connectivity between the tVTA and the SNc, we then recorded *in vivo* the extracellular activity from single SNc dopamine neurons in anesthetized rats. Ninety-five percent of the recorded neurons were inhibited by a single pulse of electrical stimulation of the tVTA (Figure 2a–e and Supplementary Figure S2), with an onset latency for inhibition of 3.2 ± 1.3 ms and a mean duration of 60.5 ± 11.4 ms. We also observed that the duration of inhibition of SNc dopamine neurons was inversely correlated with the basal firing rate, while the magnitude of the response was uncorrelated (Supplementary Figure S2). Using a train of three pulses of stimulation instead of one, we observed a more prolonged inhibition of SNc cells (206.1 ± 25.0 ms; Supplementary Figure S2). The tVTA is, however, partially embedded within the fiber bundles of the superior cerebellar peduncle (Kaufling *et al*, 2009) and the dense passing fibers surrounding the tVTA could mediate part of the consequences of the electrical stimulation. Hence, microinjection of L-glutamate or a

labeled GABA_A receptor agonist, muscimol-BODIPY, was used to chemically stimulate or inhibit tVTA neurons, respectively, without affecting passing fibers. These mirror manipulations decreased (L-glutamate) or increased (muscimol-BODIPY) SNc dopamine neuron firing rate ($-61 \pm 6\%$ and $+113 \pm 43\%$ of basal activity, respectively) and bursting rate ($-72 \pm 7\%$ and $+132 \pm 42\%$ of basal bursting rate, respectively) (Figure 2f–i), thus revealing that the tVTA exerts both phasic and tonic inhibitory controls on the activity of these cells.

The tVTA Controls Motor Behavior

The neuroanatomical and electrophysiological data were supportive of a main inhibitory control exerted by the tVTA onto nigrostriatal dopamine neurons, which raised the question of the behavioral significance of this influence. The rotation model following SNc unilateral lesion has been widely used in Parkinson's disease research, with lesions inducing ipsilateral rotations after amphetamine administration (Figure 3c and d). This rotation bias is specific to the nigrostriatal pathway, as it is not present with VTA-restricted lesions (Kelly and Moore, 1976) (Figure 3e and f). Unilateral excitotoxic lesion of the tVTA alone increased contralateral rotational behavior ($+25.4\%$) (Figure 3a and b), opposite to what was observed following unilateral SNc lesions (Figure 3d) and consistent with a dysregulation of the inhibitory control of SNc dopamine neurons. We then tested whether a lesion of the tVTA might compensate the

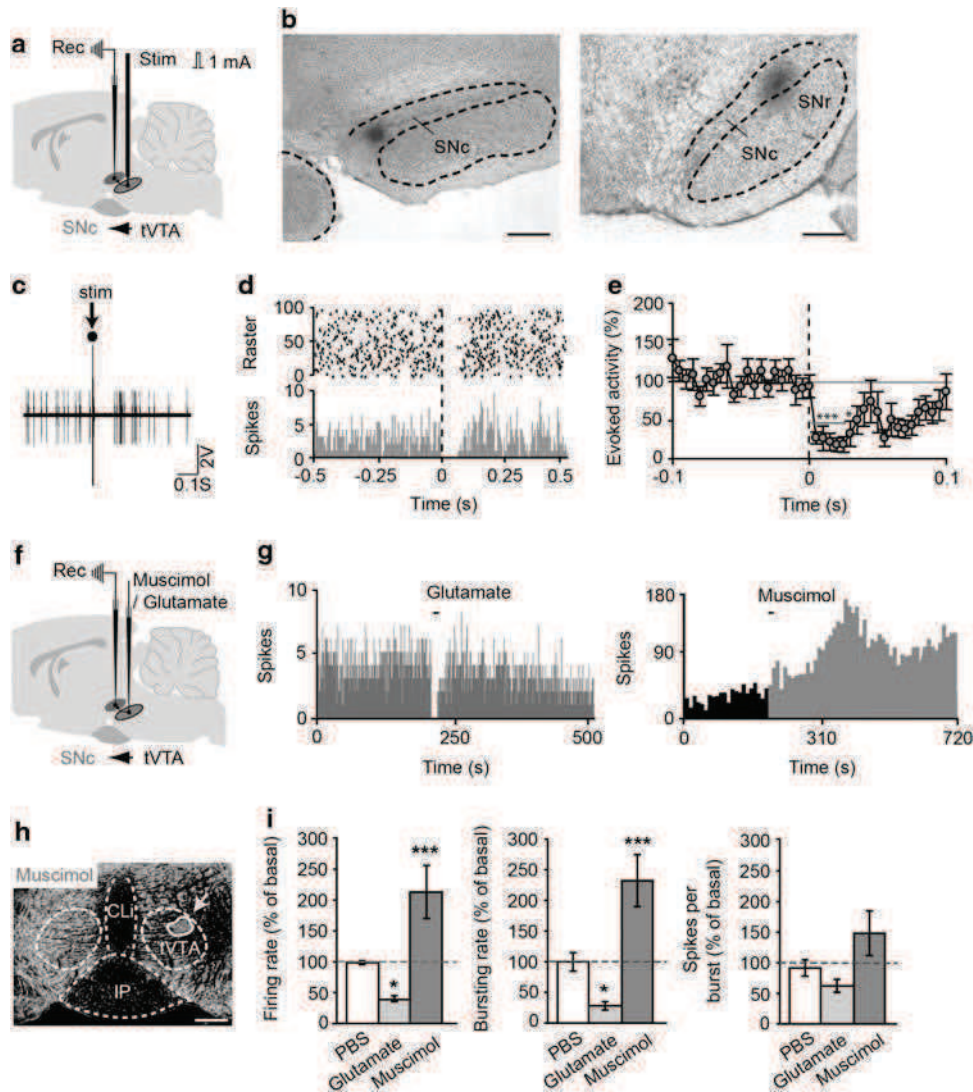


Figure 2 The tVTA controls SNc dopamine neuron activity. (a) Experimental protocol used for electrical stimulation. (b) Microphotographs of coronal sections through the SNc showing blue spots done at the end of recordings (left, anteromedial spot; right, posterolateral spot). (c) Example of a spike trace of a SNc dopamine neuron with a single pulse of tVTA stimulation at 1 mA. (d and e) Consequence of tVTA stimulation on a single SNc dopamine neuron (d) and on the mean of 19 neurons (e), $n = 19$, $F_{40,720} = 4.2$, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). (f) Experimental protocol used for chemical stimulation and inhibition of the tVTA. (g) Examples of unitary activities from single SNc dopamine neurons after tVTA chemical manipulation. (h) Injection site for muscimol-BODIPY in the tVTA. (i) Consequences of tVTA inhibition (muscimol, $n = 9$) or excitation (glutamate, $n = 16$) on SNc dopamine neuron activity (vs PBS vehicle, $n = 15$) (Firing rate $F_{2,37} = 22.3$, $p < 0.001$; bursting rate $F_{2,37} = 23.6$, $p < 0.001$; spikes/burst $F_{2,37} = 4.9$, $p < 0.02$; $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). Graphs represent mean \pm SEM. CLI, caudal linear nucleus of the raphe; IP, interpeduncular nucleus. Scale bar, 500 μ m (b and h).

rotation bias induced by a partial ipsilateral lesion of the SNc. The extent of the SNc lesion (Figure 3g) was similar in both groups ($53.9 \pm 7.1\%$ vs $57.0 \pm 7.5\%$ of SNc dopamine lesion for the SNc and the SNc-tVTA groups, respectively). While a strong ipsilateral amphetamine-induced rotation was observed after partial SNc lesion, this bias was absent in animals with concomitant lesion of the tVTA (Figure 3h).

To further explore nigrostriatal functions, we then studied motor performance. After bilateral tVTA lesion, we observed that the basal activity of SNc dopamine neurons was chronically enhanced (control, 3.5 ± 0.3 Hz; lesion, 5.2 ± 0.5 Hz) (Figure 4b), even though no significant locomotor hyperactivity was observed *per se* (Jhou *et al*, 2009b) (Figure 4c). Animals with ablation of the tVTA,

however, displayed a major increase in motor performance in rotarod tasks. During habituation to the apparatus at low speed, tVTA-lesioned rats displayed fewer falls than control rats (control, 3.3 ± 0.5 ; lesion, 0.6 ± 0.2) (Figure 4d). After the habituation day, control rats had good performance at this low speed (Figure 4e), but a major difference with tVTA-lesioned rats was present at a more challenging fixed speed, with an improvement of ORP in bilateral tVTA-lesioned rats compared with non-lesioned animals (ORP: control, 2262 ± 149 ; lesion, 4098 ± 450) (Figure 4e and f). The improvement also resulted in the capacity for animals without the tVTA to remain on the rotarod at higher speed than controls, as shown by the fall thresholds under a ramp acceleration procedure (r.p.m.: control, 10.0 ± 1.4 ; lesion,

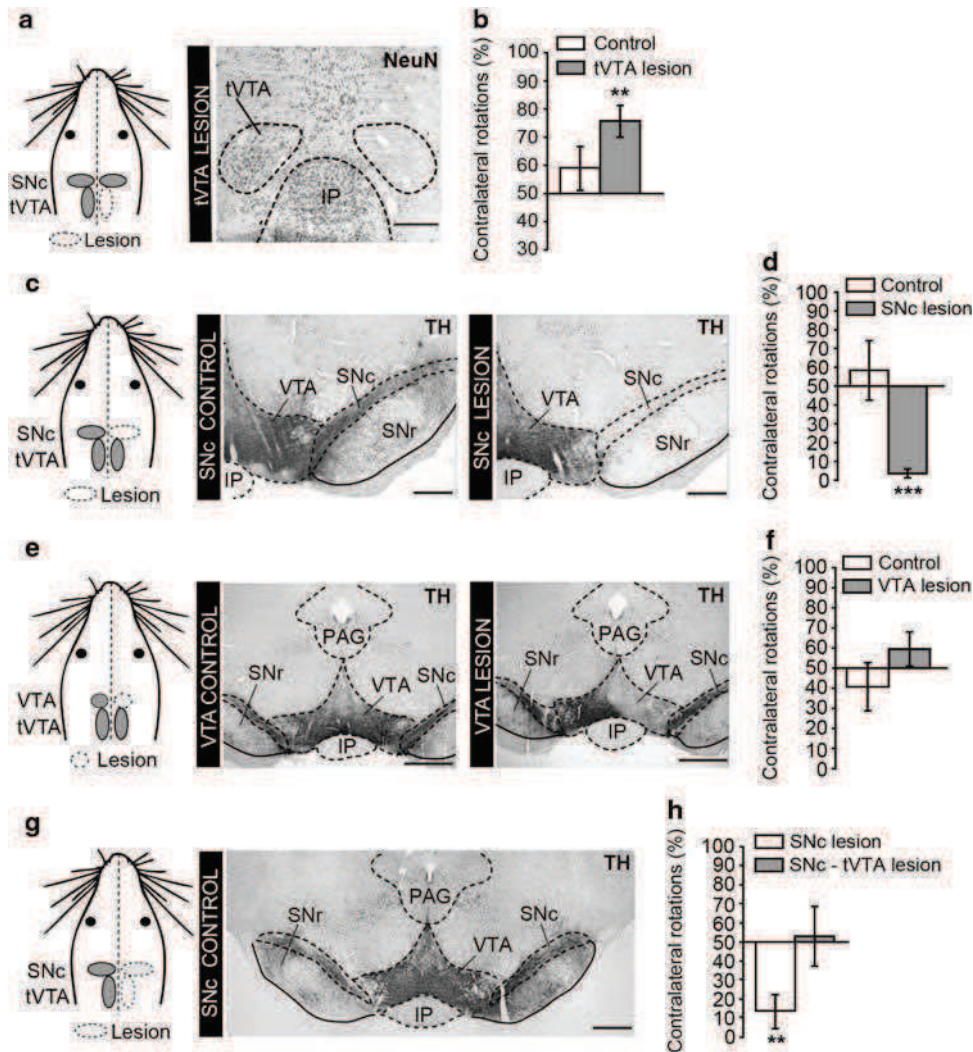


Figure 3 The tVTA controls rotation bias behavior. (a) Experimental protocol and histological evidence for unilateral tVTA lesion. (b) Unilateral tVTA lesion induces a contralateral rotation bias after amphetamine 3 mg/kg (control, $n = 17$; lesion, $n = 12$; $**p < 0.01$). (c) Experimental protocol and histological evidence for 6-OHDA unilateral SNc lesion. (d) Unilateral SNc lesion induces an ipsilateral rotation bias after amphetamine administration (control, $n = 12$; lesion, $n = 14$; $***p < 0.0001$ referred to 50%). (e) Experimental protocol and histological evidence for unilateral VTA lesion with ibotenic acid. (f) Unilateral VTA lesion does not induce a rotation bias after amphetamine administration (control, $n = 9$; lesion, $n = 7$; referred to 50%). (g) Experimental protocol for unilateral SNc-tVTA lesions. The microphotograph illustrates a left side partial SNc lesion. (h) A tVTA lesion prevents the amphetamine-induced ipsilateral rotation bias observed after partial unilateral SNc lesion (SNc lesion, $n = 8$; SNc-tVTA lesion, $n = 7$; $**p < 0.01$ referred to 50%). Graphs represent mean \pm SEM. 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; IP, interpeduncular nucleus; PAG, periaqueductal gray; SNc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra pars reticulata; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, ventral tegmental area. Scale bars, 400 μ m (a), 500 μ m (c, e, g).

18.5 ± 1.9) (Figure 4g). These performance enhancements following the tVTA ablation are opposite to the impairments observed following dopaminergic lesion of the dorsolateral striatum (Deumens *et al*, 2002) (Figure 5).

The motor improvement after bilateral tVTA lesion affected not only motor performance but also motor skill learning, as revealed in a specific experiment with repeated training over days (Figure 4h). In these conditions, tVTA-lesioned animals increased their performance over days while a ceiling effect was present in controls (control, 135 ± 22 s on day 3; lesion, 252 ± 40 s on day 4). The increased nigrostriatal activity and associated motor performance following tVTA lesion somewhat parallel those of the 'performance enhancing' drug, amphetamine. Indeed,

amphetamine enhances extracellular dopamine levels (Rebec, 2006; Sulzer, 2011), and in agreement with previous reports (Pryor *et al*, 1978), we observed that amphetamine increased motor performance in animals that had already learned the motor task (r.p.m: control, 13.9 ± 1.6 ; amphetamine, 21.2 ± 2.5) (Figure 6a). Interestingly, we also found that amphetamine can improve motor skill learning (Figure 6b). This action can be seen while under the acute influence of the drug (day 1 in Figure 6b), and the resulting improvement is long-lasting, persisting even though the animal is no more under the influence of the drug, as shown by the increased performance still present 24 h after the training done under amphetamine (day 2 in Figure 6b).

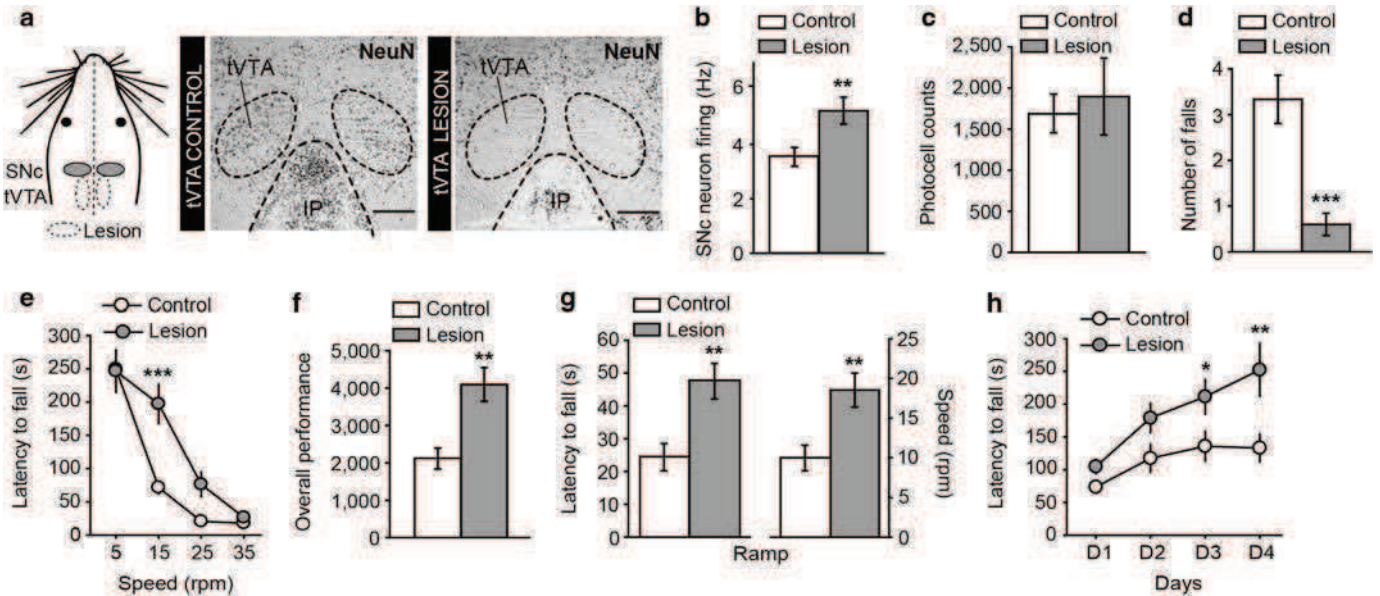


Figure 4 The tVTA controls motor behavior. (a) Experimental protocol and histological evidence for bilateral tVTA lesion. (b) Bilateral tVTA lesion increases SNc neuron basal firing (control, $n=22$; lesion, $n=23$; $**p<0.01$). (c) Locomotor activity of the bilateral tVTA-lesioned animals after subcutaneous saline injection (over 2 h) (control, $n=9$; lesion, $n=10$). (d) Number of falls in bilateral tVTA-lesioned and non-lesioned animals during their first rotarod training at low speed (5 r.p.m., 300 s) (control, $n=9$; lesion, $n=10$; $***p<0.001$). (e) Motor performance of the bilateral tVTA-lesioned animals in a rotarod task at successively increasing fixed speeds (control, $n=9$; lesion, $n=10$; $F_{3,51}=5.1$, $p<0.01$, $***p<0.001$). (f) Overall performance comparison between bilateral tVTA-lesioned and non-lesioned animals, corresponding to e ($**p<0.01$). (g) Latency to fall and speed of bilateral tVTA-lesioned animals in a ramp rotarod task (0–45 r.p.m. in 120 s) (control, $n=9$; lesion, $n=10$; $**p<0.01$). (h) Motor skill learning of the bilateral tVTA-lesioned animals in a rotarod task measured over successive days (0–45 r.p.m., in 300 s) (control, $n=10$; lesion, $n=9$; $F_{3,51}=3.5$, $p<0.05$; $*p<0.05$, $**p<0.01$). Graphs represent mean \pm SEM. r.p.m., rotations per minute; IP, interpeduncular nucleus. Scale bars, 500 μ m (a).

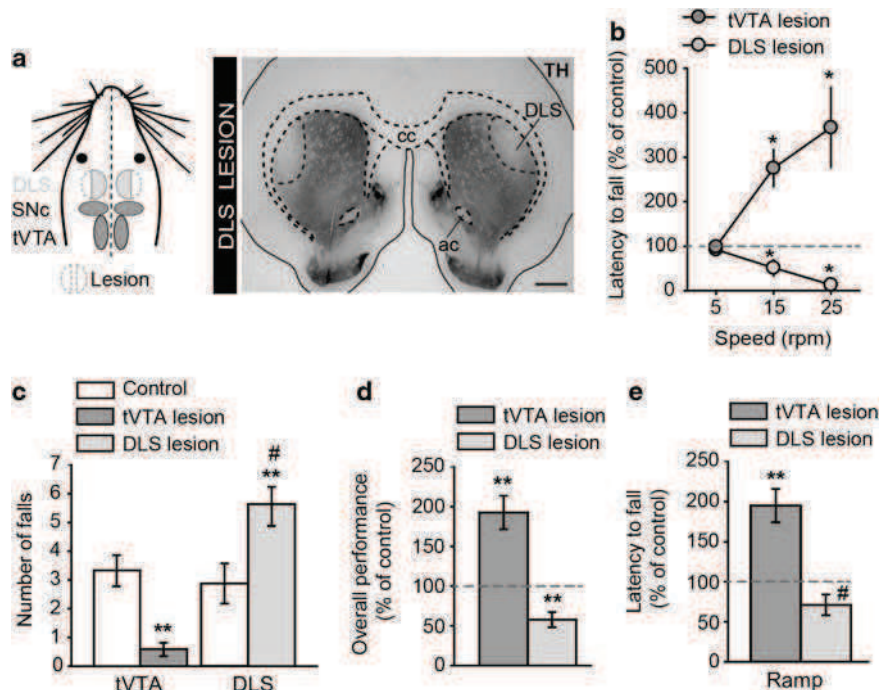


Figure 5 Comparison of motor performances between tVTA and dorsolateral striatum lesions. (a) Experimental protocol and histological evidence for bilateral DLS lesion with 6-OHDA. (b) Latency to fall of bilateral tVTA and DLS-lesioned animals in a rotarod task at fixed speed (tVTA, $n=10$, DLS, $n=11$; referred to 100%, $*p<0.05$). (c) Number of falls during the first day of rotarod training at low speed (control, $n=8-9$; tVTA lesion, $n=10$; DLS lesion, $n=11$; $**p<0.01$ compared with controls; tVTA–DLS comparison, $#p<0.001$). (d) Overall performance comparison corresponding to Figure 5b ($**p<0.01$ referred to 100%). (e) Latency to fall in a ramp rotarod task (0–45 r.p.m. in 120 s) (tVTA, $n=10$; DLS, $n=11$; $**p<0.01$, $#p=0.0507$, referred to 100%). Graphs represent mean \pm SEM. ac, anterior commissure; cc, corpus callosum; DLS, dorsolateral striatum; r.p.m., rotations per minute; TH, tyrosine hydroxylase. Scale bar, 1 mm (a).

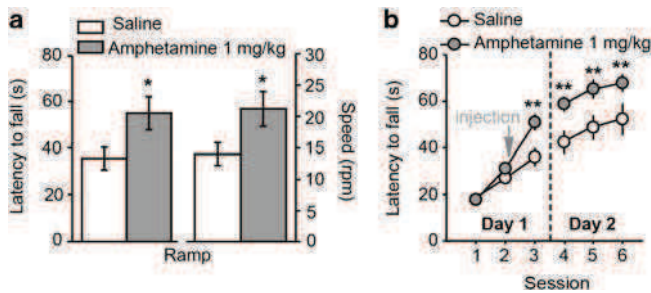


Figure 6 Amphetamine increases motor performance. (a) Amphetamine increases motor performance in a learned rotarod task (0–45 r.p.m., 120 s) (saline, $n = 10$; amphetamine, $n = 10$; $*p < 0.05$). (b) Amphetamine increases motor skill learning in a rotarod task assessed over successive days (0–45 r.p.m., 180 s) (saline, $n = 12$; amphetamine, $n = 13$; $F_{5,115} = 3.6$, $p < 0.01$, $**p < 0.01$). Graphs represent mean \pm SEM.

DISCUSSION

In this study, tract tracing and electron microscopy approaches allowed the visualization of a tVTA–nigrostriatal pathway. We then revealed the inhibitory influence of tVTA on the activity of SNc dopamine neurons by conducting *in vivo* electrophysiological studies. Together, these findings were supportive of a main role of the tVTA as a GABA brake for the nigrostriatal pathway. We then confirmed it at a behavioral level, first by observing an amphetamine-induced contralateral rotation bias following unilateral tVTA ablation, then by studying motor coordination and motor skill learning performances after bilateral ablation of the tVTA. The behavioral consequences of tVTA lesion are similar to the performance-enhancing action of a low dose of amphetamine, which also recruits dopamine systems. These findings highlight the major influence that the tVTA exerts over basal ganglia functions.

The anatomical data reveal a heavy projection from the tVTA to the nigrostriatal system. While studying the possible interconnections between the mesencephalic dopaminergic areas, a discrete subregion in the caudal pole of the VTA was previously shown to display efferents to the VTA–SNc complex (Ferreira *et al*, 2008). This subregion is now identified as the rostral part of the tVTA, a long GABA structure whose first tier is bilaterally inserted within the VTA and that spans rostrocaudally over 1 mm in rats, laterally to the median raphe nucleus and partially embedded with the superior cerebellar peduncle (Jhou *et al*, 2009a, 2009b; Kaufling *et al*, 2009, 2010a). Study of the tVTA–VTA efferents revealed that more than 80% of the synapses formed by tVTA axons in the VTA contacted the dendrites of dopamine cells (Balcita-Pedicino *et al*, 2011). The present data confirm the presence of a tVTA–SNc projection, and show appositions from tVTA fibers onto nigrostriatal neurons and the presence of symmetric synaptic connections between tVTA axons and TH-containing dendrites in the SNc. This structural organization is thus similar to the one that was observed in the VTA (Balcita-Pedicino *et al*, 2011), suggesting that the GABAergic tVTA should exert a main inhibitory control on both populations of dopamine cells.

Dopamine cells are under the control of excitatory and inhibitory inputs whose balance finely tunes cell activity

(Morikawa and Paladini, 2011). The tVTA is now recognized among the important inhibitory control regions for VTA cells (Barrot *et al*, 2012; Bourdy and Barrot, 2012; Jalabert *et al*, 2011; Lecca *et al*, 2011, 2012; Matsui and Williams, 2011), and the present data demonstrate that the tVTA is also critical for the regulation of SNc dopamine cell activity. Indeed, we show that the tVTA influences both the firing rate and bursting rate of SNc dopamine cells and that this control is both phasic and tonic. Single-pulse electrical stimulation of GABAergic inputs originating in the striatum, the globus pallidus or the substantia nigra pars reticulata produces an inhibition lasting around 30 ms (Paladini *et al*, 1999), whereas a similar stimulation in the tVTA produces an inhibition lasting around 60 ms (Figure 2c–e). These two independent sets of data collected in very similar experimental conditions highly suggest that the tVTA exerts a greater inhibition of the SNc dopamine neurons than the classical inhibitory inputs arising from the basal ganglia itself.

The presence of excitatory glutamate signaling can also be important to increase dopamine cell activity following the removal of the GABA brake on these neurons (Jalabert *et al*, 2011). In the case of SNc dopamine cells, such excitatory inputs are provided by structures within the basal ganglia circuitry but also from the somatosensory and from the primary and secondary motor cortices (Watabe-Uchida *et al*, 2012). This connectivity suggests that removing the tVTA braking influence could amplify the impact of these sensorimotor-related excitatory afferents on the nigrostriatal system whose stimulated state could then favor specific striatal functions.

Previous functional data on the tVTA concerned its influence on the mesolimbic system, more particularly in relation to aversive and avoidance behaviors (Jhou *et al*, 2009b; Stamatakis and Stuber, 2012) and to drugs of abuse (Jalabert *et al*, 2011; Jhou *et al*, 2012, 2013; Lecca *et al*, 2011, 2012; Matsui and Williams, 2011). Thus, GABA cells of the tVTA are targets for psychostimulants, including amphetamines, as shown by the expression of Fos proteins (Cornish *et al*, 2012; Jhou *et al*, 2009a, 2009b; Kaufling *et al*, 2009, 2010a, 2010b; Geisler *et al*, 2008; Lavezzi *et al*, 2011; Lecca *et al*, 2011; Matsui and Williams, 2011; Perroti *et al*, 2005; Rotllant *et al*, 2010; Scammel *et al*, 2000; Zahm *et al*, 2010). In rats, this expression is classically used to visualize the tVTA. Electrophysiologically, the tVTA neurons are also targets for cannabinoids and opiates (Jalabert *et al*, 2011; Lecca *et al*, 2011, 2012; Matsui and Williams, 2011). In the latter case, investigations of the tVTA recently led to an updated disinhibition model for opiate recruitment of VTA dopamine cells (Bourdy and Barrot, 2012; Jalabert *et al*, 2011; Johnson and North, 1992; Matsui and Williams, 2011) and behavioral evidence further supports the role of the tVTA in the rewarding and reinforcing properties of opiates (Jhou *et al*, 2012). Behaviorally, the tVTA has also been shown to be important for freezing in a fear conditioning paradigm or to a predator odor (Jhou *et al*, 2009b), and to promote active, passive, and conditioned avoidance behaviors when its inputs from the lateral habenula are stimulated (Stamatakis and Stuber, 2012). In monkeys, tVTA neurons can detect reward prediction errors (Hong *et al*, 2011). While progress has been made concerning the physiology of this brain region, behavioral studies have

focused on reward/avoidance aspects. The neuroanatomical and electrophysiological data nevertheless suggest that the tVTA should also regulate nigrostriatal functions such as motor control.

Rotation bias and motor coordination performance are supportive of a main influence of the tVTA on nigrostriatal functions. The amphetamine-induced rotation bias following unilateral lesions is selective for the nigrostriatal pathway, as shown by the lack of such bias following unilateral VTA lesion (Kelly and Moore, 1976; present data); and the opposite bias observed with SNc and tVTA lesions is in agreement with an inhibitory influence of tVTA on the nigrostriatal pathway. The tVTA-lesion rotation bias is, however, milder than the SNc lesion one, which may be related to the connectivity of these regions and/or to amphetamine's properties. Indeed, the tVTA–SNc pathway also includes contralaterally directed fibers, although it is principally ipsilateral (Jhou *et al*, 2009a; Kaufling *et al*, 2010a), whereas the nigrostriatal pathway is more strictly lateralized. Moreover, amphetamine is able to directly release dopamine (Sulzer, 2011), an action that would be less affected by changes in dopamine neuron activity. Despite this mild effect of tVTA lesion alone, such a lesion can compensate for the strong rotation bias induced by a partial ipsilateral lesion of the SNc, which further highlights the control exerted by the tVTA on the nigrostriatal pathway.

Under mildly increased dopamine cell activity, as obtained by removing the tVTA GABA brake on SNc neurons, or after mildly enhanced aminergic transmission, as provided by a low dose of amphetamine, we observed an improvement of both motor performance and motor-related learning. The execution of challenging coordinated movements requires a concerted action of motor and sensory systems, for which the cerebral cortex, the cerebellum, and the basal ganglia are crucial components (Groenewegen, 2003). The fine-tuning of these brain regions participates not only in the execution of movement but also in associated motor learning (Groenewegen, 2003; Penhune and Steele, 2012). Indeed, complex movements have to be learned and practiced repeatedly to improve their execution. Nigrostriatal dopamine is an important modulator of these mechanisms, which are impaired following the partial loss or disruption of this pathway (Akita *et al*, 2006; Beeler *et al*, 2010; Ogura *et al*, 2005; Willuhn and Steiner, 2008). In this context, plasticity at glutamatergic corticostriatal synapses within the dorsal striatum has been implicated in motor learning (Dang *et al*, 2006; Pisani *et al*, 2005; Yin *et al*, 2009) and is regulated by dopamine (Calabresi *et al*, 2007). Both D₁ receptor-expressing striatonigral and D₂ expressing striatopallidal medium-sized spiny neurons appear to be critical for optimal performance during early motor learning (Durieux *et al*, 2012). However, striatonigral neurons seem to be more crucial than striatopallidal neurons for longer-term gradual motor skill acquisition or for the execution of a previously learned motor sequence (Durieux *et al*, 2012), even though synaptic potentiation is preferentially expressed in striatopallidal neurons after extensive motor training (Yin *et al*, 2009). The tVTA, by setting the level of activity of dopamine systems, appears to be a major controller for basal ganglia functions. The fact that the lesion of the tVTA or a low dose

of amphetamine lead to motor improvement suggests that these manipulations may operate within the physiological range and could thus favor a harmonious recruitment of the basal ganglia circuits and of the above-mentioned plasticity. In this respect, much higher doses of amphetamine are known to impair motor performance (Gerald and Gupta, 1977). Further studies will, however, be required to detail the mechanism leading to motor improvement after tVTA ablation, and in particular, its impact on the direct and indirect pathways and on striatal plasticity.

The neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence supports a main role of the tVTA as a GABA brake for dopamine systems, and they raise the question of tVTA integration within basal ganglia circuitry (Albin *et al*, 1989; Redgrave *et al*, 2010; Tepper and Lee, 2007). Increasing nigrostriatal transmission in this circuit, either through tVTA suppression or an amphetamine-like performance enhancer, not only improves motor coordination but also motor skill learning, highlighting the learning influence of the dopamine system (Wise, 2004). These data warrant further functional research on the tVTA influence over dopamine-related functions in both physiological and dopamine-related pathological contexts.

FUNDING AND DISCLOSURE

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Université Bordeaux Segalen, Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-sv4-002), Fondation pour la Recherche Médicale, NIH (MH067937) and by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Dorothée Daniel for her technical support.

REFERENCES

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366–375.
- Akita H, Ogata M, Jitsuki S, Ogura T, Oh-Nishi A, Hoka S *et al* (2006). Nigral injection of antisense oligonucleotides to synaptotagmin I using HVJ-liposome vectors causes disruption of dopamine release in the striatum and impaired skill learning. *Brain Res* 1095: 178–189.
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial tegmental nucleus. *J Comp Neurol* 519: 1143–1164.
- Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Jhou TC (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neurosci* 32: 14094–14101.
- Beeler JA, Cao ZF, Kheirbek MA, Ding Y, Koranda J, Murakami M *et al* (2010). Dopamine-dependent motor learning: insight into levodopa's long-duration response. *Ann Neurol* 67: 639–647.
- Bourdy R, Barrot M (2012). A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci* 35: 681–690.

- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30: 211–219.
- Cornish JL, Hunt GE, Robins L, McGregor IS (2012). Regional c-Fos and FosB/DeltaFosB expression associated with chronic methamphetamine self-administration and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience* 206: 100–114.
- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y et al (2006). Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15254–15259.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175: 303–317.
- Durieux PF, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J* 31: 640–653.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153: 196–213.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M et al (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688–2700.
- Gerald MC, Gupta TK (1977). The effects of amphetamine isomers on rotarod performance. *Psychopharmacology* 55: 83–86.
- Groenewegen HJ (2003). The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 10: 107–120.
- Hong S, Zhou TC, Smith M, Saleem KS, Hikosaka O (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci* 31: 11457–11471.
- Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M et al (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16446–16450.
- Johnson SW, North RA (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483–488.
- Zhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009a). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513: 566–596.
- Zhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009b). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61: 786–800.
- Zhou TC, Xu SP, Lee MR, Gallen CL, Ikemoto S (2012). Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist Endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology* 224: 303–312.
- Zhou TC, Good CH, Rowley CS, Xu SP, Wang H, Burnham NW et al (2013). Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J Neurosci* 33: 7501–7512.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513: 597–621.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010a). Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67: 88–92.
- Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ et al (2010b). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161: 1677–1691.
- Kelly PH, Moore KE (1976). Mesolimbic dopaminergic neurons in the rotational model of nigrostriatal function. *Nature* 263: 695–696.
- Lavezzi HN, Parsley KP, Zahm DS, Lavezzi HN (2011). Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculopontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct Funct* 217: 719–734.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL et al (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36: 589–602.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37: 1164–1176.
- Matsui A, Williams JT (2011). Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 31: 17729–17735.
- Morikawa H, Paladini CA (2011). Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 198: 95–111.
- Ogura T, Ogata M, Akita H, Jitsuki S, Akiba L, Noda K et al (2005). Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 51: 299–308.
- Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 30: 1239–1250.
- Paladini CA, Celada P, Tepper JM (1999). Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors *in vivo*. *Neuroscience* 89: 799–812.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. 4th edn. Academic: San Diego, CA, USA.
- Penhune VB, Steele CJ (2012). Parallel contributions of cerebellar, striatal and M1 mechanisms to motor sequence learning. *Behav Brain Res* 226: 579–591.
- Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Utery PG et al (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21: 2817–2824.
- Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005). Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord* 20: 395–402.
- Pryor GT, Larsen FF, Husain S (1978). Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with d-amphetamine, cocaine and nicotine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 8: 295–318.
- Rebec GV (2006). Behavioral electrophysiology of psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 31: 2341–2348.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H et al (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11: 760–772.
- Rotllant D, Márquez C, Nadal R, Armario A (2010). The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience* 168: 691–705.
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1997). An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Prot* 2: 75–84.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS et al (2000). Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20: 8620–8628.

- Stamatakis AM, Stuber GD (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci* **15**: 1105–1107.
- Sulzer D (2011). How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* **69**: 628–649.
- Tepper JM, Lee CR (2007). GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Prog Brain Res* **160**: 189–208.
- Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* **303**: 2040–2042.
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* **74**: 858–873.
- Willuhn I, Steiner H (2008). Motor-skill learning in a novel running-wheel task is dependent on D1 dopamine receptors in the striatum. *Neuroscience* **153**: 249–258.
- Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**: 483–494.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilário MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI et al (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* **12**: 333–341.
- Zahm DS, Becker ML, Freiman AJ, Strauch S, Degarmo B, Geisler S et al (2010). Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology* **35**: 445–463.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

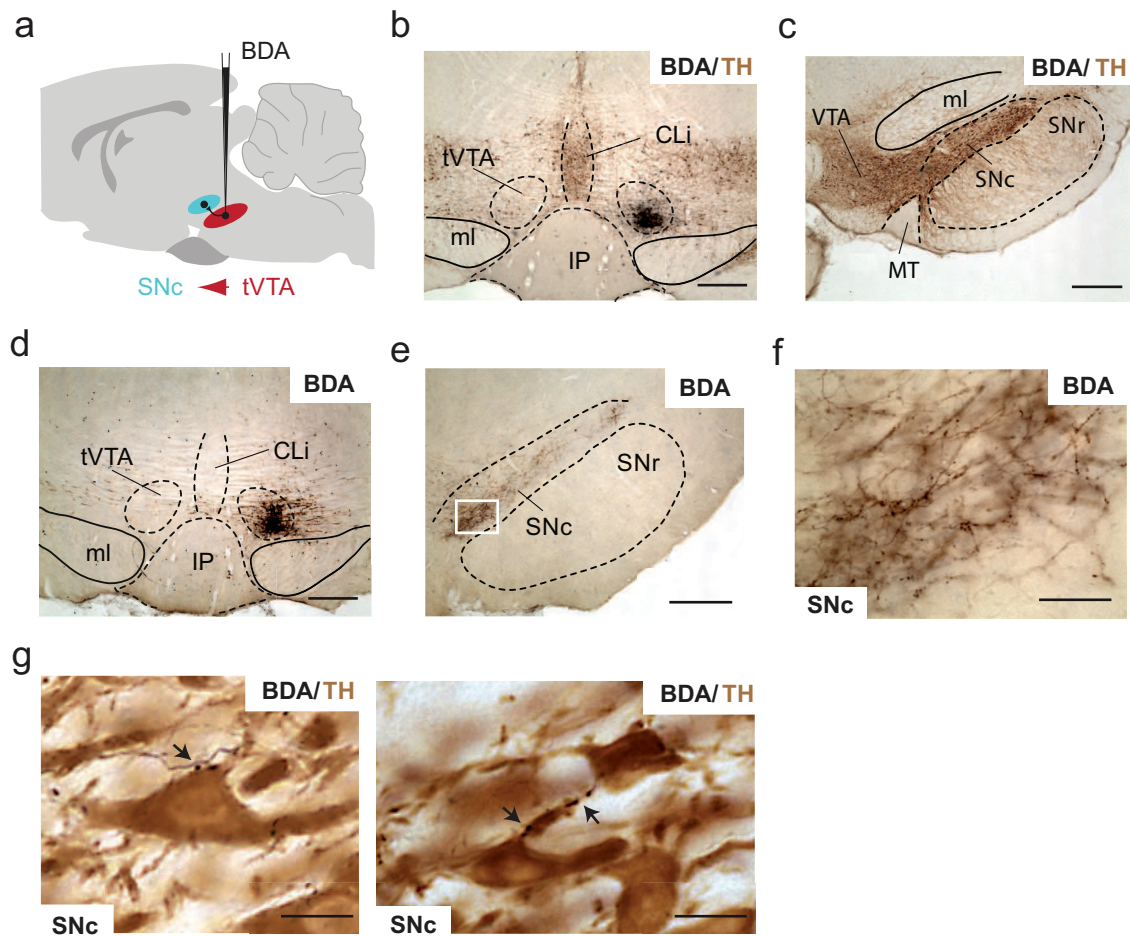


Figure S1. The tVTA neurons project to the SNc. **(a)** Experimental protocol for BDA injection into the tVTA ($n = 7$). **(b)** Example of a BDA injection site into the tVTA (black) with TH co-labeling (brown). **(c)** Example of the anterograde labeling observed in the SNc following BDA injection into the tVTA with TH co-labeling. **(d)** Example of a BDA injection site into the tVTA. **(e, f)** Example of the anterograde labeling observed in the SNc following BDA injection into the tVTA. **(e,** larger view; **f,** details of boxed area). **(g)** Examples of tVTA terminals making appositions (black arrows) on dopamine neurons in the SNc. BDA, biotinylated dextran amine; CLi, caudal linear nucleus of the raphe; CTb, cholera toxin β -subunit; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; MT, medial terminal nucleus of the accessory optic tract; SNc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra pars reticulata; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, ventral tegmental area. Scale bars = 500 μm in **(b-e)**, 10 μm in **(f, g)**.

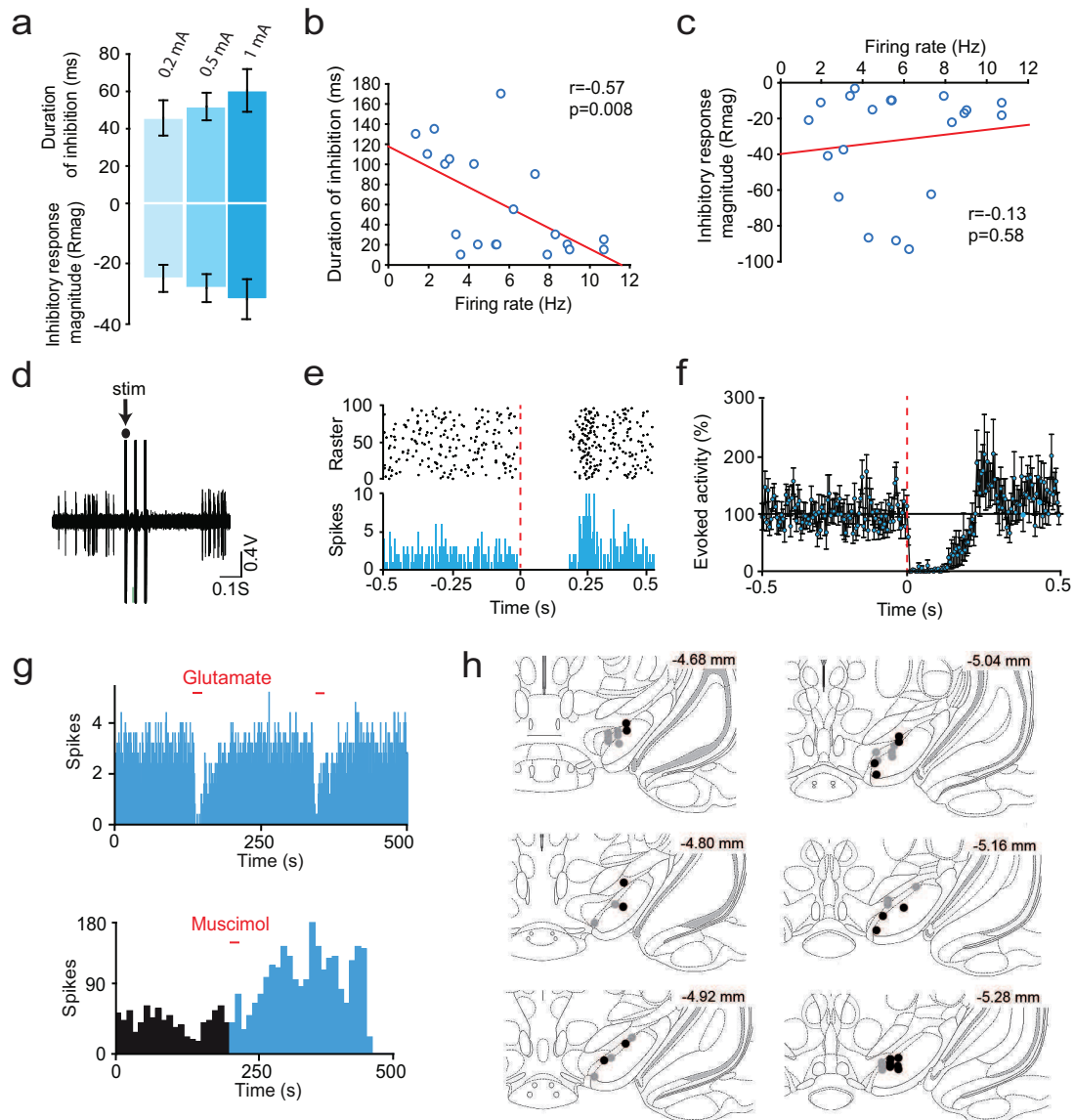


Figure S2. The tVTA exerts an inhibitory influence over SNc dopamine neurons. **(a)** The inhibition duration and inhibitory response magnitude of SNc dopamine neurons for tVTA stimulation at 0.2 ($n = 13$), 0.5 ($n = 24$) and 1 mA ($n = 19$). At 1 mA stimulation, 95% of neurons were inhibited (18 out of 19 neurons) with an onset of inhibition of 3.2 ± 1.3 ms, an inhibition duration of 60.5 ± 11.4 ms and an inhibition magnitude of -32.2 ± 6.6 . **(b)** The duration of inhibition of SNc dopamine neurons is inversely correlated to their spontaneous activity (1 mA, $n = 19$; linear regression, $r = -0.57$, $p < 0.01$). **(c)** The magnitude of the inhibitory response of SNc dopamine neurons is not correlated to their spontaneous activity (1 mA, $n = 19$; linear regression, $r = 0.13$, $p = 0.58$). **(d)** Example of a spike trace of a SNc dopamine neuron with 3 pulses of tVTA stimulation at 1 mA. **(e)** Consequence of 3 pulses of tVTA stimulation on a single SNc dopamine neuron **(f)** and on the mean of 9 neurons **(f, $n = 9$, $F_{98,784} = 5.6$, $p < 0.001$)**. **(g)** Examples of unitary activities from single SNc dopamine neurons after tVTA chemical manipulation. For glutamate, the chemical stimulation was repeated twice for the presented neuron. **(h)** Estimated locations of the recorded neurons in the SNc corresponding to Figure 4b (grey circles, control group; black circles, tVTA lesion group). Graphs represent mean \pm SEM.

G- Discussion : Rôle de la tVTA dans la motricité

Les données obtenues dans le cadre de cet article indiquent que des lésions de la tVTA affectent des comportements moteurs connus comme étant dépendants de la libération de dopamine dans le striatum dorsal par le système nigrostrié. Cependant nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence de lien direct entre la tVTA et la libération de dopamine dans le striatum dorsal. En effet, l'influence de la tVTA sur les comportements moteurs testés sous-entend une influence de cette structure sur les taux de dopamine striataux et peut être expliquée par un certain nombre d'hypothèses.

1- Rôle de la tVTA dans le comportement de rotation (Figure 6B)

Nous avons montré que des rats ayant subi une lésion unilatérale de la tVTA présentent un biais de rotation contralatéral à la lésion ce qui est opposé à ce qui est classiquement observé lors de lésions unilatérales de la SNC. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la lésion de cette structure GABAergique, exerçant un contrôle inhibiteur sur les neurones dopaminergiques de la SNC, conduit à une inhibition de la fréquence de décharge et des bouffées de potentiels d'action des neurones de la SNC situés du même côté. Ces bouffées de potentiels d'action sont impliquées dans la libération transitoire de dopamine dans le striatum. Lors d'une injection d'amphétamine, les taux de dopamine présents au sein du striatum localisé du côté de la lésion de la tVTA sont plus élevés que du côté intact du fait d'une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques liée à la suppression du contrôle inhibiteur exercé par la tVTA. Cela pourrait compenser l'effet inhibiteur connu de l'amphétamine sur la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques, conduisant à un biais de rotation contralatéral à la lésion, toujours du côté où la transmission dopaminergique striatale est la plus faible. D'autre part, les résultats obtenus ont montré que le nombre total de rotations était nettement supérieur chez les rats présentant une lésion unilatérale totale de la SNC que chez les rats lésés dans la tVTA. Les lésions de la tVTA lèvent l'inhibition exercée par cette structure sur les neurones dopaminergiques, qui continuent à décharger. Cela pourrait expliquer l'effet plus modéré des lésions de la tVTA sur le comportement de rotation, mais suggère un contrôle puissant de la tVTA sur la SNC.

2- Rôle de la tVTA dans les performances motrices et l'apprentissage moteur

Dans notre étude, des lésions bilatérales de la tVTA sont responsables d'une augmentation significative des performances des rats dans le test du rotarod. L'effet comportemental est si puissant qu'il peut être observé à l'œil nu pendant le test. L'hypothèse permettant d'expliquer cet effet est similaire à l'hypothèse précédente. Cette augmentation des performances motrices pourrait être expliquée par une augmentation

de la fréquence de décharge et des bouffées de potentiels d'action des neurones dopaminergiques de la SNc, conduisant à une augmentation des taux de dopamine dans le striatum dorsal demeurant dans une gamme physiologique. L'action de la dopamine dans les ganglions de la base pourrait avoir un effet promoteur sur l'initiation de l'action et la réalisation de séquences motrices chez les rats lésés, conduisant à de meilleures performances. Dans notre étude, les rats ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA (les mêmes que les animaux testés dans le test du rotarod) ne présentent pas de différences d'activité locomotrice en comparaison avec les animaux contrôles (Figure 4c de l'article), comme cela avait été démontré précédemment (Jhou et al., 2009a). Cependant, des études récentes ont montré qu'une inhibition transitoire de la tVTA par une approche d'optogénétique, une injection locale d'un agoniste des récepteurs GABA_A, ou une injection locale d'un mélange d'agonistes des récepteurs GABA_A et GABA_B pouvaient conduire à une augmentation de l'activité locomotrice (Jhou et al., 2013; Huff and LaLumiere, 2015; Lavezzi et al., 2015). D'autre part, l'injection d'un antagoniste des récepteurs GABA_A dans la tVTA bloque l'augmentation de l'activité locomotrice observée en réponse à une désinhibition de l'aire préoptique latérale, une afférence de la tVTA. Ce type d'activation de la tVTA par l'inhibition des afférences GABAergiques supprime également l'activation motrice conditionnée par un traitement chronique à l'amphétamine (Lavezzi et al., 2015). Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence entre une lésion définitive et une inhibition phasique de la structure. En effet, dans le cas d'une lésion, des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place progressivement dans les structures effectrices et ainsi masquer l'augmentation de l'activité motrice. Dans le cas d'une inhibition phasique, cette plasticité n'a pas le temps de se mettre en place et l'inhibition de la tVTA pourrait conduire à une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques et de la libération de la dopamine dans leurs structures effectrices entraînant une augmentation de l'activité motrice. L'amélioration des performances motrices observée pourrait également être liée à la suppression par les lésions d'autres fonctions attribuées à la tVTA comme l'inhibition motrice en réponse à une situation aversive (Jhou et al., 2009a), ou à son rôle éventuel dans l'inhibition des comportements motivés via ses projections sur la VTA. Cependant, les animaux ont été entraînés, puis testés à plusieurs reprises dans le test du rotarod et la différence entre les animaux lésés et contrôles persiste avec la répétition des tests, ce qui écarte un effet potentiellement anxigène du test. La distinction entre la part des effets purement moteurs et celle des effets motivationnels est difficile à mettre en évidence du fait des projections de la tVTA à la fois sur la SNc et la VTA.

Les lésions bilatérales de la tVTA entraînent une amélioration de l'apprentissage moteur des animaux dans un protocole d'apprentissage utilisé dans le test du rotarod. Cet effet pourrait être lié à la mise en place d'une plasticité à long terme des synapses corticostriatales en réponse à l'augmentation des taux de dopamine striataux provoquée par les lésions de la tVTA. La mise en place d'une telle plasticité a été montrée à de nombreuses reprises comme étant impliquée dans les mécanismes d'apprentissage moteur (Pisani et al., 2005; Dang et al., 2006; Bromberg-Martin et al., 2010).

Dans le cadre d'une collaboration, les taux de dopamine striataux ont été mesurés par microdialyse et par "punch" chez des animaux ayant subi des lésions de la tVTA et ne

diffèrent pas de ceux des animaux contrôles. Ces résultats remettent en cause nos hypothèses basées sur l'augmentation des taux de dopamine dans le striatum dorsal. L'augmentation de la fréquence de décharge et des bouffées de potentiels d'action des neurones de la SNc suite aux lésions de la tVTA pourrâit être à l'origine d'une augmentation de la libération transitoire de dopamine dans le striatum dorsal plutôt qu'à une augmentation des taux globaux. La résolution temporelle de la microdialyse n'est pas suffisante pour observer ces transitions. Des recherches supplémentaires, utilisant une technique possédant une résolution temporelle plus précise comme la technique d'ampérométrie seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Discussion

A- Données récentes concernant la tVTA

Depuis l'année 2010, où j'ai commencé à travailler sur le sujet, le nombre d'études concernant directement la tVTA a fortement augmenté (passant de 3 à plus de 30). Les données les plus récentes apportent principalement des informations précises sur l'anatomie de la tVTA, ainsi que sur son rôle dans la réponse aux drogues et l'aversion.

1- Données neuroanatomiques

D'un point de vue neuroanatomique, il a été montré qu'il existait une organisation topographique des projections de la LHb sur les neurones de la VTA et de la tVTA. En effet, l'utilisation de traceurs rétrograde et antérograde a permis de montrer que les entrées habénulaires de la tVTA proviennent de la partie latérale de la LHb et que les entrées habénulaires de la VTA proviennent de la partie médiale de la LHb. L'existence du circuit disynaptique LHb/tVTA/VTA a également été confirmée par une approche de double traçage (Gonçalves et al., 2012). Ces résultats anatomiques posent la question de l'intérêt d'utiliser la réponse des neurones de la tVTA à la stimulation de la LHb comme critère d'identification de la structure. En effet, les neurones de la tVTA ne répondant pas à la stimulation de la LHb lorsqu'elle est réalisée dans sa partie médiale, pourraient être exclus à tort. Des études de traçage ont également montré que les neurones de l'hypothalamus latéral envoient des projections glutamatergiques aux neurones de la LHb projetant à la VTA et la tVTA (Poller et al., 2013). Ces deux structures reçoivent en outre des afférences directes de l'hypothalamus latéral (Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009), dont la nature neurochimique n'est pas identifiée. L'hypothalamus latéral, impliqué dans l'homéostasie, pourrait par conséquent contrôler la tVTA et la VTA soit directement, soit indirectement via un traitement de l'information par la LHb dans le circuit hypothalamus latéral/LHb/tVTA. Ces résultats neuroanatomiques renforcent l'idée d'un rôle de la tVTA dans la transmission d'informations depuis des régions impliquées dans l'homéostasie vers les systèmes dopaminergiques, dans le but de déclencher des comportements adaptés (Bourdy and Barrot, 2012). Les afférences de la tVTA ciblent spécifiquement les neurones dopaminergiques du mésencéphale, mais elles touchent également d'autres structures comme le PPN, le raphé dorsal et une partie de la formation réticulée. La majeure partie des neurones de la tVTA projetant à la VTA projette également à l'une de ces régions (Lavezzi et al., 2012). Une étude récente s'est intéressée aux projections de la tVTA et de la LHb sur le noyau du raphé (Sego et al., 2013). De manière intéressante, la tVTA et la LHb, toutes les deux impliquées dans le traitement des stimuli aversifs et dans le contrôle inhibiteur des noyaux monoaminergiques, projettent de façon différentielle au raphé dorsal. Les neurones de la partie médiale de la LHb projettent de manière diffuse à la partie postérieure du raphé dorsal, riche en neurones sérotonergiques. Les projections GABAergiques de la tVTA au raphé dorsal sont plus denses et ciblent une sous-région pauvre en neurones sérotonergiques et enrichie en neurones glutamatergiques. Par cette

organisation anatomique particulière, la Lhb pourrait influencer le raphé dorsal soit directement via les projections des neurones de sa partie médiale aux neurones sérotonergiques du raphé dorsal, soit indirectement via les projections des neurones de sa partie latérale à la tVTA (Gonçalves et al., 2012), conduisant à une inhibition des neurones glutamatergiques du raphé dorsal. Ce type d'organisation rappelle le concept d'accélérateur/frein proposé par Arvid Carlsson avec une structure glutamatergique dont l'activation peut exciter directement ou inhiber un noyau monoaminergique via ses projections à une structure intermédiaire GABAergique (Carlsson et al., 2001).

2- Données fonctionnelles

a- Implications comportementales de la tVTA dans la réponse aux opioïdes

De nombreuses données d'électrophysiologie ont contribué à mettre en évidence un rôle essentiel de la tVTA dans la réponse des neurones dopaminergiques à la morphine (Jalabert et al., 2011; Matsui and Williams, 2011; Lecca et al., 2012). Plus récemment, ce rôle a été confirmé par une étude démontrant sur des tranches de cerveau que les agonistes des récepteurs des opioïdes de type mu sont responsables d'une inhibition de 46% des IPSCs induits dans les neurones dopaminergiques de la VTA en réponse à une stimulation optogénétique de la tVTA (Matsui et al., 2014). La particularité de la tVTA par rapport aux autres afférences GABAergiques de la VTA sensibles aux opioïdes semble être son rôle dans la réponse aiguë à la morphine. Après avoir été étudié d'un point de vue électrophysiologique, le rôle de la tVTA dans la réponse aux opioïdes a été testé d'un point de vue comportemental. Les récepteurs muscariniques de type M5 sont nécessaires pour l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA par les opioïdes (Steidl et al., 2011). La transfection bilatérale de récepteurs cholinergiques muscariniques de type M5 dans les neurones de la tVTA entraîne une inhibition puissante de l'activité locomotrice induite par la morphine chez la souris. Ces effets sont opposés à l'augmentation de l'activité locomotrice observée lorsque la transfection a lieu dans les neurones dopaminergiques de la VTA (Wasserman et al., 2013). Ces résultats indiquent qu'une stimulation de la tVTA par un renforcement de ses entrées cholinergiques est responsable d'une inhibition accrue de la VTA, conduisant à une diminution des effets locomoteurs de la morphine. D'autre part, des injections d'opioïdes dans la tVTA modulent les comportements associés à la récompense. En effet, les animaux s'auto-administrent de l'endomorphine-1, un peptide endogène possédant une forte affinité pour les récepteurs de type mu, de manière préférentielle dans la tVTA en comparaison avec la VTA (Jhou et al., 2012). De plus, l'injection de l'endomorphine-1 dans la tVTA induit de la préférence de place conditionnée, indiquant un rôle de cette structure dans les effets récompensants des opioïdes.

b- Implications comportementales de la tVTA dans la réponse aux autres drogues

L'activité électrophysiologique de la tVTA peut être modulée par d'autres drogues addictives comme les cannabinoïdes et la cocaïne (Lecca et al., 2011), conduisant à une modification de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca et al., 2012). Ces mécanismes peuvent influencer les réponses comportementales associées à ces drogues. Chez les rats de la lignée "Lister Hooded", les femelles sont plus vulnérables à l'auto-administration de cannabinoïdes. Une étude s'est intéressée aux différences sexuelles concernant les propriétés des neurones dopaminergiques dans cette lignée. Les résultats ont montré une différence sexuelle dans l'inhibition des neurones dopaminergiques par une stimulation de la tVTA et dans la réponse de ces neurones à l'activation des récepteurs CB1 (Melis et al., 2013). Les auteurs interprètent ces résultats par une diminution de la probabilité de libération du GABA par la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la VTA chez les femelles, conduisant à une sensibilité moindre aux effets aversifs de la drogue. Cependant, la diminution de l'influence de la tVTA sur les neurones dopaminergiques chez les femelles pourrait également augmenter les effets récompensants et motivationnels des cannabinoïdes. Une diminution de l'inhibition des neurones dopaminergiques par la tVTA a été observée par le même groupe chez des rats de la lignée "Sardinian alcohol preferring", qui présentent une préférence innée pour l'alcool (Melis et al., 2014), indiquant un rôle potentiel de la tVTA dans les conséquences comportementales de l'alcool. Ces expériences mettent en avant le rôle de la tVTA et de son contrôle inhibiteur des neurones dopaminergiques dans les différences inter-individuelles de sensibilité comportementale aux drogues. Dans une étude de Rottlant et al. (2010), les auteurs ont séparé des animaux en deux groupes en fonction de leur réponse locomotrice à l'amphétamine ; un groupe sensible aux effets locomoteurs de l'amphétamine (HR) et un groupe moins sensible à ces effets (LR). L'induction des protéines Fos a ensuite été comparée entre les deux groupes. L'induction des protéines Fos dans les neurones de la VTA était plus importante chez les rats LR, bien que cette différence reste faible. L'induction des protéines Fos par les psychostimulants dans la VTA n'étant que très rarement observée, il est probable que les noyaux Fos positifs comptés appartiennent à des neurones de la tVTA. Bien que des études complémentaires doivent être réalisées pour le prouver il semblerait que la tVTA soit également impliquée dans les différences inter-individuelles de sensibilité comportementale aux psychostimulants. D'autre part, il serait intéressant de comparer la force du contrôle inhibiteur exercé par la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la VTA en réponse aux drogues addictives entre des rats adultes et adolescents, ces derniers étant généralement plus sensibles au développement de comportements associés à la récompense.

La tVTA a été récemment impliquée dans les mécanismes d'extinction de la recherche de cocaïne ("drug seeking") (Huff and LaLumiere, 2015). Après un protocole d'auto-administration de cocaïne, les rats ont été entraînés à une extinction (un arrêt de la libération de drogue suite à l'activation du levier actif). L'injection d'un potentialisateur des récepteurs AMPA dans la tVTA, avant et après l'entraînement pendant les 5 premiers jours,

semble faciliter l'apprentissage de l'extinction. D'autre part, l'inactivation de la tVTA avant la survenue d'un stimulus indiquant le rétablissement de la disponibilité de la cocaïne augmente le nombre de demandes (pression sur le levier). Ces résultats indiquent que la tVTA est potentiellement impliquée dans l'apprentissage de l'extinction du comportement de recherche de cocaïne chez le rat, bien qu'ils puissent être biaisés par l'augmentation d'activité locomotrice provoquée par l'inactivation de la tVTA.

La tVTA semble jouer un rôle dans la composante aversive de la cocaïne (Jhou et al., 2013). Les neurones de la Lhb exprimant c-Fos en réponse à la cocaïne projettent de façon préférentielle aux neurones de la tVTA et activent ces derniers. Le test de "runway" est un test dans lequel un rat reçoit une injection de cocaïne lorsqu'il parcourt une piste en ligne droite jusqu'à une boîte à l'extrémité de la piste. Progressivement, la cocaïne est responsable d'une prolongation de la latence pour atteindre la boîte, ainsi que d'une alternance entre les comportements d'approche et d'évitement (le rat fait demi-tour). L'ablation ou l'inhibition optogénétique de la tVTA, durant la période pendant laquelle la cocaïne est responsable d'un comportement d'évitement (15-25 min post-injection), supprime l'augmentation de la latence provoqué par la cocaïne. Ces résultats indiquent que la tVTA est impliquée dans les comportements d'évitement induits par la cocaïne. D'autre part, la cocaïne est responsable d'une potentialisation synaptique dépendante de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA sur les neurones de la Lhb projetant à la tVTA. Cette potentialisation conduit à une diminution de la conductance potassium et à une hyperexcitabilité de ces neurones. De manière intéressante, une diminution de la disponibilité synaptique de la sous-unité GluA1 dans la Lhb empêche le développement de phénotypes dépressifs induits par un sevrage à la cocaïne (Meye et al., 2015). L'hyperactivité des neurones de la Lhb par la cocaïne pourrait transmettre un signal s'opposant à la récompense aux systèmes dopaminergiques via la tVTA, contribuant aux effets négatifs de cette drogue.

La tVTA a été étudiée dans le circuit Lhb/tVTA/VTA dans le cadre du traitement de l'information relative à l'aversion (Jhou et al., 2009a; Hong et al., 2011). Récemment, des études ont montré son rôle dans la réponse nociceptive à la formaline, ainsi que dans la composante aversive de la cocaïne. L'injection de formaline dans la patte postérieure d'un rat induit des comportements nociceptifs sur une période pouvant être divisée en deux phases. La première phase est liée à la stimulation directe des nocicepteurs périphériques et la seconde phase est liée à des mécanismes inflammatoires et à une sensibilisation centrale. Seule la seconde phase peut être atténuée par les opiacés (Dubuisson and Dennis, 1977) ou d'autres analgésiques. L'injection d'endomorphine-1 dans la tVTA est responsable d'une réduction de 85% des scores nociceptifs observés pendant la seconde phase de réponse à la formaline. Cette réduction des scores nociceptifs est également observée en réponse à une inhibition de la tVTA par une injection locale de muscimol (Jhou et al., 2012).

B- Points de discussion générale

1- La tVTA entre récompense et aversion : implications potentielles dans l'addiction

La tVTA est bien placée d'un point de vue neuroanatomique et fonctionnel pour transmettre des informations entre des structures impliquées dans l'aversion et des structures impliquées dans la récompense, où l'activité des neurones dopaminergiques joue un rôle dans la valeur prédictive de l'information et dans l'apprentissage concernant la récompense et les punitions (Matsumoto and Hikosaka, 2009; Bromberg-Martin et al., 2010). L'activité d'une partie des neurones dopaminergiques du mésencéphale encode une erreur de prédiction. Cette erreur de prédiction peut être définie comme une différence entre la prédiction de la valeur d'une récompense (probabilité x magnitude) et la magnitude de la récompense reçue. Globalement, si la récompense obtenue est plus grande que la récompense attendue, l'activité des neurones dopaminergiques augmente, l'erreur de prédiction est positive. Dans le cas contraire, c'est à dire si la récompense obtenue est inférieure à la récompense attendue, l'activité des neurones dopaminergiques diminue, il s'agit d'une erreur de prédiction négative (Schultz, 2002; Montague et al., 2004). De cette manière, l'activité des neurones dopaminergiques participe au renforcement positif en augmentant la probabilité de survenue future des comportements conduisant à une récompense meilleure que celle qui était attendue (Fields et al., 2007), et au renforcement négatif en diminuant la probabilité de survenue future des comportements conduisant à une récompense inférieure à celle qui était attendue ou à une punition (comportements d'évitement) (Matsumoto and Hikosaka, 2009; Bromberg-Martin et al., 2010). Ces mécanismes d'apprentissage ont été associés aux conséquences des variations des taux de dopamine dans le complexe striatal sur la plasticité à long terme au niveau des synapses cortico-striatales (Reynolds et al., 2001; Bromberg-Martin et al., 2010). L'excitation et l'inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale sont toutes deux informatives et peuvent résulter respectivement d'une inhibition ou d'une excitation de la tVTA. La tVTA constitue un relais dans la transmission de signaux d'erreur de prédiction négative de la LHb vers les neurones dopaminergiques du mésencéphale et semble contribuer à la fois à l'erreur de prédiction négative et à l'erreur de prédiction positive chez le rat (Jhou et al., 2009a) et chez le singe (Hong et al., 2011). La tVTA appartient au circuit LHb/tVTA/VTA mais récemment, un circuit plus détaillé prenant en compte le GPi a été proposé. En effet, le GPi est une afférence majeure de la LHb (Parent et al., 2001). De plus, une partie des neurones localisés en bordure du GPi projette à la LHb et encode une erreur de prédiction négative de la même manière que les neurones de la LHb. Une partie de ces neurones discrimine la signification récompensante ou non récompensante d'un stimulus visuel avant ceux de la LHb et pourrait jouer un rôle crucial dans la transmission de l'erreur de prédiction aux neurones de la LHb, formant ainsi un circuit GPi/LHb/tVTA/VTA (Barrot et al., 2012). Des vérifications de la validité de ce circuit chez le rongeur sont en cours au laboratoire. Les données publiées par Hong et al. chez le

singe (Hong et al., 2011) indiquent que l'encodage de l'erreur de prédiction négative par la tVTA peut se faire indépendamment de la LHb. En effet, suite à un stimulus prédictif d'une absence de récompense, l'excitation de la moitié des neurones de la tVTA enregistrés a lieu avant celle des neurones de la LHb, suggérant que la tVTA reçoit des informations associées à l'erreur de prédiction d'une autre structure qui reste à être identifiée (Hong et al., 2011; Barrot et al., 2012).

La tVTA pourrait être une structure clé dans la balance entre la transmission des signaux associés à la récompense et la transmission des signaux associés à l'aversion, ainsi que dans leurs conséquences comportementales via son contrôle inhibiteur des neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Ce double rôle de la tVTA dans la récompense et l'aversion pourrait avoir des conséquences dans l'aspect addictif des drogues.

Les drogues addictives possèdent la propriété d'agir sur le système mésolimbique dont l'origine est constituée par les neurones dopaminergiques de la VTA (Kalivas et al., 2006) notamment impliqués dans la signalisation de la récompense (Bromberg-Martin et al., 2010; Lammel et al., 2012) en assignant une valeur motivationnelle à des stimuli externes ou internes. Les drogues addictives piratent ce système, conduisant chez les animaux à des comportements d'auto-administration ou de préférence de place conditionnée. Les animaux s'auto-administrent de l'endomorphine-1 directement dans la tVTA (Jhou et al., 2012) et l'injection d'endomorphine-1 dans cette structure entraîne de la préférence de place conditionnée. Ces résultats comportementaux sont probablement liés à l'action inhibitrice de cet opioïde endogène sur les neurones de la tVTA, conduisant à une désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA (Jalabert et al., 2011; Matsui and Williams, 2011) et à une augmentation de la libération de dopamine dans le striatum. Les autres drogues agissant par désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA via leur inhibition de la tVTA comme les cannabinoïdes pourraient avoir des effets comportementaux comparables. Une étude a d'ailleurs mis en évidence un lien entre le comportement d'auto-administration de cannabinoïdes et la sensibilité des neurones de la tVTA à ces composés (Melis et al., 2013). D'autre part, il a été montré que chez des rats appartenant à une lignée possédant une préférence innée pour l'alcool, l'inhibition exercée par les neurones de la tVTA sur la VTA est plus faible que chez des rats contrôles.

Les drogues addictives ont une composante récompensante via leur action sur la dopamine (Ikemoto, 2007), mais également une composante aversive liée aux "processus opposants" agissant contre les effets récompensants de ces drogues et impliqués dans les mécanismes de tolérance et d'addiction (Koob and Le Moal, 2008). Dans le cadre du circuit LHb/tVTA/VTA, il semble que l'inhibition exercée par la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la VTA soit impliquée dans les comportements d'évitement provoqués par la composante aversive de la cocaïne (Jhou et al., 2013) ainsi que dans les comportements de type dépressif provoqués par un sevrage à la cocaïne (Meyer et al., 2015). Ces données posent la question d'un rôle de la tVTA dans les processus opposants.

L'addiction aux drogues peut être définie comme une maladie caractérisée par une recherche et une prise de drogue compulsive malgré les conséquences négatives (DSM-

5). En inhibant les neurones de la tVTA, les drogues addictives agissant par désinhibition des neurones dopaminergiques comme les opioïdes, les cannabinoïdes, l'alcool, les benzodiazépines, pourraient avoir un double effet : une diminution de la transmission de l'information relative à leur composante aversive vers le système mésolimbique, et une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques et de la libération de dopamine dans les structures effectrices, impliquées dans l'addiction et dans le risque de rechute (Marinelli et al., 2003).

2- Influence potentielle du contrôle simultané de la VTA et de la SNc par la tVTA sur les comportements associés à la récompense

La tVTA inhibe de manière tonique les neurones dopaminergiques de la VTA et de la SNc et cette inhibition peut augmenter ou diminuer de manière phasique en réponse à des stimuli aversifs ou récompensants, ou à des indices les prédisant (Jhou et al., 2009a; Hong et al., 2011). Ces modifications de l'activité des neurones de la tVTA peut influencer des fonctions dépendantes des neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Les neurones de la VTA et leurs projections sur le cortex et le NAc forment le système mésocorticolimbique, connu comme étant impliqué dans les effet renforçants des stimuli récompensants naturels et artificiels, et appelé dans certains cas "circuit de la récompense". La tVTA influence la réponse aux drogues en contrôlant ce système. Les neurones de la SNc et leurs projections sur le striatum dorsal forment le système nigrostrié, connu comme étant impliqué dans la motricité, l'apprentissage moteur et l'apprentissage associé à la récompense. Nous avons montré que la tVTA influençait les performances motrices et l'apprentissage moteur via ses projections sur ce système (Bourdy et al., 2014).

Les systèmes mésolimbique et nigrostrié possèdent des fonctions qui leurs sont propres mais présentent également de nombreuses caractéristiques communes (Wise, 2009). Au début du développement du cerveau, les neurones dopaminergiques de la VTA et ceux de la SNc projettent aux mêmes structures cérébrales, puis certaines projections sont éliminées progressivement pour aboutir à des efférences propres à chaque structure. Ces deux structures ont donc une origine commune. D'autre part, il n'existe pas de limite anatomique claire entre les neurones appartenant à ces deux structures et entre leurs champs de projection. Les systèmes mésolimbique et nigrostrié sont proches d'un point de vue anatomique, mais également d'un point de vue fonctionnel. Par exemple, les neurones de la VTA et de la SNc projettent sur le complexe striatal où ils influencent l'activité des neurones GABAergiques, et encodent de la même manière une erreur de prédiction de la récompense (Wise, 2009; Bromberg-Martin et al., 2010). D'autre part, la VTA et la SNc supportent le comportement d'auto-stimulation intracrânienne (Reynolds et al., 2001; Everitt and Robbins, 2005), indiquant une fonction proche de ces deux structures dans les comportements associés à la récompense.

Une différence majeure entre ces deux systèmes, dans les comportements associés à la récompense, semble être un rôle du système mésolimbique dans la motivation et les comportements dirigés vers un but et un rôle du système nigrostrié dans les comportements automatisés. Certains groupes s'intéressant à l'addiction aux drogues pensent que cette pathologie est le résultat d'une transition allant de la prise de drogue initiale volontaire (pour ses effets renforçants et récompensants) vers une perte de contrôle sur ces comportements de manière à ce que la prise de drogue devienne habituelle et compulsive. Selon leur hypothèse, le passage entre les deux états est sous-tendu par un engagement progressif des régions dorsales du striatum aux dépens des régions ventrales (Everitt and Robbins, 2005). Chez le singe (Haber et al., 2000) et chez le rat (Ikemoto, 2007), le tiers ventral du complexe striatal régule l'innervation dopaminergique du tiers dorsal du complexe striatal par des connexions "spirallées" avec les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ainsi, la coquille du NAc projette aux neurones de la VTA qui innervent la coquille, mais également le coeur du NAc. Les neurones du coeur du NAc innervent les neurones dopaminergiques projetant au coeur du NAc, mais également des régions du striatum dorso-médian, et ainsi de suite jusqu'aux régions les plus latérales du striatum dorsal où les taux de dopamine augmentent lorsque la recherche de drogue devient automatique et où l'injection d'antagoniste des récepteurs dopaminergiques supprime ces comportements (Everitt et al., 2008). Dans l'étude de Lalumière et al. (2015), l'augmentation du comportement d'extinction de la recherche de cocaïne par les rats ayant subi une activation de la tVTA pourrait être liée à un rôle de cette structure dans la modulation de l'activité de la voie nigrostriée, alors responsable d'une persistance exagérée du comportement d'autoadministration automatisé, et ce malgré l'absence de cocaïne.

En inhibant à la fois les neurones de la VTA et ceux de la SNc, la tVTA pourrait influencer les comportements motivés via ses projections aux neurones de la VTA et la mise en place de comportements automatisés via ses projections aux neurones de la SNc.

3- Bénéfices et coût de lésions ou d'inhibitions de la tVTA

Concernant la coordination motrice, des lésions bilatérales de la tVTA sont responsables d'un gain de fonction. A partir de la première exposition des animaux lésés au test du rotarod, paramétré pour tourner à faible vitesse, on observe une diminution du nombre de chutes en comparaison avec les animaux contrôles. Cette augmentation des performances de coordination motrice chez les animaux lésés se maintient à des vitesses plus élevées, qu'il s'agisse de protocoles utilisant des vitesses fixes ou une accélération progressive. En plus de cette amélioration des performances, les rats ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA présentent une amélioration de l'apprentissage des compétences motrices nécessaires à la réussite du test, comme on peut le constater dans un protocole dans lequel les rats sont testés sur quatre jours consécutifs (Bourdy et al., 2014). Il sera nécessaire de tester ces animaux dans des tests moteurs plus fins dans le but d'identifier quels sont les fonctions motrices améliorées et les limites de ces améliorations.

D'autre part, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la LHb par le muscimol est capable d'améliorer certains comportements de type dépressif dans un modèle animal de dépression résistante aux traitements (Winter et al., 2011), des résultats également observés chez l'homme dans un protocole de stimulation profonde de la LHb (Sartorius et al., 2010). La LHb est une afférence majeure de la tVTA et les résultats observés sont probablement dus aux conséquences de l'inactivation de la LHb sur l'activité des neurones de la tVTA qui constituent un relais entre la LHb et la VTA, impliquée dans la dépression (Tye et al., 2013). Cependant des recherches sont nécessaires pour déterminer si des résultats comparables sont observés en réponse à une inactivation de la tVTA.

Un gain dans une fonction donnée a souvent un coût dans une(d') autre(s) fonction(s) et l'amélioration des performances motrices observée chez les animaux ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA n'échappe pas à cette règle. En effet, la tVTA peut avoir une influence bidirectionnelle sur les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Son excitation ou son inhibition par les structures afférentes peuvent conduire à la transmission d'informations possédant des significations opposées aux systèmes dopaminergiques comme on peut le voir dans le cas de l'erreur de prédiction associée à la récompense (Jhou et al., 2009a; Hong et al., 2011). Une lésion de la tVTA peut supprimer l'inhibition exercée par cette structure sur les systèmes dopaminergiques, conduisant aux conséquences comportementales d'une hyperdopaminergie. Des lésions de la tVTA semblent optimiser le fonctionnement des ganglions de la base mais les animaux perdent leur capacités concernant l'inhibition comportementale. En effet, des lésions de la tVTA sont responsables d'une augmentation du nombre d'entrées des animaux dans un labyrinthe en croix surélevé et d'une diminution du comportement de "freezing" en réponse à une odeur de prédateur. Les animaux passent même d'un comportement défensif passif à un comportement défensif actif, en enfouissant la source de l'odeur de prédateur (Jhou et al., 2009a). L'inhibition comportementale est une fonction nécessaire d'un point de vue adaptatif qui contribue à la survie de l'animal et la perte de cette fonction pourrait être responsable de prises de risques excessives pouvant conduire à la mort de l'animal dans un environnement naturel. De plus, une lésion ou une inhibition de la tVTA pourrait supprimer la transmission de l'information relative à l'erreur de prédiction négative de la tVTA vers les systèmes dopaminergiques, conduisant à des comportements inadaptés dus à une atteinte de leur flexibilité adaptative. En effet, les animaux perdraient leur capacité d'apprendre à ne pas reproduire les actions les conduisant à des situations dangereuses.

C- Perspectives

Malgré l'avancée importante des connaissances concernant la tVTA ces dernières années, de nombreuses questions subsistent. Les perspectives proposées dans cette partie s'inscrivent dans le cadre des recherches réalisées au cours de ma thèse.

Jusqu'à aujourd'hui, l'induction des protéines Fos dans la tVTA en réponse à différents stimuli a été le moyen le plus fiable d'identifier les contours de cette structure. Progressivement, d'autres marqueurs ont été identifiés comme les récepteurs des opioïdes de type mu, la GAD et la somatostatine. Les neurones de la tVTA peuvent également être repérés par leur réponse excitatrice à une stimulation de la LHb, ou par un marquage en réponse à des injections de traceurs antérograde ou rétrograde dans la LHb ou la VTA, respectivement. Il est nécessaire de comparer la répartition des marqueurs connus et d'identifier d'autres marqueurs plus spécifiques de la tVTA dans le but d'éviter les confusions sur les limites neuroanatomiques de cette région. Dans ce contexte, des études de comparaison de la répartition stéréologique des différents marqueurs connus de la tVTA sont actuellement en cours au laboratoire. La tVTA a été étudiée principalement dans le cadre de sa participation au circuit LHb/tVTA/VTA. Cependant, bien que la LHb semble être l'afférence principale de la tVTA, cette dernière reçoit des afférences de nombreuses autres structures cérébrales comme les SC, la substance grise périaqueducale, le cortex, l'hypothalamus... Il est nécessaire de poursuivre la caractérisation neuroanatomique de la tVTA en étudiant son appartenance potentielle à d'autres circuits via des approches de traçage de voies en neuroanatomie et d'électrophysiologie *in vivo*. Les résultats obtenus fourniront de nouveaux indices des fonctions potentielles de cette structure. Il serait également intéressant d'étudier d'un point de vue électrophysiologique le contrôle inhibiteur exercé par la tVTA sur ses structures efférentes comme l'aire rétrobulbaire et le noyau du raphé, ainsi que la pharmacologie de ce contrôle.

C'est l'induction de FosB/ Δ FosB en réponse à des injections chroniques de cocaïne qui a initialement attiré l'attention sur la tVTA. Bien que d'autres drogues responsables d'une telle induction aient été identifiées, le rôle de l'expression des protéines de la famille Fos dans la tVTA n'est toujours pas connu. Il serait intéressant d'évaluer les conséquences d'une augmentation ou d'une diminution de l'expression de FosB/ Δ FosB sur certaines réponses comportementales aux psychostimulants comme la sensibilisation comportementale, la préférence de place conditionnée ou le comportement d'auto-administration. La mise en évidence récente de la tVTA chez la souris pourrait faciliter ce type d'expérience bien que cela soit également possible chez le rat via l'utilisation d'AAVs (virus adéno associés) ou d'ARN interférents. Il serait également possible d'étudier les effets d'une sur-expression de FosB/ Δ FosB dans les neurones de la tVTA sur leur activité électrophysiologique, leur réponse à la stimulation des entrées glutamatergiques et leur morphologie. D'autre part, il peut exister un découplage entre l'activité électrophysiologique et l'induction des protéines Fos en réponse à une injection de psychostimulants. Il serait possible par une approche d'électrophysiologie *in vivo* d'enregistrer les neurones de la tVTA après une injection aiguë

de drogue et de comparer a posteriori l'expression des protéines Fos et la réponse électrophysiologique des neurones. Cependant, la réalisation de ces expériences nécessite d'utiliser un anesthésique qui n'influence pas l'expression des protéines Fos dans la tVTA. Une autre possibilité serait de réaliser ces expériences chez l'animal vigile immobilisé bien que cette approche risque de rendre difficile l'enregistrement unitaire des neurones. Parmi les stimuli responsables de l'induction des protéines Fos dans les neurones de la tVTA, de nombreux stimuli pharmacologiques ont été identifiés. Cependant, il existe beaucoup moins de données concernant les stimuli aversifs et stressants. Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire dans le but de tester un ensemble de stress et de stimuli sensoriels pour leur aptitude à provoquer l'expression des protéines Fos dans les neurones de la tVTA.

La tVTA joue un rôle crucial dans le mécanisme d'action des opioïdes par désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA (Johnson and North, 1992; Jalabert et al., 2011; Matsui and Williams, 2011). Ces composés inhibent l'activité des neurones de la tVTA (Lecca et al., 2011) et diminuent la durée de l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA observée en réponse à une stimulation de la tVTA (Lecca et al., 2012). De plus, l'inhibition exercée par la tVTA sur les neurones dopaminergiques est diminuée chez les femelles de la lignée "Lister Hooded", des animaux présentant une vulnérabilité accrue à l'auto-administration de cannabinoïdes (Fattore et al., 2007; Melis et al., 2013). Les rats appartenant à une lignée possédant une préférence innée pour l'alcool ("Sardinian alcohol-preferring") présentent une diminution de la probabilité de libération de GABA par les neurones de la tVTA (Melis et al., 2014) ainsi qu'une diminution de l'inhibition des neurones de la VTA provoquée par une stimulation de la tVTA. La tVTA semble également impliquée dans l'apprentissage de l'extinction du comportement de recherche de cocaïne chez le rat. Ces données récentes concernant le rôle de la tVTA dans le comportement d'auto-administration pourraient être complétées en étudiant les effets de manipulations (inhibition ou stimulation) de la tVTA sur l'auto-administration d'autres drogues que la cocaïne ou l'existence éventuelle d'un comportement d'auto-administration de drogues agissant par désinhibition dans la tVTA, comme cela a été étudié précédemment avec l'endomorphine-1 (Jhou et al., 2012). Les conséquences de lésions ou d'inactivations de la tVTA pourraient également être évaluées sur des comportements associés aux drogues, n'ayant pas été encore testés, comme l'activité locomotrice et la sensibilisation comportementale. Des études préliminaires ont été réalisées au sein du laboratoire et nous ont apporté des résultats prometteurs concernant les conséquences de lésions bilatérales de la tVTA sur l'augmentation de l'activité locomotrice induite par la cocaïne. D'autre part, il serait intéressant d'évaluer d'un point de vue électrophysiologique le rôle de la tVTA dans le mode d'action de drogues agissant par désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA et n'ayant pas encore été testées comme les benzodiazépines et l'alcool. Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle les drogues désinhibent le système mésolimbique via leur action inhibitrice sur la tVTA, il serait important de mesurer par microdialyse les effets de lésions ou d'inactivations de la tVTA sur la libération de dopamine provoquée par les drogues dans le NAc.

Concernant le rôle de la tVTA dans les performances motrices et l'apprentissage moteur, il est important dans un premier temps de vérifier notre hypothèse selon laquelle l'amélioration des performances motrices et de l'apprentissage moteur observée chez les animaux ayant subi des lésions bilatérales de la tVTA est due à une augmentation de la libération transitoire de dopamine dans le striatum dorsal. Pour cela, il serait possible de mesurer les fluctuations de libération de dopamine dans le striatum dorsal par la technique d'ampérométrie, qui présente une résolution temporelle plus élevée que la technique de microdialyse. Dans le but d'étudier l'influence de la tVTA sur les systèmes mésolimbique et nigrostrié d'un point de vue physiologique, il serait intéressant d'évaluer par une approche d'électrophysiologie *in vivo*, de pharmacologie *in vivo* ou d'optogénétique les conséquences de stimulations ou d'inhibitions de la tVTA sur l'activité des neurones GABAergiques du NAc et du striatum dorsal et de mesurer les variations des taux de dopamine dans ces deux structures. D'un point de vue comportemental, nous pourrions évaluer les conséquences de lésions ou d'inactivations de la tVTA sur la motricité dans d'autres tests moteurs comme par exemple le test du cylindre ou des tests de préhension dans le but de déterminer les limites des améliorations observées précédemment dans le test du rotarod.

Bibliographie

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375.
- Amat J, Sparks PD, Matus-Amat P, Griggs J, Watkins LR, Maier SF (2001) The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. *Brain Res* 917:118–126.
- Andres KH, von Düring M, Veh RW (1999) Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J Comp Neurol* 407:130–150.
- Ang E, Chen J, Zagouras P, Magna H, Holland J, Schaeffer E, Nestler EJ (2001) Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J Neurochem* 79:221–224.
- Atkins JB, Chlan-Fourney J, Nye HE, Hiroi N, Carlezon WA, Nestler EJ (1999) Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs. *Synapse* 33:118–128.
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2011) The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol* 519:1143–1164.
- Bals-Kubik R, Ableitner A, Herz A, Shippenberg TS (1993) Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264:489–495.
- Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Zhou TC (2012) Braking Dopamine Systems: A New GABA Master Structure for Mesolimbic and Nigrostriatal Functions. *J Neurosci* 32:14094–14101.
- Beckstead RM, Cruz CJ (1986) Striatal axons to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra come mainly from separate cell populations in cat. *Neuroscience* 19:147–158.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol* 68:767–777.
- Berton O, Covington HE, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ (2007) Induction of Δ FosB in the Periaqueductal Gray by Stress Promotes Active Coping Responses. *Neuron* 55:289–300.
- Bezard E, Przedborski S (2011) A tale on animal models of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 26:993–1002.
- Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7:179–191.

- Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202.
- Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IYC, McNaught KSP, Brownell A-L, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim K-S, Isacson O (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2344–2349.
- Blandini F, Armentero M-T (2012) Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J* 279:1156–1166.
- Bolam JP, Wainer BH, Smith AD (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12:711–718.
- Bontempi B, Sharp FR (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci* 17:8596–8612.
- Bourdy R, Barrot M (2012) A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci* 35:681–690.
- Bourdy R, Sánchez-Catalán M-J, Kaufling J, Balcita-Pedico JJ, Freund-Mercier M-J, Veinante P, Sesack SR, Georges F, Barrot M (2014) Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 39:2788–2798.
- Bozarth MA, Wise RA (1981) Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci* 28:551–555.
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW (2010) Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168:463–476.
- Bromberg-Martin ES, Hikosaka O (2011) Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci* 14:1209–1216.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68:815–834.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* 25:3009–3019.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:237–260.

- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17:4933–4941.
- Chen J, Zhang Y, Kelz MB, Steffen C, Ang ES, Zeng L, Nestler EJ (2000) Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB. *J Neurosci* 20:8965–8971.
- Chesselet M-F (2008) In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol* 209:22–27.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 5:905–915.
- Cohen SR, Melzack R (1993) The habenula and pain: repeated electrical stimulation produces prolonged analgesia but lesions have no effect on formalin pain or morphine analgesia. *Behav Brain Res* 54:171–178.
- Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW (2003) Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci* 23:2488–2493.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Béroud A (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci* 26:1011–1025.
- Conversi D, Bonito-Oliva A, Orsini C, Colelli V, Cabib S (2008) DeltaFosB accumulation in ventro-medial caudate underlies the induction but not the expression of behavioral sensitization by both repeated amphetamine and stress. *Eur J Neurosci* 27:191–201.
- Cornish JL, Hunt GE, Robins L, Mcgregor IS (2012) Regional c-Fos and FosB/ Δ FosB expression associated with chronic methamphetamine self-administration and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience* 206:100–114.
- Da Cunha C, Wietzikoski EC, Ferro MM, Martinez GR, Vital MABF, Hipólido D, Tufik S, Canteras NS (2008) Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav Brain Res* 189:364–372.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–399.
- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y, Li Y (2006) Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15254–15259.
- David V, Durkin TP, Cazala P (1997) Self-administration of the GABAA antagonist bicuculline into the ventral tegmental area in mice: dependence on D2 dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 130:85–90.

- De Olmos S, Bender C, de Olmos JS, Lorenzo A (2009) Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine. *Neuroscience* 164:1347–1359.
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A (2012) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 45:939–953.
- Devine DP, Wise RA (1994) Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14:1978–1984.
- Di Chiara G, Imperato A (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274–5278.
- Di Chiara G, Imperato A (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244:1067–1080.
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245–256.
- Donahue RJ, Muschamp JW, Russo SJ, Nestler EJ, Carlezon WA (2014) Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice. *Biol Psychiatry* 76:550–558.
- Donoghue JP, Herkenham M (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365:397–403.
- Dubuisson D, Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161–174.
- Durieux PF, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A (2012) Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J* 31:640–653.
- Engeln M, Bastide MF, Toulmé E, Dehay B, Bourdenx M, Doudnikoff E, Li Q, Gross CE, Boué-Grabot E, Pisani A, Bezard E, Fernagut P-O (2014) Selective Inactivation of Striatal FosB/ Δ FosB-Expressing Neurons Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia. *Biol Psychiatry* doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.007.
- Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2008) Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* 363:3125–3135.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489.

- Fattore L, Spano MS, Altea S, Angius F, Fadda P, Fratta W (2007) Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *Br J Pharmacol* 152:795–804.
- Ferreira JGP, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008) Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153:196–213.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007) Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 30:289–316.
- Gambhir H, Mathur R, Behari M (2011) Progressive impairment in motor skill learning at 12 and 20 weeks post 6-OHDA- SNc lesion in rats. *Parkinsonism Relat Disord* 17:476–478.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS (2008) Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33:2688–2700.
- Geisler S, Trimble M (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr* 13:484–489.
- Gerfen CR (1985) The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 236:454–476.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Miller JJ (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8780–8784.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* 7:3915–3934.
- Gerfen CR, Young WS (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161–167.
- Gonçalves L, Segó C, Metzger M (2012) Differential Projections From the Lateral Habenula to the Rostromedial Tegmental Nucleus and Ventral Tegmental Area in the Rat. *J Comp Neurol* 1300:1278–1300.
- González-Hernández T, Rodríguez M (2000) Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421:107–135.
- Graybiel AM (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol* 15:638–644.

- Greenwood BN, Foley TE, Le T V, Strong P V, Loughridge AB, Day HEW, Fleshner M (2011) Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behav Brain Res* 217:354–362.
- Grenhoff J, Aston-Jones G, Swensson TH (1986) Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 128:351–358.
- Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R (1994) Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene* 9:2537–2547.
- Gysling K, Wang RY (1983) Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277:119–127.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369–2382.
- Hakan RL, Henriksen SJ (1989) Opiate influences on nucleus accumbens neuronal electrophysiology: dopamine and non-dopamine mechanisms. *J Neurosci* 9:3538–3546.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55:917–924.
- Hazzalin CA, Mahadevan LC (2005) Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. *PLoS Biol* 3:e393.
- Heinz S, Kuei YS (2015) *Handbook of basal ganglia structure and function*
- Herkenham M, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 187:19–47.
- Herkenham M, Pert CB (1981) Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291:415–418.
- Hiroi N, Graybiel AM (1996) Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol* 374:70–83.
- Hjelmstad GO, Xia Y, Margolis EB, Fields HL (2013) Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *J Neurosci* 33:6454–6459.
- Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH (2012) Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons: Electrophysiological Properties and Projections. *J Neurosci* 32:15076–15085.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31–108.
- Hong S, Jhou TC, Smith M, Saleem KS, Hikosaka O (2011) Negative Reward Signals from the Lateral Habenula to Dopamine Neurons Are Mediated by Rostromedial Tegmental Nucleus in Primates. *J Neurosci* 31:11457–11471.

- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764–5768.
- Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ (1994a) Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14:4318–4328.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994b) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235–1244.
- Huff ML, LaLumiere RT (2015) The rostromedial tegmental nucleus modulates behavioral inhibition following cocaine self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology* 40:861–873.
- Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavaré JM (2002) Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem J* 368:573–580.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598.
- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27–78.
- Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M, Georges F (2011) Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16446–16450.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease and movement disorders: moving forward. *Lancet Neurol* 7:9–11.
- Javoy F, Sotelo C, Herbert A, Agid Y (1976) Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 102:201–215.
- Jenck F, Gratton A, Wise RA (1986) Opposite effects of ventral tegmental and periaqueductal gray morphine injections on lateral hypothalamic stimulation-induced feeding. *Brain Res* 399:24–32.
- Jhou T (2005) Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J Comp Neurol* 493:111–114.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009a) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61:786–800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009b) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that

projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513:566–596.

Jhou TC, Good CH, Rowley CS, Xu S-P, Wang H, Burnham NW, Hoffman AF, Lupica CR, Ikemoto S (2013) Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J Neurosci* 33:7501–7512.

Jhou TC, Xu S-P, Lee MR, Gallen CL, Ikemoto S (2012) Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist Endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology* 224:303-312.

Ji H, Shepard PD (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27:6923–6930.

Jiang H, Jackson-Lewis V, Muthane U, Dollison A, Ferreira M, Espinosa A, Parsons B, Przedborski S (1993) Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res* 613:347–351.

Joel D, Weiner I (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* 96:451–474.

Johnson SW, North RA (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483–488.

Jonas P, Burnashev N (1995) Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15:987–990.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993) GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 57:1047–1060.

Kalivas PW, Duffy P (1988) Effects of daily cocaine and morphine treatment on somatodendritic and terminal field dopamine release. *J Neurochem* 50:1498–1504.

Kalivas PW, Peters J, Knackstedt L (2006) Animal Models and Brain Circuits in Drug Addiction. *Mol Interv* 6:339–344.

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski S a, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2010a) gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67:88–92.

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597–621.

Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier M-J, Barrot M (2010b) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161:1677–1691.

- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421–3438.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272–276.
- Kirik D, Georgievska B, Burger C, Winkler C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A (2002) Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4708–4713.
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51–72.
- Kita H, Chang HT, Kitai ST (1983) The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 215:245–257.
- Kita H, Kitai ST (1988) Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* 447:346–352.
- Kita H, Kitai ST (1994) The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res* 636:308–319.
- Kiyatkin EA, Rebec G V (2001) Impulse activity of ventral tegmental area neurons during heroin self-administration in rats. *Neuroscience* 102:565–580.
- Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171–191.
- Koob GF, Le Moal M (2008) Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* 363:3113–3123.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1993) Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol* 332:499–513.
- Kubota Y, Mikawa S, Kawaguchi Y (1993) Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport* 5:205–208.
- Kumar A, Choi K-H, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DEH, Truong H-T, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303–314.
- Kurumaji A, Umino A, Tanami M, Ito A, Asakawa M, Nishikawa T (2003) Distribution of anxiogenic-induced c-Fos in the forebrain regions of developing rats. *J Neural Transm* 110:1161–1168.
- Lam HA, Wu N, Cely I, Kelly RL, Hean S, Richter F, Magen I, Cepeda C, Ackerson LC, Walwyn W, Masliah E, Chesselet M-F, Levine MS, Maidment NT (2011) Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein. *J Neurosci Res* 89:1091–1102.

- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212–217.
- Lavezzi HN, Parsley KP, Zahm DS (2012) Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculopontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct Funct* 217:719–734.
- Lavezzi HN, Parsley KP, Zahm DS (2015) Modulation of locomotor activation by the rostromedial tegmental nucleus. *Neuropsychopharmacology* 40:676–687.
- Laviolette SR, Gallegos RA, Henriksen SJ, van der Kooy D (2004) Opiate state controls bidirectional reward signaling via GABAA receptors in the ventral tegmental area. *Nat Neurosci* 7:160–169.
- Laviolette SR, van der Kooy D (2004) GABAA receptors signal bidirectional reward transmission from the ventral tegmental area to the tegmental pedunculopontine nucleus as a function of opiate state. *Eur J Neurosci* 20:2179–2187.
- Le Merrer J, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89:1379–1412.
- Le W, Sayana P, Jankovic J (2014) Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics* 11:92–110.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL, Pistis M (2011) Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36:589–602.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M (2012) Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37:1164–1176.
- Lecourtier L, Deschaux O, Arnaud C, Chessel A, Kelly PH, Garcia R (2006) Habenula lesions alter synaptic plasticity within the fimbria-accumbens pathway in the rat. *Neuroscience* 141:1025–1032.
- Lecourtier L, Kelly PH (2005) Bilateral lesions of the habenula induce attentional disturbances in rats. *Neuropsychopharmacology* 30:484–496.
- Lecourtier L, Neijt HC, Kelly PH (2004) Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* 19:2551–2560.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19186–19191.
- Lindgren HS, Lelos MJ, Dunnett SB (2012) Do α -synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model? *Exp Neurol* 237:36–42.

- Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306:19–30.
- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR (1994) Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8537–8541.
- Loopuijt LD, van der Kooy D (1985) Organization of the striatum: collateralization of its efferent axons. *Brain Res* 348:86–99.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau J-L, Ulery PG, Freund-Mercier M-J, Lasbennes F (2006) The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem* 98:1423–1431.
- Margolis EB, Hjelmstad GO, Fujita W, Fields HL (2014) Direct Bidirectional μ -Opioid Control of Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 34:14707–14716.
- Marinelli M, Cooper DC, Baker LK, White FJ (2003) Impulse activity of midbrain dopamine neurons modulates drug-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 168:84–98.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29:444–453.
- Matsui A, Jarvie BC, Robinson BG, Hentges ST, Williams JT (2014) Separate GABA Afferents to Dopamine Neurons Mediate Acute Action of Opioids, Development of Tolerance, and Expression of Withdrawal. *Neuron* 82: 1346–56.
- Matsui A, Williams JT (2011) Opioid-Sensitive GABA Inputs from Rostromedial Tegmental Nucleus Synapse onto Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 31:17729–17735.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111–1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12:77–84.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2011) Electrical Stimulation of the Primate Lateral Habenula Suppresses Saccadic Eye Movement through a Learning Mechanism. *PLoS One* 6:e26701.
- Matthews RT, German DC (1984) Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience* 11:617–625.
- Maze I, Covington HE, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 327:213–216.

- McClung CA, Utery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 132:146–154.
- McCutcheon JE, Cone JJ, Sinon CG, Fortin SM, Kantak PA, Witten IB, Deisseroth K, Stuber GD, Roitman MF (2014) Optical suppression of drug-evoked phasic dopamine release. *Front Neural Circuits* 8:114.
- McGahan L, Hakim AM, Nakabeppu Y, Robertson GS (1998) Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Brain Res Mol Brain Res* 56:146–161.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503–537.
- McGinty VB, Hayden BY, Heilbronner SR, Dumont EC, Graves SM, Mirrione MM, du Hoffman J, Sartor GC, España RA, Millan EZ, Difeliceantonio AG, Marchant NJ, Napier TC, Root DH, Borgland SL, Treadway MT, Floresco SB, McGinty JF, Haber S (2011) Emerging, reemerging, and forgotten brain areas of the reward circuit: Notes from the 2010 Motivational and Neural Networks conference. *Behav Brain Res* 225:357–348.
- Melis M, De Felice M, Lecca S, Fattore L, Pistis M (2013) Sex-specific tonic 2-arachidonoylglycerol signaling at inhibitory inputs onto dopamine neurons of Lister Hooded rats. *Front Integr Neurosci* 7:93.
- Melis M, Sagheddu C, De Felice M, Casti A, Madeddu C, Spiga S, Muntoni AL, Mackie K, Marsicano G, Colombo G, Castelli MP, Pistis M (2014) Enhanced endocannabinoid-mediated modulation of rostromedial tegmental nucleus drive onto dopamine neurons in Sardinian alcohol-preferring rats. *J Neurosci* 34:12716–12724.
- Meye FJ, Valentinova K, Lecca S, Marion-Poll L, Maroteaux MJ, Musardo S, Moutkine I, Gardoni F, Huganir RL, Georges F, Mameli M (2015) Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula. *Nat Neurosci* 18:376–378.
- Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer* 41:2449–2461.
- Mogenson GJ, Wu M, Manchanda SK (1979) Locomotor activity initiated by microinfusions of picrotoxin into the ventral tegmental area. *Brain Res* 161:311–319.
- Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431:760–767.
- Monville C, Torres EM, Dunnett SB (2006) Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods* 158:219–223.
- Morales M, Root DH (2014) Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience* 282C:60–68.

- Morgan JI, Curran T (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci* 18:66–67.
- Mucha RF, Iversen SD (1986) Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat. *Brain Res* 397:214–224.
- Murphy CA, DiCamillo AM, Haun F, Murray M (1996) Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. *Behav Brain Res* 81:43–52.
- Nakabeppu Y, Nathans D (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64:751–759.
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437:45–55.
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1988) An N-methyl-D-aspartate receptor mediated excitatory postsynaptic potential evoked in subthalamic neurons in an in vitro slice preparation of the rat. *Neurosci Lett* 95:130–136.
- Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:24–32.
- Nestler EJ (2008) Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3245–3255.
- Nestler EJ (2012) Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 10:136–143.
- Norrholm SD, Bibb JA, Nestler EJ, Ouimet CC, Taylor JR, Greengard P (2003) Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience* 116:19–22.
- Oertel WH, Mugnaini E (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* 47:233–238.
- Ogura T, Ogata M, Akita H, Jitsuki S, Akiba L, Noda K, Hoka S, Saji M (2005) Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 51:299–308.
- Olausson P, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, Nestler EJ, Taylor JR (2006) DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *J Neurosci* 26:9196–9204.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419–427.
- Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87–95.

- Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009) Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 30:1239–1250.
- Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF (2006) Invasion is a genetic program regulated by transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16:65–70.
- Pang Y, Kiba H, Jayaraman A (1993) Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 20:162–170.
- Parent M, Lévesque M, Parent A (2001) Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol* 439:162–175.
- Pasik P, Pasik T, Holstein GR, Hámori J (1988) GABAergic elements in the neuronal circuits of the monkey neostriatum: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 270:157–170.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Fourth Edition.
- Pérez-Otaño I, Mandelzys A, Morgan JI (1998) MPTP-Parkinsonism is accompanied by persistent expression of a delta-FosB-like protein in dopaminergic pathways. *Brain Res Mol Brain Res* 53:41–52.
- Perrotti LI, Bolaños CA, Choi K-H, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M (2005) DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817–2824.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004) Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24:10594–10602.
- Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, Sim-Selley L, Bachtell RK, Self DW, Nestler EJ (2008) Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* 62:358–369.
- Phillips AG, LePiane FG (1980) Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* 12:965–968.
- Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275:83–86.
- Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005) Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:395–402.
- Pitchers KK, Frohmader KS, Vialou V, Mouzon E, Nestler EJ, Lehman MN, Coolen LM (2010) Δ FosB in the nucleus accumbens is critical for reinforcing effects of sexual reward. *Genes Brain Behav* 9:831–840.

- Poller WC, Madai VI, Bernard R, Laube G, Veh RW (2013) A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res* 1507:45–60.
- Renthal W, Carle TL, Maze I, Covington HE, Truong H-T, Alibhai I, Kumar A, Montgomery RL, Olson EN, Nestler EJ (2008) Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci* 28:7344–7349.
- Reynolds JN, Hyland BI, Wickens JR (2001) A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* 413:67–70.
- Reynolds JNJ, Wickens JR (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Netw* 15:507–521.
- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E (1979) The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 187:261–283.
- Robledo P, Féger J (1990) Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res* 518:47–54.
- Rotllant D, Márquez C, Nadal R, Armario a (2010) The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience* 168:691–705.
- Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 33:267–276.
- Ryseck RP, Bravo R (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6:533–542.
- Saint Marie RL, Neary AC, Shoemaker JM, Swerdlow NR (2006) The effects of apomorphine and D-amphetamine on striatal c-Fos expression in Sprague-Dawley and Long Evans rats and their F1 progeny. *Brain Res* 1119:203–214.
- Sanchez-Catalan M-J, Kaufling J, Georges F, Veinante P, Barrot M (2014) The Antero-Posterior Heterogeneity of the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience* 282:198–216.
- Sartorius A, Kiening KL, Kirsch P, von Gall CC, Haberkorn U, Unterberg AW, Henn FA, Meyer-Lindenberg A (2010) Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol Psychiatry* 67:e9–e11.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401–415.
- Scammell TE, Estabrooke I V., McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB (2000) Hypothalamic Arousal Regions Are Activated during Modafinil-Induced Wakefulness. *J Neurosci* 20:8620–8628.

- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36:241–263.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR (2003) Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci* 26:321–328.
- Sego C, Gonçalves L, Lima L, Furigo IC, Donato J, Metzger M (2013) The lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 522:1454–84.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1985) Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5:776–794.
- Self DW, Nestler EJ (1995) Molecular Mechanisms of Drug Reinforcement and Addiction. *Annu Rev Neurosci* 18:463–495.
- Sharp FR, Liu J, Nickolenko J, Bontempi B (1995) NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. *Behav Brain Res* 66:225–230.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571–582.
- Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, Takahashi R, Kitazawa S, Hattori N (2010) A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods* 189:180–185.
- Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11202–11207.
- Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47–64.
- Soderman AR, Unterwald EM (2008) Cocaine reward and hyperactivity in the rat: Sites of mu opioid receptor modulation. *Neuroscience* 154:1506–1516.
- Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2009) Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 29:1735–1742.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 55:1734–1740.
- Steidl S, Miller AD, Blaha CD, Yeomans JS (2011) M(5) muscarinic receptors mediate striatal dopamine activation by ventral tegmental morphine and pedunculopontine stimulation in mice. *Verdejo García A, ed. PLoS One* 6:e27538.

- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244–250.
- Sun W-L, Zhou L, Hazim R, Quinones-Jenab V, Jenab S (2008) Effects of dopamine and NMDA receptors on cocaine-induced Fos expression in the striatum of Fischer rats. *Brain Res* 1243:1–9.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321–353.
- Taylor TN, Greene JG, Miller GW (2010) Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 211:1–10.
- Teegarden SL, Bale TL (2007) Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biol Psychiatry* 61:1021–1029.
- Teegarden SL, Nestler EJ, Bale TL (2008) Delta FosB-mediated alterations in dopamine signaling are normalized by a palatable high-fat diet. *Biol Psychiatry* 64:941–950.
- Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai H-C, Finkelstein J, Kim S-Y, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493:537–541 A.
- Ulery PG, Rudenko G, Nestler EJ (2006) Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci* 26:5131–5142.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107–110.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485–493.
- Valjakka A, Vartiainen J, Tuomisto L, Tuomisto JT, Olkkonen H, Airaksinen MM (1998) The fasciculus retroflexus controls the integrity of REM sleep by supporting the generation of hippocampal theta rhythm and rapid eye movements in rats. *Brain Res Bull* 47:171–184.
- Van der Perren A, Toelen J, Casteels C, Macchi F, Van Rompuy A-S, Sarre S, Casadei N, Nuber S, Himmelreich U, Osorio Garcia MI, Michotte Y, D'Hooze R, Bormans G, Van Laere K, Gijssbers R, Van den Haute C, Debyser Z, Baekelandt V (2014) Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol Aging* 36:1543–1558.
- Vialou V et al. (2010) DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat Neurosci* 13:745–752.
- Wallace DL, Vialou V, Rios L, Carle-Florence TL, Chakravarty S, Kumar A, Graham DL, Green TA, Kirk A, Iniguez SD, Perrotti LI, Barrot M, DiLeone RJ, Nestler EJ, Bolanos-Guzman CA

(2008) The Influence of FosB in the Nucleus Accumbens on Natural Reward-Related Behavior. *J Neurosci* 28:10272–10277.

Wasserman DI, Wang HG, Rashid AJ, Josselyn SA, Yeomans JS (2013) Cholinergic control of morphine-induced locomotion in rostromedial tegmental nucleus versus ventral tegmental area sites. *Eur J Neurosci* 38:2774–2785.

Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thorén P, Nestler EJ, Brené S (2002) Delta FosB regulates wheel running. *J Neurosci* 22:8133–8138.

West AE, Griffith EC, Greenberg ME (2002) Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 3:921–931.

White FJ, Hu XT, Henry DJ (1993) Electrophysiological effects of cocaine in the rat nucleus accumbens: microiontophoretic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1075–1084.

White LA, Brinckerhoff CE (1995) Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2. *Matrix Biol* 14:715–725.

Wickens JR, Horvitz JC, Costa RM, Killcross S (2007) Dopaminergic mechanisms in actions and habits. *J Neurosci* 27:8181–8183.

Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81:299–343.

Winstanley CA, LaPlant Q, Theobald DEH, Green TA, Bachtell RK, Perrotti LI, DiLeone RJ, Russo SJ, Garth WJ, Self DW, Nestler EJ (2007) DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *J Neurosci* 27:10497–10507.

Winter C, Vollmayr B, Djodari-Irani A, Klein J, Sartorius A (2011) Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. *Behav Brain Res* 216:463–465.

Wise RA (1990) Opiate reward: sites and substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 13:129–133.

Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483–494.

Wise RA (2009) Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 32:517–524.

Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, Margolis EB, Fields HL, Hjelmstad GO (2011) Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 31:7811–7816.

Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y (2013) fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology* 38:895–906.

- Zahm DS, Becker ML, Freiman AJ, Strauch S, Degarmo B, Geisler S, Meredith GE, Marinelli M (2010) Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology* 35:445–463.
- Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002) Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22:7225–7233.
- Zetterström T, Herrera-Marschitz M, Ungerstedt U (1986) Simultaneous measurement of dopamine release and rotational behaviour in 6-hydroxydopamine denervated rats using intracerebral dialysis. *Brain Res* 376:1–7.
- Zhang D, Zhang H, Jin G-Z, Zhang K, Zhen X (2008) Single dose of morphine produced a prolonged effect on dopamine neuron activities. *Mol Pain* 4:57.
- Zhao-Shea R, Liu L, Soll LG, Improgo MR, Meyers EE, McIntosh JM, Grady SR, Marks MJ, Gardner PD, Tapper AR (2011) Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 36:1021–1032.