



HAL
open science

Rôle des stimuli sensoriels et de la palatabilité dans la prise orale de nicotine chez la souris

Salma Tannous

► **To cite this version:**

Salma Tannous. Rôle des stimuli sensoriels et de la palatabilité dans la prise orale de nicotine chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0398 . tel-03547906

HAL Id: tel-03547906

<https://theses.hal.science/tel-03547906>

Submitted on 29 Jan 2022

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par **Salma TANNOUS**

Née le 05 octobre 1992, à Beyrouth-Liban

**Rôle des *stimuli* sensoriels et de la palatabilité dans la prise
orale de nicotine chez la souris**

Sous la direction de : Dr. Stéphanie CAILLE-GARNIER

Soutenue publiquement le 19 décembre 2019

Devant le jury composé de :

Dr. FERREIRA, Guillaume
Dr. MOULY, Anne-Marie
Dr. SOLINAS, Marcello
Dr. BEYELER, Anna
Pr. NAASSILA, Mickaël

Université de Bordeaux
Université de Lyon
Université de Poitiers
Université de Bordeaux
Université de Picardie Jules Verne

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

Remerciements

A l'issue de ces trois ans, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes qui, par leur professionnalisme, leur générosité, et l'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche ont contribué à l'élaboration de ce projet.

Je remercie, avant tout, chacun des membres de Jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je voudrais spécialement remercier Stéphanie pour son encadrement de cette thèse et sa patience durant ces trois années.

Je tiens aussi à remercier Martine Cador et Catherine Le Moine pour leur présence et leur accueil au sein de l'Addicteam.

Je remercie Françoise pour son optimisme et son amour pour la vie.

Je remercie Didier Morin pour son écoute et son aide. Un tuteur pas comme les autres ...

Florence, Angélique, Virginie, Yoan et Fabien, N! J'adore toujours l'ambiance quand vous êtes présents, vos blagues et rigolades vont me manquer !

Je remercie Shauna, Etienne et Mathieu pour leur esprit jeune et leur amabilité

Je remercie de tout cœur Alain Marchand de m'avoir aidé en informatique et pour sa façon différente de voir les choses.

Juan !!!! Merci pour qui tu es ! Nous avons passé ces 3 ans comme frère et sœur venant de deux coins du monde différents ! Que notre amitié dure et se pérennise !

Sarah, Robin et Stevenson merci pour vos encouragements et bon courage pour vos thèses !

Maude, Edyta et Marine, merci pour votre gentillesse

Renan, merci pour être « cool » dans toutes les situations ! Ça m'a appris des choses pour la vie !

A mes amis franco-libanais et à notre désOrientation, merci pour votre présence à mes côtés et votre support!

A toutes les personnes qui ont contribué à ce travail d'une manière ou d'une autre; leurs connaissances et leurs idées, petites et grandes, leurs encouragements et leur présence, m'ont permis de regrouper mon énergie et ma force et de continuer ce chemin.

Samer, merci d'avoir marché ce chemin dur avec moi ; je suis sûre que ça nous a construit pour une vie meilleure...

Mes plus grands remerciements s'adressent finalement à ma famille qui a toujours été et qui restera mon plus grand support. Je suis très reconnaissante pour votre confiance en moi, vous rendez tout possible !

A ma famille, mon réservoir d'amour, de courage et de soutien

A Samer et à notre futur ensemble

A ma patrie, à mon cher Liban, qui m'a appris à me relever à chaque fois que je tombe

La complexité est le défi à notre connaissance et non pas la réponse à notre connaissance. Il nous faut des méthodes pour dépasser ce défi (Edgar Morin)

L'absence de preuves ne constitue pas une preuve d'absence (Carl Sagan)

Résumé

Les produits du tabac sont hautement addictifs et leur abus est un problème majeur de santé publique. Chez les humains, cette addiction met en jeu une expérience consommatoire orale avec des composantes sensorielles gustatives et olfactives. De nos jours, le rôle de ces composantes est amplifié avec l'utilisation accrue des produits du tabac non-brûlé, mais aussi les cigarettes électroniques, où la nicotine est associée à des additifs incluant saveurs et sucres. L'impact des additifs sur le comportement de consommation du tabac doit donc être évalué.

Dans ce travail de recherche, notre intérêt se porte sur la nicotine orale et l'interaction bidirectionnelle avec les saveurs associées. Nous questionnons notamment les propriétés de renforcement secondaire, les effets des arômes sur la palatabilité de la nicotine et son encodage affectif.

Dans un premier chapitre, nous avons investigué les propriétés irritantes de la nicotine dans un modèle d'auto-administration orale de nicotine diluée dans de la saccharine chez des souris génétiquement modifiées (knockout) pour le thermorécepteur TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1), impliqué dans l'échauffement lié au tabagisme et qui a la particularité d'être sensibilisé par la nicotine. Nous mettons en évidence que l'absence de ce récepteur promeut la consommation de nicotine par diminution de son aversion orale. Il n'a cependant pas un rôle spécifique dans les mécanismes de motivation et de rechute.

Il a été montré que les stimuli sensoriels non-pharmacologiques deviennent plus saillants quand ils sont associés à la nicotine. Ainsi, nous étudions dans un deuxième chapitre, le renforcement secondaire putatif des stimuli oraux par la nicotine. Nous mettons en évidence la nécessité d'association orale de la nicotine à des additifs masquant son goût amer, afin de permettre sa consommation volontaire et la modélisation des différents stades du processus addictif. Ce processus se montre sensible aux stimuli dans la consommation et la rechute, mais insensible aux challenges pharmacologiques malgré l'absorption de nicotine mesurée par la présence de cotinine plasmatique. Les solutions de nicotine à fortes concentrations révèlent des propriétés aversives et réduisent la consommation volontaire. Bien que nous ne montrions pas le renforcement des propriétés incitatives de la vanille par la nicotine, de façon surprenante nous montrons que l'arôme seul peut renforcer le comportement d'auto-administration.

Enfin, du fait de l'importance des effets sensoriels oraux dans la consommation de nicotine, nous avons étudié ses propriétés de palatabilité. Les tests de réactivité gustative montrent bien l'aversion gustative pour la nicotine seule et l'amélioration de la palatabilité par l'ajout d'additif aromatique. Ce changement de la palatabilité ne s'est néanmoins pas traduit par des changements du codage neuronal mesuré par le marquage de la protéine c-Fos dans les structures contribuant à l'expression de la valence positive ou négative, notamment le noyau accumbens, le cortex insulaire gustatif, le noyau basolatéral de l'amygdale, l'habenula et le noyau paraventriculaire du thalamus. En revanche, la nicotine, aromatisée ou non, a augmenté l'activation neuronale dans toutes ces structures.

L'ensemble de ces résultats met en lumière cette problématique d'association de la nicotine aux additifs pouvant moduler sa perception sensorielle et promouvoir par la suite sa consommation. L'attractivité des nouveaux produits du tabac et leur potentiel d'abus est une question authentique et un problème de santé publique dont l'étude et la régulation sont urgentes.

Mots clés : nicotine, auto administration orale, palatabilité, addiction, saveurs, e-cig, stimuli sensoriels

Abstract

Tobacco products are highly addictive and their abuse is a major public health problem. In humans, this addiction constitutes an oral consummatory experience involving sensory gustatory and olfactory components. Nowadays, the role of these components is further amplified with the increasing use of new “heat not burn” tobacco products, electronic nicotine delivery device (e-cigarettes especially), where nicotine is associated with additives including flavours and sugars. Thus, the impact of additives on the behaviour of nicotine consumption must be assessed.

In this research work, we are interested in oral nicotine and the bidirectional interaction with the associated flavours. In particular, we question the secondary reinforcing properties, the effects of aromas on the palatability of nicotine and its affective coding.

In a first chapter, we investigated the irritating properties of nicotine in a model of oral self-administration in mice genetically modified (knockout) for the thermoreceptor TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) because it is involved in harshness and it is sensitized by nicotine. We highlight that the absence of this receptor promotes nicotine consumption by reducing its oral aversion. It does not, however, have a specific role in motivation and relapse mechanisms.

It has been shown that non-pharmacological sensory stimuli become more salient when associated with nicotine. Here, we study the putative secondary reinforcement of oral stimuli by nicotine. We highlight the need for oral nicotine to be combined with additives that mask its bitter taste, to allow its volitional consumption and to be able to model the different stages of the addictive process. This process is sensitive to stimuli for consumption and reinstatement, but is unaffected by pharmacological challenges despite nicotine absorption measured by the dosage of plasma cotinine. High concentrations of nicotine solutions reveal its aversive properties and reduce oral self-administration in mice. Although we do not show the reinforcement of the incentive properties of vanilla by nicotine, we surprisingly show that the aroma itself can reinforce self-administration behaviour.

Finally, because of the importance of the oral sensory effects in nicotine consummatory behavior, we studied its palatability properties. Taste reactivity tests show the aversive taste of nicotine alone and the enhancement of its palatability by the addition of aromatic additive. However this change in palatability did not result in changes in the neuronal coding, measured by the labelling of c-Fos protein in brain structures contributing to the expression of the positive and negative valence, notably the nucleus accumbens, the gustatory insular cortex, the basolateral amygdala, the habenula and the paraventricular nucleus of the thalamus. On the other hand, nicotine, flavoured or not, increased neuronal activity in all these structures.

Altogether, these results highlight the importance of nicotine association with flavour additives that can modulate its sensory perception and subsequently promote its consumption. The attractiveness of new tobacco products and their abuse potential is a public health problem that needs urgent study and regulation.

Keywords: nicotine, oral self-administration, palatability, addiction, flavours, e-cig, sensory stimuli

Liste des Titres et Travaux

Publications

Tannous S, Darlot F, Caille S (2019). Study of flavored nicotine oral self-administration in mice (en préparation pour soumission à Psychopharmacology)

Tannous S, Caillé S (2019). Book chapter

Nicotine reward and abstinence: role of CB1 receptors. Neuroscience of Nicotine: Mechanisms and treatment (1st Edition), Ed. V. Preedy, Publisher Elsevier, 2019, Mar 21; 297-304. eBook ISBN: 9780128130360. Academic Press

Chartier M¹, **Tannous S**¹, Benturquia N, Labat L, Reis R, Risède P, Chevillard L, Mégarbane B, (2018). Baclofen-Induced Neuro-Respiratory Toxicity in the Rat: Contribution of Tolerance and Characterization of Withdrawal Syndrome. Toxicol Sci. 2018 Jul 1; 164(1):153-165.

Chartier M, Malissin I, **Tannous S**, Labat L, Risède P, Mégarbane B, Chevillard L, (2018). Baclofen-induced encephalopathy in overdose - Modeling of the electroencephalographic effect/concentration relationships and contribution of tolerance in the rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2018 Aug 30; 86:131-139.

¹ equally contributing

Communications affichées /orales

Tannous S (2017-oral) Etude du rôle de la prise orale volontaire de nicotine dans la mise en place de l'addiction. Journée de l'INICIA, Septembre 2017.

Tannous S, Caillé S, (2018- Poster) Role of taste aromas in the development of nicotine addiction: modeling voluntary nicotine oral consumption in mice. Journée Neurocampus, Mai 2018.

Tannous S, Darlot F, Orlandi E, Cador M, Caillé S (Poster): Role of sensory stimuli and palatability in oral-nicotine consumption in mice. NeuroFrance Marseille-mai 2019

Bourse, Prix, Formations

Juillet 2016 classée 19ème au concours de l'Ecole doctorale SVS de Bordeaux. Obtention de l'allocation doctorale du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur

Prix étudiant NeuroFrance 2019 – Soutien pour la participation au colloque à Marseille, 22-24 mai

2017-2018 Mission complémentaire d'enseignement UF Biologie-Nutrition-de Bordeaux

2017 Formation expérimentation animale niveau concepteur, CNRS

2018 Formation réglementaire en chirurgie chez le rongeur, VETSALIUS

Liste des abréviations

AA : Auto-administration
AAIV : Auto-administration intraveineuse
AAO : Auto-administration orale
ACh : Acétylcholine
ADHD : Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
AUC : aire sous la courbe
BLA : Noyau basolatéral de l'amygdale
BNST : Bed nucleus of stria terminalis
C_{max} : Concentration maximale
CeA : Noyau central de l'amygdale
CTA : Aversion gustative conditionnée
DA: Dopamine
DAB : Diaminobenzidine
DSM-V : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux- Edition 5
e-cig : Cigarette électronique
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ENDS : Systèmes électroniques d'administration de nicotine
FDA : Food and drug administration
FR: Ratio fixe
GABA : Acide gamma amino butyrique
GC : Cortex insulaire gustatif
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hb: Habenula
IP : Intra-péritonéale
IV : Intraveineuse
KO : Knock out
LH: Hypothalamus latéral
Nac : Noyau accumbens
nAChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
nAChRs : Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
NR : Réponses non-renforcées
NRT : Thérapie de remplacement nicotinique
NTS : Noyau du tractus solitaire
OFC: Cortex orbitofrontal

OFDT : Observatoire Français des drogues et des toxicomanies
OMS : Organisation mondiale de la santé
PbN : Noyau parabrachial
PFA : Paraformaldéhyde
PFC: Cortex préfrontal
PG : Propylène glycol
pH: Potentiel hydrogène
PR : Ratio progressif
PROP : Propylthiouracil
PVT : Thalamus paraventriculaire
R : Récepteur
ROI : Régions d'intérêt
RR : Réponses renforcées
Rs : Récepteurs
SC : sous-cutané
SNC : Système nerveux central
THC : Tétrahydrocannabinol
TRP : Transient receptor potential
TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid type 1
TRPM5 : Transient receptor potential Melastatin 5
VG : Glycérine végétale
VP : Pallidum ventral
VPM : Noyau thalamique ventroposteromedial
VPM pc : Division parvicellulaire du noyau thalamique ventroposteromedial
VTA: Aire tegmentale ventrale
WT: Wild type

Table des matières

Introduction	19
I. Produits du tabac et risques liés à leur utilisation.....	21
1. Le tabagisme, un problème de santé publique.....	21
2. Classification psychiatrique du tabagisme et des désordres associés aux produits du tabac	22
3. Facteurs de vulnérabilité.....	23
4. Effets de la nicotine	26
a. Des mécanismes moléculaires au comportement	26
i. Système cholinergique et récepteurs nicotiniques	26
ii. Système dopaminergique	28
b. Action pro-cognitive (effets psychostimulants pro-attentionnels).....	30
c. Abstinence et syndrome de sevrage	31
d. Tolérance.....	32
e. Rechute	32
5. Pharmacocinétique de la nicotine	33
6. Différents produits du tabac	34
a. Tabac fumé.....	34
b. Tabac non-brûlé	35
i. Cigarette électronique (e-cig) et produits de vapotage.....	35
ii. « Smokeless tobacco » ou tabac non-fumé	41
7. Renforcement lié aux produits de tabac	43
a. Renforcement primaire	43
b. Renforcement secondaire	44
c. Rôle des additifs du tabac	45
i. Flaveurs.....	46
ii. Sucre/édulcorants	47
iii. Effets renforçateurs de l'arôme ou du tabagisme aromatisé	48
II. Principaux modèles d'étude de la nicotine en expérimentation animale	51
III. Importance de la voie orale.....	54
IV. Système sensoriel	56
1. Système de la perception du goût	56
a. Papilles gustatives et innervation.....	56
b. Circuit du goût	57
c. Physiopathologie du goût.....	59
d. Codage du goût sucré: « sweetness ».....	59
e. Codage du goût amer: « Bitterness coding »	61
2. Système de l'olfaction	62
a. Circuit olfactif	62
b. Discrimination olfactive.....	63
c. Qualités « taste-like » des odeurs.....	63
3. Système d'intégration de l'information et codage sensoriel	64
a. Présentation générale	64
b. Rôle des différentes structures	66
i. Cortex insulaire gustatif (GC).....	66
ii. Amygdale : BLA et CeA.....	67
iii. Habenula (Hb)	68
iv. Cortex orbitofrontal (OFC).....	69

v.	Noyau du tractus solitaire (NTS)	70
vi.	Noyau parabrachial (PbN)	70
vii.	Pallidum ventral (VP).....	71
c.	Modulation de la valeur affective	72
V.	Problématique	77
VI.	Objectifs	78
Matériels et méthodes	79
I.	Animaux	81
II.	Drogues	821
III.	Paradigmes comportementaux	82
1.	Prise orale de nicotine.....	82
a.	Mesure de la consommation en accès libre.....	82
b.	Consommation volontaire en cages opérantes	83
i.	Cages opérantes	84
ii.	Auto administration orale (AAO)	84
2.	Test de réactivité gustative	88
a.	Principe	88
b.	Chirurgie intraorale chez la souris	88
c.	Mesure comportementale de la réactivité gustative.....	89
IV.	Analyse des substrats biologiques et neurobiologiques	82
1.	Dosage de la cotinine sérique	92
2.	Analyse de la réactivité neuronale	93
a.	Extraction et préparation du tissu cérébral.....	93
b.	Analyse de l'activité neuronale.....	94
i.	Immunohistochimie	94
ii.	Acquisition et traitement des données	95
Chapitre 1	99
Chapitre 2	123
Chapitre 3	175
Discussion générale	223
Bibliographie	237

Introduction

I. Produits du tabac et risques liés à leur utilisation

1. Le tabagisme, un problème de santé publique

L'addiction aux produits du tabac constitue un problème majeur de santé publique, vu le haut potentiel addictif de ces produits, le taux de rechute élevé (80-90%) et les conséquences négatives de l'abus pathologique, telles que le risque augmenté de maladies cardio-vasculaires et le risque de cancers. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le tabac tue plus de 80 000 personnes en France et 5,4 millions dans le monde chaque année (un mort toutes les 4,5 secondes). Un million des décès est causé par le tabagisme passif. La probabilité qu'un fumeur décède prématurément d'une complication liée au tabagisme est d'environ 50% (Doll et al., 2004). De ce fait, le tabagisme est la première cause de mortalité évitable et coûte à la société française, avec l'alcool, près de 120 milliards d'euros, suivi par le coût social des drogues illicites (8,7 milliards d'euros, Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2019). Pour toutes ces raisons réunies, il est nécessaire de s'intéresser et d'étudier le tabagisme et les autres consommations liées aux produits du tabac.

Les plants de tabac ont été rapportés et cultivés en France en 1556 par André Thévet mais le tabac a été popularisé à la cour de France en 1561 par Jean Nicot. La nicotine (3- (1-méthyl-2-pyrrolidinyl) pyridine), molécule addictive du tabac, est naturellement présente dans la plante *Nicotiana tabacum*, dicotylédone de la famille des Solanaceae. Elle représente l'alcaloïde du tabac le plus abondant, environ 95% de la teneur en alcaloïdes de la plante, 10% de son poids sec et 1,5% en poids de cigarette. Les produits contenant cette molécule sont classifiés parmi les drogues licites, excitantes ou psychostimulantes selon le pharmacologue berlinois Louis Lewin (1924) et la dépendance au tabac est principalement produite par les effets pharmacologiques de la nicotine (Benowitz et al., 2009).

La nicotine, molécule ayant des effets psychotropes modérés (Chaudhri et al., 2006a; Le Foll and Goldberg, 2006; Le Moal and Koob, 2007) ou masqués par ses effets aversifs propres (Tan et al., 2009), engage une situation paradoxale puisqu'elle est hautement addictive (Carter et al., 2009; Stolerman and Jarvis, 1995) et emporte le taux de dépendance le plus élevé (plus que 30% des expérimentateurs) comparé aux autres drogues qui sont plus puissantes et réputées d'avoir de forts risques d'abus (OFDT, 2018 ; Anthony et al., 1994; Breslau et al., 2001) (Fig.1). 70% des fumeurs affirment vouloir arrêter ou réduire leur consommation et 80% de ceux qui s'en abstiennent rechutent en moins d'un mois (Kenford et al., 1994). Les effets de la nicotine ne peuvent pas intégralement expliquer l'addiction aux produits du tabac ; il est donc crucial de comprendre les autres composantes qui conduisent à cette forte dépendance et aux rechutes répétées.

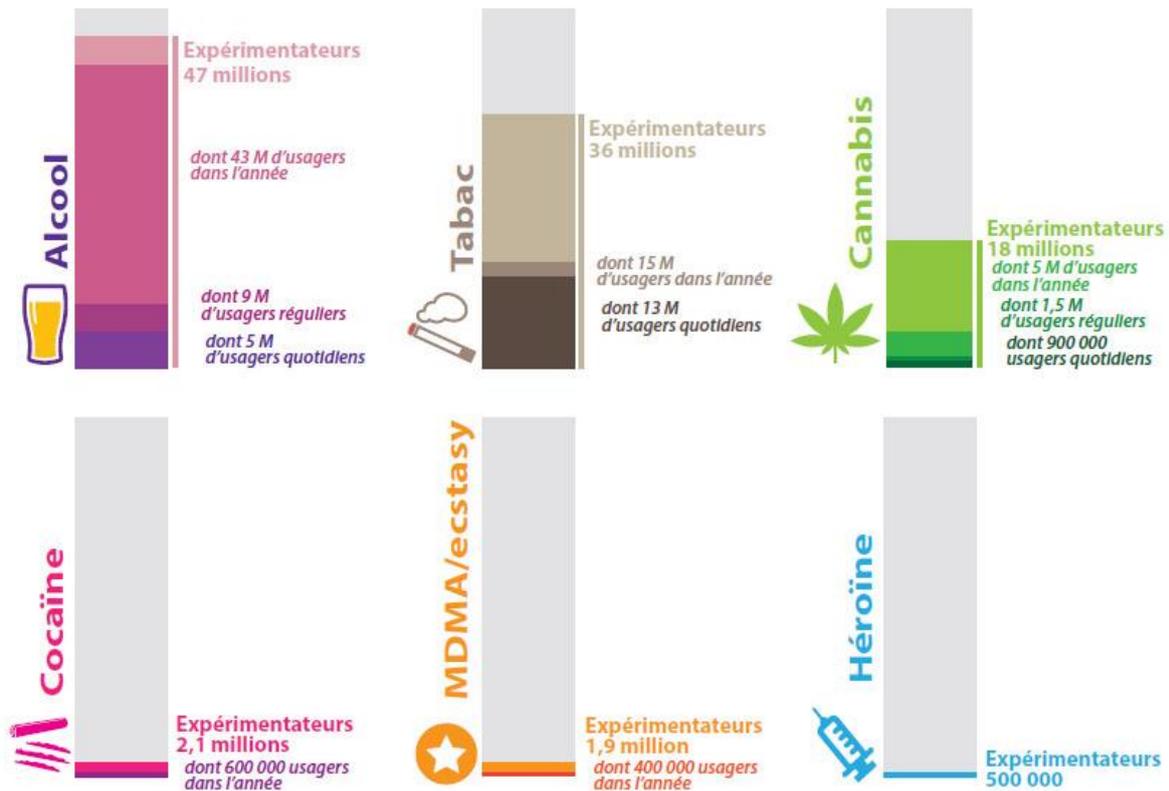


Fig. 1 : Potentiel addictif : Représentation des estimations du nombre de consommateurs de substances psychoactives en France métropolitaine parmi les 11-75 ans, adapté de OFDT, via Baromètre santé et ESCAPAD, 2017 et EnCLASS 2018. <https://www.ofdt.fr/files/5415/6258/2229/NbreConsommateursSubstancesDCC2019.jpg>

2. Classification psychiatrique du tabagisme et des désordres associés aux produits du tabac

La nicotine partage la plupart des caractéristiques des autres drogues d'abus (Pontieri et al., 1996; Stolerman, 1999) et est répertoriée en tant que drogue d'abus dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5, American Psychiatric Association, Edition 2013). Les critères qui doivent être remplis pour caractériser un abus ou addiction aux produits de tabac suivent le même schéma que pour les autres addictions considérées comme maladies mentales chroniques. Cette addiction provoque une détresse et une déficience cliniquement significatives chez les personnes touchées. Une activité compulsive de recherche et de prise de drogue est installée, la personne perd contrôle sur la limitation de la consommation et on voit l'émergence d'un état émotionnel négatif (dysphorie, irritabilité, anxiété) lorsque l'individu est dans l'incapacité d'accéder à la drogue. Ceci pourrait avoir des conséquences sociales et physiques (Fiore and Jaen, 2008; Volkow et al., 2016). Ces symptômes sont liés aux adaptations neurobiologiques des circuits cérébraux qui sous-tendent l'émotion, la motivation et la cognition (Markou, 2008).

Plus spécifiquement, le consommateur devient dépendant quand il remplit au moins 2 des critères cités dans le DSM-5 pendant une période étendue sur 12 mois (la chronicité de l'usage est importante dans l'addiction). Les critères sont les suivants :

- Consommation plus importante que prévu en quantité et en période de temps
- Désir et effort persistants d'arrêt mais perte de contrôle de la consommation et rechutes répétées
- Temps important passé sur des activités afin de se procurer la drogue
- État et comportement de *craving* et de recherche de la drogue
- Échec dans d'autres domaines de la vie à cause de la consommation abusive
- Le maintien de la consommation malgré les conséquences négatives et les problèmes récurrents sur le plan social et les relations interpersonnelles
- Développement de la tolérance et du besoin d'augmenter les quantités consommées pour expérimenter le même effet
- Syndrome de sevrage et de manque à l'arrêt de la consommation, soulagé par la prise de nicotine.

D'autres échelles de diagnostic et de sévérité de dépendance existent, telles que le test de Fagerström (Heatherton et al., 1991), l'échelle du syndrome de dépendance à la nicotine (NDSS) (Shiffman et al., 2004) et l'inventaire du Wisconsin des motifs de dépendance au tabac (Piper et al., 2004).

3. Facteurs de vulnérabilité

La vulnérabilité à l'addiction à une drogue résulte d'interactions complexes entre la drogue, les facteurs génétiques et l'environnement (Piazza and Le Moal, 1996). Ainsi, les facteurs négatifs de stress, les relations entre pairs, la pauvreté et les difficultés, ou les facteurs d'expériences positives, augmentent ou diminuent respectivement les risques d'engager dans des comportements addictifs (Koob, 2008; Sinha, 2001) (Fig. 2).

a. Facteurs environnementaux

Le tabagisme est, dans nos sociétés, conditionné par des facteurs environnementaux et considéré comme un comportement social, médié par une image d'adulte et des publicités qui encouragent à la consommation (Villanti et al., 2017b). Les industries du tabac ont d'ailleurs compris ceci depuis longtemps. La pression de la société, l'effet des pairs surtout à l'adolescence, l'adhésion à un groupe d'amis fumeurs, la conviction de l'effet déstressant et pro-attentionnel de la cigarette, incitent les personnes à acquérir ce comportement de prise et à le maintenir (Hahn et al., 1990) (White et al., 2008). Aussi, une augmentation de la valeur du tabac est observée lors de

l'association à d'autres activités *-trigger times-* comme la prise de café, les relations sexuelles, l'alcool, certains endroits. En effet, chez l'humain, les signaux socio-environnementaux jouent un rôle majeur dans le comportement de prise (Pina et al., 2018) ; le fumeur apprécie le goût et les sensations fournies par sa marque de cigarette (signature sensorielle) qu'il ne change d'ailleurs pas souvent.

i. Enrichissement de l'environnement et addiction à la nicotine

Les facteurs environnementaux modulent nos réponses aux drogues en changeant la perception de la récompense par celles-ci. Ce changement a par exemple été traduit par des neuroadaptations et changement de la neuroplasticité. Ainsi, l'exposition des rats à un environnement enrichi a entraîné une diminution de l'effet de sensibilisation locomotrice à la nicotine produit après administration répétée de drogue (Green et al., 2003 ; Hamilton et al., 2014). De même l'enrichissement réduit la réponse opérante et la recherche de drogue au cours de l'auto-administration intraveineuse (AAIV) de nicotine et après abstinence, ce qui démontre un effet *anti-craving* de l'environnement enrichi (Sikora et al., 2018). L'enrichissement de l'environnement des animaux avec des substances palatables ou une alimentation illimitée (Carroll et al., 2008), de nouveaux objets (Cain et al., 2005), diminue également la prise de drogue, le syndrome de sevrage et la rechute.

Ces effets sont confirmés chez les patients humains fumeurs avec une diminution des symptômes du sevrage et du désir de fumer après récompenses différentes de la drogue tels que le sport (Ussher et al., 2001) ou des substances sucrées (West et al., 1999).

Cette baisse de la valeur de la récompense liée à la drogue par une récompense environnementale est aussi valable pour d'autres drogues d'abus comme la cocaïne (Chauvet et al., 2009 ; Nader et al., 2012; Solinas et al., 2008) et l'héroïne (El Rawas et al., 2009) par exemple.

b. Facteurs génétiques et épigénétiques

Des facteurs génétiques ou épigénétiques peuvent jouer un rôle non-négligeable dans l'abus des produits du tabac, le renforcement, le syndrome de sevrage, la rechute et les risques de développer les maladies du tabagisme ; ceci a été mis en évidence par des études longitudinales chez des humains jumeaux (Carmelli et al., 1992; Li et al., 2003; Sullivan and Kendler, 1999; Xian et al., 2003). La différence des densités des récepteurs nicotiques par exemple changera le ressenti à la prise de drogue ; ainsi, la variation allélique au niveau du cluster du gène des sous-unités $\alpha 5/\alpha 3/\beta 4$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) sur la région chromosomique 15q25 augmente significativement le risque d'addiction au tabac (Lips et al., 2010; Saccone et al., 2007).

Un des facteurs qui entrent aussi en jeu est le métabolisme de la nicotine. Celui-ci est majoritairement dépendant des enzymes hépatiques dont le CYP2A6, cytochrome impliqué dans

la réaction d'oxydation de la nicotine. Des polymorphismes génétiques pouvant toucher cette enzyme joueront par exemple un rôle dans la variation du métabolisme (absorption et élimination surtout) de la nicotine et par conséquent affecteront la prise, les effets et l'addiction (Gu et al., 2000; Tyndale and Sellers, 2002). Le taux de métabolisme de la nicotine est associé à la vulnérabilité à devenir fumeur (Schoedel et al., 2004), au taux d'exposition aux produits toxiques du tabac (Derby et al., 2008) et à l'efficacité du sevrage tabagique (Lerman et al., 2010; Lerman et al., 2006; Schnoll et al., 2009).

c. Facteur de l'âge

L'âge est un facteur physiologique interne pouvant influencer la prise et le métabolisme du tabac : la clairance de la nicotine diminue significativement avec l'âge et ceci à cause d'un débit sanguin diminué, causant une réduction de l'excrétion hépatique de la nicotine.

L'âge d'initiation au tabagisme est aussi un facteur de risque de développement de l'addiction aux produits du tabac puisque les adolescents constituent une tranche vulnérable de la population, ayant des profils plus accentués de sensibilité aux drogues, aux nouveaux aliments et facteurs environnementaux, d'impulsivité, de prise de risque, de recherche de la nouveauté et de changements hormonaux (Chambers and Potenza, 2003 ; Spear, 2000).

Une approche précoce de la drogue semble être associée à une vulnérabilité et probabilité plus élevées de passer d'une consommation récréative à une consommation régulière abusive et au développement d'une dépendance. Ainsi, l'exposition des rongeurs à la nicotine pendant l'adolescence a résulté en une augmentation de l'auto-administration (AA) (McQuown et al., 2007), augmentation de l'effet récompensant de la nicotine (Kota et al., 2009) et de la préférence de la solution de nicotine (Adriani et al., 2002a) à l'âge adulte. Aussi, les rats adolescents s'auto-administrent plus de nicotine comparé aux adultes (Levin et al., 2007; Levin et al., 2003). Placzek et collègues montrent aussi qu'une seule exposition aiguë à la nicotine durant l'adolescence résulte en une potentialisation synaptique à long terme des neurones dopaminergiques (Placzek and Dani, 2009). Ce facteur d'âge est donc à prendre sérieusement en compte lors de l'étude des addictions en général et du tabagisme en particulier.

d. Maladies psychiatriques

Plusieurs études ont prouvé une corrélation positive entre le tabagisme et les maladies psychiatriques. Ainsi, les patients atteints de schizophrénie, de dépression ou d'addiction à l'alcool, présentent des taux de tabagisme significativement plus élevés comparé à la population normale (Breslau, 1995; Mobascher and Winterer, 2008; Nisell et al., 1995). L'état émotionnel négatif ou positif peut aussi augmenter la vulnérabilité à l'addiction puisque la nicotine chez les

patients schizophréniques, aide à la réduction de la souffrance résultant des symptômes négatifs et améliore les déficiences cognitives (Dome et al., 2010; Newhouse et al., 2011). Une comorbidité existe entre tabagisme et syndrome d'hyperactivité (ADHD); les patients consomment les produits du tabac pour améliorer l'état aversif lié à leur maladie psychiatrique (Goldenson et al., 2016b; Potvin et al., 2003). Chez le rat, l'AA de nicotine améliore des déficits cognitifs induits par une activation immunitaire maternelle par injection de lipopolysaccharide durant la gestation (Waterhouse et al., 2018).

Tous ces facteurs contribuent en partie à la prise de drogue. Dans certains cas, ils entrent en synergie et l'intégration des risques constitue un modèle additif de vulnérabilité (Carroll et al., 2009).

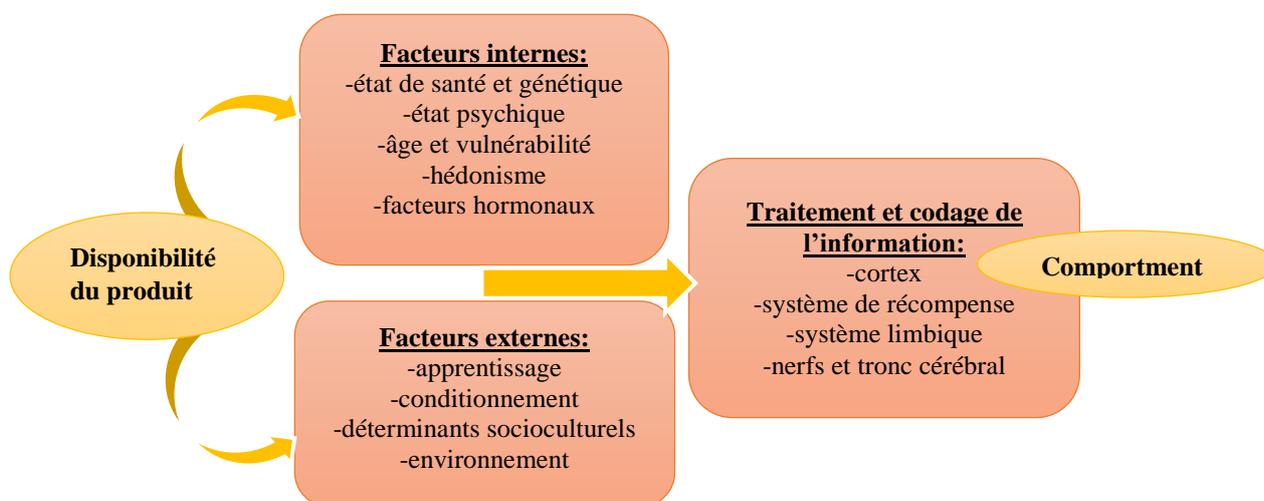


Fig.2: De l'exposition au comportement. Facteurs qui entrent en jeu dans la mise en place du comportement addictif.

4. Effets de la nicotine

a. Des mécanismes moléculaires au comportement

i. Système cholinergique et récepteurs nicotiques

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) a été premièrement identifié au début du XXème siècle en tant que substance réceptive qui médie les actions de la nicotine synthétique (Langley, 1905). En effet, dès que la nicotine atteint le cerveau, elle y diffuse facilement et la (S)-nicotine, forme prédominante, se lie de manière stéréo-sélective aux nAChRs, qui sont des récepteurs ionotropes pentamériques (comprenant 5 sous-unités) perméables aux ions sodiques et calciques ainsi qu'aux ions potassiques (canal cationique non spécifique), sensibles à l'acétylcholine (Dani and De Biasi, 2001). La nicotine est un agoniste des nAChRs auxquels elle se lie dans le cerveau et imite l'action du neurotransmetteur naturel, l'acétylcholine; ce neurotransmetteur joue un rôle important dans les effets récompensants de la nicotine (Wonnacott et al., 2005). Quand un agoniste se lie au récepteur, ce dernier change de conformation stérique,

ouvrant ainsi le canal ionique qui lui est associé pour laisser entrer des ions cationiques dépolarisant la membrane plasmique et excitant le neurone par activation des voies de transduction du signal (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004). Le canal se ferme par la suite, devient inactif et se désensibilise à tout neurotransmetteur (Changeux et al., 1998). Cette désensibilisation est plus accentuée chez les tabagiques suite à leur exposition continue à la nicotine et le maintien de hautes concentrations de nicotine sanguine durant la journée (Dani and Heinemann, 1996; Pidoplichko et al., 1997).

Ces récepteurs se répartissent largement dans le tissu nerveux (Perry et al., 2002). De fortes densités existent spécifiquement au niveau du thalamus, de la voie habenulaire interpedonculaire (habenula médiale) (De Biasi and Salas, 2008; Mugnaini et al., 2002 ; Perry et al., 2002), de l'area postrema, du cortex et de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et dans le striatum ventral qui contient des densités de corps cellulaires cholinergiques plus fortes que le striatum dorsal (Gotti et al., 2006 ; Mesulam et al., 1984). Les nAChRs présents au niveau du système dopaminergique, notamment de l'ATV et ses projections vers le noyau accumbens (Nac), jouent un rôle important dans les comportements liés à l'addiction à la nicotine (Corrigall et al., 1994 ; Maskos et al., 2005) et la nicotine amplifie les signaux dopaminergiques liés à la récompense dans le striatum (Rice and Cragg, 2004 ; Zhao-Shea et al., 2011). La voie habenulo- interpedunculaire est impliquée dans la rechute et le syndrome de sevrage à la nicotine (Antolin-Fontes et al., 2015; Dani and De Biasi, 2013). Cette voie régule aussi le renforcement nicotinique en codant l'aversion par transmission de signaux motivationnels inhibiteurs qui limitent la prise de nicotine (Fowler et al., 2011).

1. Classification et pharmacologie du R nicotinique

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) est un complexe pentamère, formé par la combinaison de sous unités α , β , γ et δ et est présent au niveau du système nerveux central et périphérique (Gotti et al., 2006). Le récepteur peut exprimer des récepteurs α seulement (homomérique) ou une combinaison des sous-unités α et β (hétéromérique). Il existe 4 segments transmembranaires au niveau de chaque sous-unité (M1-M4). Les segments M2 tapissent la face interne du pore et les agonistes se fixent sur des sites de liaison du domaine extracellulaire, entre 2 sous-unités situées l'une à proximité de l'autre (Morales-Perez et al., 2016).

Les nAChRs ont été repérés au niveau du cerveau, des jonctions neuromusculaires, des ganglions autonomes, de la peau, du poumon et participent à la régulation des processus physiologiques (Albuquerque et al., 2009 ; Gundisch, 2000).

Le cerveau des mammifères contient jusqu'à neuf sous-unités α ($\alpha 2$ à $\alpha 10$) et trois sous-unités β ($\beta 2$ à $\beta 4$) (Le Novère et al., 2002 ; Markou, 2008) du nAChR. Les Rs du type hétéromérique

contenant les sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 6$ et $\beta 2$ - $\beta 4$ présentent une forte affinité pour la nicotine (Changeux, 2010; Gotti et al., 2009). Dans le cerveau humain, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 7$ sont les sous-types les plus abondants. $\alpha 4\beta 2$ serait le principal récepteur impliqué dans la dépendance à la nicotine chez l'humain (Benowitz, 2010). Le récepteur $\alpha 4\beta 2$ peut également inclure des sous-unités telles que $\alpha 5$, $\alpha 6$ et / ou $\beta 3$. Ces sous-unités supplémentaires peuvent moduler la sensibilité du R et sa fonction. Aussi, il a été montré que la sous-unité $\beta 2$, ayant une très forte affinité pour la nicotine (Picciotto et al., 1995) est particulièrement importante pour les propriétés renforçantes et addictives de cette substance (Brunzell et al., 2006; Mineur and Picciotto, 2008). Les souris knock-out (KO) du gène de la sous-unité $\beta 2$ n'ont pas montré les effets comportementaux de la nicotine mais ceux-ci ont été rétablis lors de la réinsertion de la sous-unité $\beta 2$ dans la région tegmentale ventrale des souris KO $\beta 2$ (Maskos et al., 2005; Picciotto et al., 1995). La sous-unité $\alpha 4$ semble jouer un rôle dans la détermination de la sensibilité à la nicotine alors que la sous-unité $\alpha 7$ joue plutôt un rôle dans le sevrage, l'apprentissage et la synchronisation sensorielle, ainsi que dans la rapidité de la transmission synaptique (Benowitz, 2009). Aussi, des études sur le rôle des sous-unités dans le renforcement de la voie dopaminergique et la sensibilité au renforcement par la nicotine ont montré que les sous-unités $\alpha 5$ des nAChRs présentes spécifiquement dans l'ATV étaient un déterminant de la prise de nicotine (Morel et al., 2014). Chez les souris Tabac ayant une surexpression de la sous-unité $\beta 4$ dans l'habenula (Hb) médiale et la région interpedonculaire, on observe une augmentation de l'aversion à la nicotine et des courants nicotiques dans l'Hb médiale (Frahm et al., 2011).

ii. Système dopaminergique

Dans les années 50, lors des premières expérimentations d'autostimulation intracrânienne par James Olds et Peter Milner (Olds and Milner, 1954), des centres du plaisir du cerveau ont été découverts (Olds, 1956) et la stimulation selon un paradigme de conditionnement opérant était liée à un renforcement positif. Les neurones dopaminergiques de ce circuit sont responsables du plaisir lié à la prise de drogue et encodent la salience du signal expérimenté suite à la consommation (Berridge and Robinson, 1998). Ce neurotransmetteur a été traditionnellement impliqué dans la signalisation de la récompense, la perception de la valeur appétitive des renforcements et l'apprentissage du renforcement (Dayan and Balleine, 2002; Waelti et al., 2001).

1. Circuit de récompense et nicotine

La nicotine, comme toutes les drogues d'abus, engendre une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques dans l'ATV augmentant ainsi la dopamine extracellulaire dans les structures de projections de l'ATV (Di Chiara and Imperato, 1988; Nisell et al., 1994), impliquées dans la réponse aux signaux associés aux drogues telles que le Nac, le cortex préfrontal (PFC),

l'amygdale et l'hippocampe (Brody et al., 2004; Koob, 1992). L'ensemble de ces régions a été défini en tant que système de récompense (Wise, 1996).

Effectivement, l'expérience plaisante due à l'activation du système dopaminergique joue un rôle essentiel dans l'expression du renforcement par la nicotine (Harrison et al., 2002; Kenny and Markou, 2006; Robbins and Everitt, 2002). Plus particulièrement, l'AA de nicotine est hautement dépendante de la disponibilité de dopamine (et de l'ACh) (David et al., 2006; Di Chiara, 2000). La nicotine augmente les niveaux de dopamine dans le Nac (Imperato et al., 1986) et ceci joue un rôle dans son renforcement (Kleijn et al., 2011; Reid et al., 1996, 1998). Cette réponse dopaminergique est renforcée chez les animaux prétraités par des injections quotidiennes de nicotine avant le jour du test (Benwell and Balfour, 1992). Ainsi, l'activité des Rs dopaminergiques est nécessaire pour l'AAIV de nicotine (Corrigall et al., 1992) (Sorge and Clarke, 2009), le traitement de ses effets motivationnels (Corrigall et al., 1994), la préférence de place conditionnée (Shoaib et al., 1994) et l'activation locomotrice (Palmatier and Bevins, 2002). Aussi, les Rs dopaminergiques de type D1 dans le cortex insulaire, ont été prouvés importants pour l'AAIV et la valeur récompensante de nicotine chez le rat (Kutlu et al., 2013).

L'augmentation de la libération de la dopamine dans le Nac (chez le rat) suivant l'administration de nicotine est régulée par les nAChRs présynaptiques localisés sur les corps cellulaires dopaminergiques dans l'ATV (Mansvelder et al., 2002; Mansvelder and McGehee, 2002; Nisell et al., 1994). Ces nAChRs modulent l'activité du transporteur dopaminergique (Middleton et al., 2004) et la libération des neurotransmetteurs. Ceci résulte en une plasticité synaptique à long terme, reflet neuronal de l'exposition à la nicotine et du processus addictif (Dani et al., 2001; Ji et al., 2001). De même, l'AA de nicotine augmente l'expression du facteur de transcription et marqueur de l'activité neuronale c-Fos dans le Nac (Pich et al., 1997).

De plus, l'exposition chronique à la nicotine change, qualitativement le rôle fonctionnel de la transmission dopaminergique mésolimbique dans le traitement des effets renforçants et aversifs de la nicotine, par rapport à son administration de façon aiguë (Tan et al., 2009) (voir Fig.3). Cette plasticité se produit dans les populations neuronales GABAergiques et DAergiques de l'ATV. Ainsi, l'exposition continue à la nicotine provoque une sensibilisation des comportements liés à la dopamine (Laviolette and van der Kooy, 2004). De même, en chronique, la nicotine augmente l'activité basale des neurones dopaminergiques (Caille et al., 2009). De façon consistante avec ces résultats, des études *in vitro* sur des coupes d'ATV de souris démontrent que l'exposition chronique à la nicotine augmente fortement les décharges des neurones GABAergiques de l'ATV de façon simultanée à la réduction de l'activité des neurones DAergiques de la même région. Ces

effets sont reliés à la régulation positive (up-regulation) de la sous-unité $\alpha 4$ du nAChR localisée au niveau des neurones GABAergiques de l'ATV (Nashmi et al., 2007).

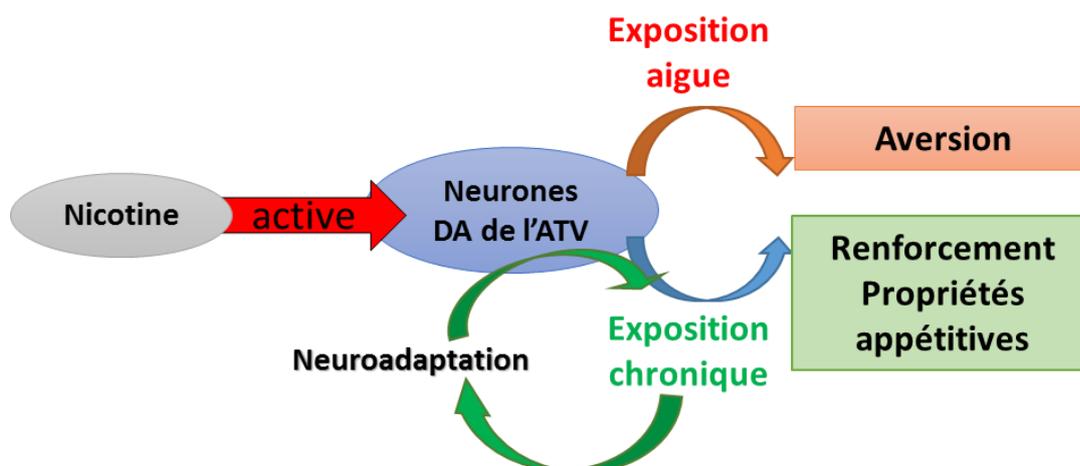


Fig.3 : Représentation schématique de l'action de la nicotine sur le système dopaminergique. La nicotine active la transmission dopaminergique et ceci a des effets opposés : l'exposition aiguë induit de l'aversion alors que l'exposition chronique induit des processus neuroadaptatifs qui altèrent la transmission dopaminergique dont l'activation sous-tendrait les propriétés renforçantes et appétitives de la nicotine.

Le système dopaminergique est aussi important pour l'attribution de la valeur hédonique aux drogues, comme la nicotine, et aux aliments palatables (Kenny and Markou, 2001). Ainsi, la consommation du sucre ou de ces aliments peut augmenter la libération de l'ACh dans l'ATV (Hajnal et al., 1998; Rada et al., 2000).

D'autres comportements induits par la nicotine sont médiés par divers neurotransmetteurs également libérés (Mitchell, 1993; Wonnacott, 1997), notamment la noradrénaline (éveil, suppression de l'appétit), l'acétylcholine (éveil, amélioration cognitive), la sérotonine (modulation de l'humeur, suppression de l'appétit), le GABA (réduction de la tension et de l'anxiété), le glutamate (apprentissage, amélioration de la mémoire) et les endorphines (réduction de l'anxiété et de la tension) (Benowitz, 2008; MacDermott et al., 1999; Wonnacott et al., 1989).

b. Action pro-cognitive (effets psychostimulants pro-attentionnels)

La nicotine est un psychostimulant qui améliore la concentration et la performance ; elle agit sur plusieurs aspects comportementaux tels que la locomotion, l'anxiété, la nociception, l'apprentissage et la mémoire (Decker et al., 1995). Ainsi, cette molécule augmente les capacités attentionnelles et la vigilance chez les fumeurs, comparé à un groupe contrôle (Rusted and Warburton, 1992) ; elle facilite aussi la mémoire par augmentation de sa consolidation selon des processus qui suivent l'apprentissage (Sarter et al., 2005; Thiel, 2003 ; Warburton et al., 1992).

Des études précliniques chez la souris montrent que la nicotine améliore significativement les dysfonctionnements induits par le stress sur la cognition et la plasticité synaptique (Shang et al.,

2017). En effet, plusieurs études ont montré un rôle des nAChRs dans la maturation des circuits importants pour l'attention durant le développement (Heath and Picciotto, 2009). Ainsi, la nicotine renforce l'attention et la performance cognitive chez les animaux (Hahn and Stolerman, 2002) et chez les humains initialement non-fumeurs (Rezvani and Levin, 2001). Comme plusieurs drogues psychoactives, la nicotine peut changer l'état mental d'une façon à faciliter les interactions sociales entre congénères (Eissenberg and Balster, 2000; Wang et al., 2016). Ce comportement est considéré comme récompensant (Matthews et al., 2005; Panksepp and Lahvis, 2007) chez les humains (Walter et al., 2005) et les rongeurs (Zernig et al., 2013). Le tabac augmente alors l'attention et baisse l'anxiété avec des effets plaisants, coupe-faim et relaxants (Benowitz, 1999; Kenny et al., 2000).

c. Abstinence et syndrome de sevrage

Le syndrome de sevrage tabagique se manifeste par une symptomatologie somatique et affective due au manque de nicotine, suite à une période d'abstinence ou d'arrêt. Chez l'humain, ce syndrome inclut une recherche de la nicotine (craving), des maux de tête, des nausées, une augmentation de l'appétit, de la fatigue ou une asthénie, des difficultés de concentration, une insomnie, une irritabilité, une agitation et une anxiété (Hughes et al., 1994; Kenny and Markou, 2001). Ces symptômes peuvent être vécus très inconfortablement surtout pour les personnes dont l'apport journalier en nicotine est très élevé. Ceci peut les motiver à consommer la nicotine de nouveau pour éviter le syndrome de sevrage et ré-atteindre le taux de nicotine dont elles ont besoin (théorie de renforcement négatif, Tan et al., 2009). Durant les périodes d'abstinence chez les fumeurs chroniques (le sommeil par exemple), les nAChRs ($\alpha 4\beta 2$) désensibilisés par la présence préalable de nicotine redeviennent libres et réactifs à la stimulation (Quick and Lester, 2002). Les symptômes de manque et d'abstinence se développent dans cet état des récepteurs et le syndrome de sevrage est apaisé par la consommation de nicotine et sa liaison aux récepteurs libres. On observe alors, suivant ces périodes d'abstinence (nuit ou privation minimale), une relation entre la dose et les sensations euphoriques produites lors de la consommation de nicotine (Pomerleau and Pomerleau, 1992).

Chez les rongeurs, le syndrome de sevrage spontané ou après injection d'antagoniste comme la mécamylamine, comprend des tremblements, des *gapes*, un ptosis, un léchage de la partie génitale, un claquement des dents et un changement de l'activité locomotrice (Hildebrand et al., 1997; Malin et al., 1992).

d. Tolérance

La première cigarette de la vie est souvent mal perçue et déplaisante, vu le goût amer de la nicotine, ses propriétés aversives et l'irritation orale et respiratoire qu'engendre la fumée de cigarette (Eissenberg and Balster, 2000; Fowler and Kenny, 2014). Quand le comportement est répété et devient chronique et continu, la dépendance et le manque de nicotine peuvent se manifester (Pomerleau et al., 1993). Ainsi, une tolérance aux effets aversifs se développe et la quantité consommée augmente, augmentant avec elle la valeur du tabac au niveau du système de récompense et le renforcement qui suit chaque prise.

Aussi, une tolérance aux effets psychotropes et psychostimulants de la nicotine se développe, causant une augmentation de la fréquence et des quantités de consommation pour combler le besoin et arriver à compenser les effets non ressentis. Ceci est probablement dû à l'augmentation du nombre des sites de liaison du nAChR et à un métabolisme accéléré de la nicotine, ce qui représente une up-régulation en réponse à la désensibilisation des nAChRs, phénomène médié par la présence de la nicotine sur les sites de liaison (Govind et al., 2009); ainsi, la personne continue à fumer afin de garder une concentration sanguine stable (titration) dans son corps.

e. Rechute

Malgré les effets psychotropes modérés de la nicotine, les taux de rechute restent élevés, même après une longue période d'abstinence et prise en charge thérapeutique. Le taux de réussite reste entre 20-25% (Gonzales et al., 2006; Hughes, 1992). Pour la plupart des fumeurs, arrêter de fumer est un long chemin même avec toutes les thérapies disponibles. 70% des fumeurs veulent arrêter, alors que les autres ne sont pas intéressés (Kenford et al., 1994). Une meilleure compréhension des causes de rechute est à prendre en compte avant toute action ou thérapie surtout que des facteurs autres que la drogue entrent en jeu dans ce processus, surtout les facteurs environnementaux préalablement conditionnés à la prise de drogue (gestes, endroits, routine, personnes et stress).

Même durant les études précliniques, la réinstallation du comportement d'AA chez les rats après une période d'extinction s'est montrée possiblement induite par de faibles doses de nicotine (Chiamulera et al., 1996) (Forget et al., 2009). De façon intéressante cette rechute a aussi été possible par les stimuli qui étaient préalablement associés à l'AA de nicotine (Caggiula et al., 2001) (Fowler and Kenny, 2011). De façon intéressante, cette réinstallation du comportement addictif était plus efficace que celle induite par la nicotine elle-même (LeSage et al., 2004).

5. Pharmacocinétique de la nicotine

a. Absorption et distribution

Une fois dans la circulation, la nicotine est largement distribuée dans les tissus avec un volume de distribution moyen à l'état d'équilibre allant de 2,2 à 3,3 L/Kg. La capacité de liaison aux nAChRs dans le cerveau est plus élevée chez les fumeurs que chez les non-fumeurs en raison de la hausse de la régulation (up-regulation) des nAChRs ($\alpha 4\beta 2$) dans le cerveau des fumeurs (Armitage et al., 1975 ; Flores et al., 1992; Hukkanen et al., 2005).

Les concentrations sanguines de nicotine varient entre 2 pics. En cas de tabagisme chronique et quotidien, les concentrations maximales de nicotine dans le sang varient de 10 à 50 ng/mL; En fonction de la manière dont la cigarette est fumée, une cigarette augmente les concentrations sanguines de nicotine de 5 à 30 ng/mL. La nicotine, rapidement libérée et absorbée augmente les concentrations sanguines, qui diminuent ensuite rapidement au cours des 20 minutes suivantes. La nicotine inhalée se distribue rapidement dans les tissus, avec une demi-vie de 8 minutes. Le tabagisme régulier pendant 6 à 9 heures (h) par jour permet une accumulation de la nicotine dans le corps et l'exposition chronique à la nicotine entraîne la présence persistante de nicotine dans le cerveau, jour et nuit, et entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles des nAChRs et des processus intracellulaires de neuroadaptation (Benowitz, 2009).

Chez la souris (C57BL/6J), l'administration de nicotine par voie sous-cutanée (1 mg/Kg) a démontré une concentration maximale de 160 ng/mL à T_{max} = 10 min. Le temps de demi-vie plasmatique était de 9.2 min et la clairance CL/F de 5.2 mL/min (Siu and Tyndale, 2007).

Avec les produits du tabac non fumé, la nicotine est absorbée par échanges sanguins au niveau de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures avec un taux d'absorption dans le sang plus lent que celui par inhalation (Bergstrom et al., 1995). En revanche, le dépôt de nicotine dans la bouche et la gorge entraîne des effets sensoriels plus importants en raison de l'activation des nerfs périphériques (Henningfield et al., 2004).

Chez la souris, l'administration orale chronique de nicotine à 60 μ g/mL dans l'eau pendant 5 à 6 semaines a résulté en des taux plasmatiques de nicotine de l'ordre de 34.4 ng/mL (Rowell et al., 1983). De même, une analyse de la pharmacocinétique suivant l'administration orale de nicotine à 15 mg/Kg (par gavage) chez la souris a montré une concentration maximale (C_{max}) de 64 ng/mL, une aire sous la courbe (AUC) de 60.8 ng.min/mL, un temps de demi-vie ($T_{1/2}$) de 26.5 minutes et une clairance (CL/F) de 102.8 mL/min (Alsharari et al., 2014).

b. Métabolisme et excrétion de la nicotine

Le site principal du métabolisme de la nicotine est le foie. La cotinine est le métabolite de la nicotine le plus important quantitativement chez les mammifères (70-80 % de la nicotine) avec des proportions similaires chez l'humain et la souris comparé à des taux plus bas chez le rat, faisant ainsi de la souris un bon modèle d'étude des effets pharmacologiques du métabolisme de la nicotine *in vivo* (Alsharari et al., 2014). La demi-vie d'élimination de la nicotine est d'environ 2 h (100-150 min), durée relativement courte par rapport à d'autres substances pouvant moduler l'activité du système cholinergique (Hukkanen et al., 2005).

La nicotine est transformée en cotinine par un processus en deux étapes, consistant en une réaction médiée par le cytochrome P450 (CPY2A6 chez l'humain et CYP2A5 chez la souris) (Messina et al., 1997; Murphy et al., 2005), produisant un ion nicotine- $\Delta^{1' (5')}$ -iminium suivi d'une réaction cytoplasmique aldéhyde-oxydase (Hukkanen et al., 2005). La cotinine est par la suite métabolisée en un certain nombre de métabolites dont six principaux chez l'humain: la 3'-hydroxycotinine, la 5'-hydroxycotinine, la cotinine-N-oxyde, l'ion cotinine méthonium, la cotinine glucuronide et la norcotinine (Benowitz et al., 1994).

D'après la mesure des taux de nicotine dans le sang après l'administration d'une dose connue, la clairance totale moyenne de la nicotine est d'environ 1200 mL/min. Les clairances de cotinine et de trans-3'-hydroxycotinine sont plus lentes et se situent en moyenne à environ 45 mL/minute et 82 mL/min, respectivement (Hukkanen et al., 2005) avec une demi-vie de 17 h en moyenne (Benowitz, 1996). C'est pour cette cause que le dosage de cotinine dans le sang est utilisé comme évaluation.

En effet, plusieurs études précliniques ont utilisé ce marqueur biologique pour évaluer l'imprégnation en nicotine. Après prise orale en conditionnement opérant, la concentration de cotinine sanguine chez les rats était de 34-41 ng/mL, 3 h après la session de conditionnement opérant (Hauser et al., 2012b). Ces taux sont de 66.2 ± 34.5 ng/mL chez les rats mâles après injections forcées de nicotine le jour suivant les tests en AAIV (Wang et al., 2018b). Chez les fumeurs humains, les taux sanguins de cotinine atteignent 250-300 ng/mL (Benowitz and Jacob, 1994).

6. Différents produits du tabac

a. Tabac fumé

Fumer des cigarettes conventionnelles est un mode de consommation efficace pour former des associations entre la prise de drogue et ses effets puisque, après inhalation de la fumée de cigarette, la nicotine avec les autres substances de la fumée de cigarette, atteignent rapidement les poumons

puis la circulation sanguine et le cerveau en moins d'une quinzaine de secondes (Berridge et al., 2010; Feyereabend et al., 1985). L'arrivée de la nicotine au cerveau lui permet d'exercer ses effets centraux. Ceci conduit à l'activation du système de récompense dopaminergique et produit des effets renforçants rapides (Hukkanen et al., 2005). Le fumeur peut alors expérimenter de façon instantanée, les effets centraux et périphériques dûs à l'absorption de la nicotine et des produits qui lui sont associés. Cette voie permet aussi la titration du fumeur qui inhale selon sa fréquence personnelle, ses habitudes et son besoin en drogue, ceci afin de maintenir une certaine concentration sanguine en drogue. Cela fait du tabagisme la forme d'administration de nicotine la plus renforçante et la plus addictive sauf que ce mode de consommation du tabac (brûlé) cause la mort d'un utilisateur sur deux puisque la combustion génère beaucoup de molécules toxiques et cancérogènes tels que les goudrons, benzènes, métaux lourds et autres.

b. Tabac non-brûlé

i. Cigarette électronique (e-cig) et produits de vapotage

1. Présentation générale

En 2003, la première cigarette électronique (e-cig) a été développée en Chine et commercialisée avec succès, dès 2007 aux États-Unis, dans le but d'aide à l'abstinence et comme alternative au tabac fumé (Pauly et al., 2007). Elle se compose généralement d'une batterie, d'une cartouche remplie de l'e-liquide et d'un atomiseur. L'ampleur de la production de ces nouveaux produits de vapotage s'est épanouie et la forme a changé autour du même concept (plus que 3 générations jusqu'à ce jour). Aujourd'hui, des millions de consommateurs utilisent régulièrement les e-cig et les nouveaux produits de vapotage dont le nombre de marques commercialisées touche plus de 500 (Zhu et al., 2014). Parmi les nombreux termes utilisés pour décrire les systèmes électroniques d'administration de nicotine (ENDS), on peut citer: les vapes, les vaporisateurs, les stylos à vape, les e-cig et les e-pipes.

Les recharges de l'e-cig sont principalement composées d'un mélange de propylène glycol (PG) et de glycérine végétale (VG), principaux humectants utilisés comme solvants pour la nicotine. Chaque produit dispose d'un taux différent de ces deux composants, puisque chacun confère des propriétés particulières à la vapeur et aux sensations. Le PG est un liquide fluide qui produit peu de vapeur. Il accentue les sensations en gorge et fixe les arômes dans le mélange. La VG est une substance grasse produisant beaucoup de vapeur au chauffage. Les utilisateurs d'e-cig affirment souvent que le PG produit un meilleur «coup de gorge» et a un goût meilleur que le glycérol, alors que le glycérol est beaucoup plus doux que le PG (Cheng, 2014; Etter, 2016a; Li et al., 2016).

Les e-liquides sont aérosolisés lors de l'utilisation du dispositif. Les substances identifiées dans les liquides et les aérosols d'e-cig incluent la nicotine (bien que certains utilisateurs consomment des solutions zéro-nicotine), les solvants humectants (PG/VG), les nitrosamines spécifiques du tabac, les aldéhydes, les métaux, les composés organiques volatils, les composés phénoliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les arômes, les alcaloïdes du tabac et d'autres drogues (le tétrahydrocannabinol (THC) par exemple).

L'utilisation d'e-cig aromatisées est très populaire chez les jeunes et les adultes, même chez les non-fumeurs (3.3% des français selon l'OFDT). La plupart des consommateurs déclarent utiliser une seule catégorie d'arômes, bien que certains consommateurs aient utilisé des mélanges d'arômes. En général, les arômes plus sucrés, tels que les fruits, figurent parmi les catégories d'arômes les plus populaires tandis que les arômes plus amers sont moins courants (Schneller et al., 2018).

Variante d'e-cig : JUUL

Les cigarettes électroniques Juul, conçues en 2015 pour aider les fumeurs adultes à cesser de fumer plus facilement, sont désormais le dispositif de vapotage le plus populaire parmi les adolescents et les jeunes adultes (Juul est moins connu par les adultes). C'est un dispositif ressemblant à une clé USB, qui utilise une batterie (cartouche « pod ») et contient une solution de nicotine (à haut dosage en sels de nicotine), d'arômes et d'autres produits chimiques. Le juuling est un type de vapotage qui transforme une solution de nicotine en une vapeur inhalable sans dégager de la fumée. Chaque cartouche sert pour à peu près 200 bouffées, ce qui est équivalent à une boîte de cigarettes conventionnelles.

2. Arguments en faveur de l'e-cig

Contrairement aux cigarettes à base de tabac combustible, les e-cig ne « brûlent » pas (aucune combustion) et ne contiennent pas la plupart des 7 000 composants chimiques présents dans la fumée de tabac. Ainsi, il est généralement admis dans la population générale que les e-cig sont moins toxiques que le tabac brûlé, même si en les utilisant, l'exposition à la nicotine et à une variété de constituants potentiellement nocifs a lieu. En effet, le remplacement complet du tabac brûlé par des e-cig réduit l'exposition des utilisateurs à de nombreux toxiques et carcinogènes présents dans les cigarettes conventionnelles (Goniewicz et al., 2014). Ceci est confirmé par la mesure de nombreux taux de biomarqueurs et de métabolites (Goniewicz et al., 2017; McRobbie et al., 2015).

Plusieurs essais cliniques et études épidémiologiques longitudinales suggèrent que les e-cig peuvent favoriser l'abandon du tabac, mais des essais cliniques plus développés ne sont pas encore

disponibles (McRobbie et al., 2014). Ainsi, les e-cig sont au moins autant efficaces que les patches de nicotine pour l'abstinence tabagique (Shahab and Goniewicz, 2014) et les fumeurs qui ont utilisé les e-cig pour les aider à arrêter de fumer avaient moins de risque de reprendre la cigarette pour au moins un an, comparé aux patients qui ont utilisé les patches ou les chewing gum de nicotine (Hajek et al., 2019). Une réduction du taux de dépendance à la nicotine et une augmentation de la durée d'abstinence (El Dib et al., 2017; Gonzalez Roz et al., 2017; Hartmann-Boyce et al., 2016), avec une diminution de l'impact du tabac en termes de santé publique (Benowitz and Fraiman, 2017; McRobbie et al., 2015) sont alors observées.

Afin de justifier l'utilisation de ces nouveaux produits chez les adolescents, des hypothèses basées sur le « détournement » proposent que, du fait que les jeunes et les adolescents ont une curiosité exploratrice et de prise de risque, la disponibilité des e-cig leur permet de satisfaire leur curiosité et de rechercher la nouveauté sans avoir recours à des produits du tabac combustible pour satisfaire le désir d'exploration (Etter, 2018) (Kozlowski and Warner, 2017) avec un risque sanitaire moins accentué qu'avec le tabac fumé. Les e-cig sont perçues comme étant plus saines, présentant des arômes et odeurs attrayants, des caractéristiques technologiques intéressantes, et un accès plus facile (Kong et al., 2015 ; Schneider and Diehl, 2016). Jusqu'à ce jour, elles sont mieux perçues que les produits du tabac fumé malgré les vigilances qui se développent sur cette problématique d'attractivité aux jeunes.

3. Arguments contre l'e-cig

Il n'y a pas assez de recul et d'études scientifiques sur les bienfaits des produits de vapotage sur la santé publique et le tabagisme au long terme. Les e-cig sont-elles une voie d'initiation au tabac fumé?

Plusieurs études montrent des résultats non conclusifs (Malas et al., 2016 ; Vanderkam et al., 2016) ou la présence d'un impact sanitaire et d'un risque de transition vers le tabagisme, surtout chez les adolescents et jeunes adultes (Goldenson et al., 2017; Kalkhoran and Glantz, 2016; Schneider and Diehl, 2016). En effet, une grande popularité de ces produits existe parmi les jeunes adultes (McMillen et al., 2015) et la majorité des non-fumeurs qui utilisent des e-cig sont des jeunes et des jeunes adultes (Jamal et al., 2015 ; Kasza et al., 2017). Le problème est qu'une partie importante d'entre eux devient fumeur de tabac combustible après plusieurs années d'usage de l'e-cig (Soneji et al., 2017). Cet effet est validé en préclinique (en AAIV chez le rat) par des études qui pointent sur le fait que l'exposition à la nicotine durant l'adolescence augmente l'AA de cette substance à l'âge adulte (Adriani et al., 2003; Natividad et al., 2013).

L'utilisation chez les plus jeunes non-fumeurs cause une grande problématique en termes de santé publique. La modification de la réglementation constitue un besoin urgent et ceci dans le but de rendre plus apparents les risques des e-cig, mais également de les rendre plus difficiles à acheter, en particulier pour les adolescents, afin de diminuer l'utilisation, spécifiquement chez cette population (Krishnan-Sarin et al., 2019).

Les jeunes citent le plaisir lié au goût/ saveurs et les facteurs sociaux comme motivants de leur vapotage, alors que les adultes utilisent généralement l'e-cig dans le but de réduire ou d'arrêter de fumer (Ambrose et al., 2015 ; Bold et al., 2016). Des effets opposés de l'utilisation de ces ENDS sont alors observés chez les sujets hautement dépendants (réduction du tabagisme) et chez les sujets débutants, ce qui décourage leur utilisation de ces produits. La consommation du tabac devient plus familière et habituelle pour ceux qui ont déjà eu des expériences de vapotage puisque ce mode de consommation du tabac entretient des réflexes partagés avec la cigarette (Wills et al., 2016). Une réflexion intéressante est que, même si les fumeurs de tabac combustible utilisent les e-cig contenant la nicotine dans le but de sevrage tabagique afin de simuler l'acte de fumer, ils ne se débarrassent pas de la dépendance mais réinventent le même problème. La dépendance est décrite comme persistante avec l'usage d'autres produits nicotinisés comme les chewing gums, patches à dose élevée et autres produits (Dunbar et al., 2016 ; Messer et al., 2015; Popova and Ling, 2013).

Ainsi, comparés aux personnes qui utilisent les thérapies de remplacement nicotiques (NRT) pendant au moins 6 mois, celles qui utilisent l'e-cig au cours de cette période semblent avoir une identité de fumeur plus forte. Pour ces utilisateurs qui ont cessé de fumer, les e-cig sont perçues comme plus utiles que les NRT à long terme et semblent plus efficaces pour contrôler les symptômes de sevrage. Cependant, une utilisation continue peut être plus probable puisque les patients aiment davantage leurs produits par rapport aux autres produits de substitutions (Nelson et al., 2015).

4. Risques pathologiques et toxiques des e-cig

Ces produits ne sont pas totalement inoffensifs, en particulier lorsqu'ils sont utilisés par des adolescents, des jeunes adultes ou pendant de longues périodes. On remarque alors des effets sanitaires de l'exposition aiguë ou chronique à la vapeur, liés à la nicotine et/ou aux saveurs.

Le symptôme le plus souvent signalé par les utilisateurs d'e-cig est une bouche et une gorge sèches, considérées comme étant dues à la propriété d'absorption de l'eau du PG et du glycérol. Les effets négatifs ont été reportés en premier lieu au niveau de la bouche, de la gorge et des systèmes respiratoire, neurologique, sensoriel et digestif (Hua et al., 2013).

Chez l'humain, l'exposition à la nicotine provenant des e-cig augmente le risque de maladies cardiovasculaires chez les personnes ayant une ou plusieurs maladies cardiovasculaires préexistantes. Le risque chez les personnes non atteintes de maladie cardiovasculaire est incertain. En effet, des études chez la souris montrent que, comme le tabagisme contribue au développement de maladies cardiovasculaires, l'exposition chronique à la vapeur des e-cig pendant 8 mois, augmente la rigidité artérielle et altère la réactivité vasculaire normale comparé à l'exposition à de l'air filtré (Olfert et al., 2018).

Au niveau pulmonaire, les effets de l'exposition aiguë à la vapeur de l'e-cig, surtout celle qui contient la nicotine, montrent une augmentation de la résistance des voies respiratoires et une diminution des fonctions pulmonaires (Vardavas et al., 2012). Ceci est moins prononcé qu'avec les cigarettes conventionnelles (Flouris et al., 2013). De même, l'exposition à la vapeur résulte en une pression diastolique (Cooke et al., 2015), activité sympathique et stress oxydatif augmentés (Carnevale et al., 2016; Moheimani et al., 2017). Chez la souris, cette exposition induit aussi des symptômes liés au développement de bronchopneumopathie chronique obstructive de façon dépendante de la dose de nicotine (Garcia-Arcos et al., 2016). En effet, les e-cig sont cytotoxiques pour les cellules épithéliales (étude *in vitro*); l'exposition augmente le stress oxydatif au niveau des poumons (Schober et al., 2014; Yu et al., 2016) et l'infection bactérienne, même après de courtes expositions journalières (Lerner et al., 2016; Sussan et al., 2015). De même, Berkelhamer et collègues ont démontré que ni le PG ni le VG n'ont affecté la viabilité de cellules immatures ou adultes mais que l'exposition aux saveurs de menthol et de fraise a augmenté la mort cellulaire pulmonaire (Berkelhamer et al., 2019).

De façon intéressante, l'exposition aux aérosols des ENDS, diminue l'activité métabolique et la viabilité cellulaire, et augmente la libération de facteurs inflammatoires. La comparaison des saveurs de fraise, tabac, piña colada, menthol et café ont montré que l'exposition aux produits aromatisés à la fraise était la plus cytotoxique (Leigh et al., 2016). Les additifs aromatiques rajoutés aux e-liquides peuvent alors avoir un impact sanitaire.

Plus récemment, des cas de lésion pulmonaire (+800 cas) avec plusieurs décès aux États-Unis et dans le monde ont été attribués à l'utilisation des produits de vapotage (contenant la nicotine ou le THC) (Nicotine and Cannabis policy center, 2019).

5. En termes de nicotine

a. Nicotine, individus et dépendance

La population considère ce nouveau mode de consommation de la nicotine moins toxique, et efficace pour promouvoir l'abstinence tabagique. Les recommandations de l'OMS soulignent que

son efficacité en tant que moyen d'abandon est limitée et nécessite plus d'arguments et de recul sur son potentiel addictif (OMS, 2014) (Gonzalez Roz et al., 2017). La plupart des utilisateurs d'e-cig utilisent ces appareils avec nicotine (Etter and Bullen, 2011), et les e-liquides contiennent typiquement la nicotine à des concentrations entre 0-48 mg/mL (Benowitz and Fraiman, 2017). En effet, un nombre croissant d'études suggère que comme la cigarette conventionnelle, les e-liquides contenant de la nicotine favorisent le développement de la dépendance. Les utilisateurs expérimentés d'e-cig arrivent à s'auto-titrer (Dawkins et al., 2016) et les scores de dépendance peuvent être élevés (Johnson et al., 2018). La pratique d'utilisation des e-cig pendant 4 semaines génère des pics de concentration plasmatique et des prises de nicotine plus élevés par rapport à la cinétique lors d'une première utilisation (Hajek et al., 2015). Concrètement, l'exposition à la nicotine à partir d'e-cig est très variable et dépend des caractéristiques du produit (y compris les caractéristiques de l'appareil et de l'e-liquide) et du fonctionnement de l'appareil. Les facteurs pouvant influencer l'absorption et la biodisponibilité de la nicotine délivrée par ces systèmes incluent le pH, la température, la concentration en PG, la concentration de la nicotine et les facteurs liés à l'utilisateur (les bouffées, le niveau d'expérience) (DeVito and Krishnan-Sarin, 2018). Aussi, le PG engendre une diminution des effets aversifs de la nicotine à fortes doses, ce qui participe à la promotion de quantités plus élevées de nicotine (Harris et al., 2018).

Les e-cig (surtout les appareils développés de 3^{ème} génération) peuvent fournir des niveaux de nicotine comparables à ceux des cigarettes fumées (Farsalinos et al., 2014; Hajek et al., 2017), et un profil plasmatique de nicotine similaire à celui des fumeurs de cigarette conventionnelle (Dawkins et al., 2016; St Helen et al., 2016; Wagener et al., 2017). D'autres études suggèrent qu'avec la e-cig, la quantité de nicotine inhalée après vaporisation efficace de 15 bouffées était inférieure à celle d'une cigarette conventionnelle (Goniewicz et al., 2013).

Les taux de cotinine parmi les utilisateurs expérimentés d'e-cig étaient similaires à ceux habituellement observés chez les fumeurs de cigarettes combustibles (Etter, 2016b) (Hecht et al., 2015) (Goney et al., 2016). De même, chez la souris, l'exposition journalière chronique à la fumée de cigarettes conventionnelles ou à la vapeur d'e-cig (aromatisée au cappuccino), montre des taux respectivement équivalents de cotinine urinaire [47.4 ± 16.3 vs. 24.3 ± 0.6 (SD) ng/mL, $p=0.07$] (Olfert et al., 2018).

b. Nicotine et environnement

L'utilisation de l'e-cig augmente les concentrations atmosphériques de particules et de nicotine dans les endroits intérieurs fermés comparé aux niveaux de fond (Chen et al., 2018; Soule et al., 2017). Ceci a un impact sur le tabagisme passif qui continue à exister avec les nouveaux produits

de vapotage. Aussi, il existe des risques d'exposition à la nicotine à partir des e-cig, à cause du dépôt de la nicotine sur plusieurs surfaces (Goniewicz and Lee, 2015).

6. Tabac de mode ?

Les produits présentés ci-dessus constituent d'autres moyens de consommer la nicotine, molécule légale mais qui reste une drogue. Comparé aux produits non aromatisés, la présence de saveurs induit une perception d'attractivité et une réduction de la perception de nuisance (Choi et al., 2012; Pepper et al., 2016). Cette innovation technologique a créé des objets de mode, produits branchés et chic qui attirent les non-fumeurs et notamment les jeunes. De plus, les jeunes sont conscients que les publicités pour les e-liquides aromatisés vise des individus de leur âge (McKelvey et al., 2019). Les études ont montré que la première source d'acquisition de e-cig chez les adolescents était l'effet des pairs (Kong et al., 2017). Parfois, ces produits sont camouflés par d'autres outils trompeurs qui permettent aux plus jeunes de les consommer discrètement en cachant leur utilisation (Allem et al., 2018). Récemment, par exemple, des hoodies de vapotage ont fait apparition sur le marché et attirent les collégiens par leur nouveauté et image de luxe et d'originalité (Fig 4c) : est-ce une porte d'entrée dans le tabagisme ?



Fig.4 : Série de photos illustrant les nouveaux produits de vapotage présentés comme objets de mode, surtout attractifs à la jeune population des non-fumeurs.

ii. « Smokeless tobacco » ou tabac non-fumé

1. Présentation générale

Les produits du tabac non fumé incluent le snus (poudre de tabac que l'on se met entre la joue et la gencive), snuff (tabac inhalé directement par le nez), gommes à mâcher (chewing gums), le

tabac à chiquer (morceau de tabac gardé en bouche pendant plusieurs heures), pastilles de tabac (Camel, Marlboro ou Skoal Sticks, Strips et Orbs), tabac compressé à dissoudre. Ces produits contiennent beaucoup d'additifs (sucres, arômes et huiles) rajoutés afin de rendre le produit plus palatable et masquer le goût amer de la nicotine orale. En Suède, par exemple, la prévalence d'utilisation du tabac non fumé est de 12.3% (Leon et al., 2016).

La nicotine provenant du tabac non fumé à mâcher ou à priser (chewing gum ou snuff) est rapidement absorbée car ces produits sont tamponnés à un pH alcalin ≥ 7 (pour augmenter la nicotine non-protonée, libre et facilement absorbée) (Lisko et al., 2015). Cependant, la concentration sanguine de nicotine augmente progressivement et atteint un plateau au bout de 30 minutes environ. Les taux restent élevés et diminuant lentement sur une demi-vie de nicotine (2 h) ou plus (Hukkanen et al., 2005). L'augmentation des concentrations de nicotine dans le cerveau est plus lente qu'avec le tabagisme fumé, résultant d'une valeur renforçante moindre (Pomerleau, 1992). Ces produits du tabac constituent des alternatives pour un usage clandestin dans des situations où la cigarette fumée ou les produits du tabac sont interdits (Allem et al., 2018).

2. Risques sanitaires du tabac non fumé

Le tabac oral non fumé n'est pas anodin et a un impact sur la santé publique (Ebbert et al., 2007). Plusieurs études ont montré que le tabagisme oral augmente le risque de maladies cardiovasculaires (Boffetta and Straif, 2009; Piano et al., 2010), de syndrome métabolique (Norberg et al., 2006), d'exposition à des substances cancérigènes et de cancer tel que le cancer du pancréas, de la cavité orale, du poumon, et le cancer gastroœsophagien (Boffetta et al., 2008; Hecht et al., 2007; Zendejdel et al., 2008). Les effets cardiovasculaires sont dûs à la stimulation sympathique persistante par la nicotine, à travers l'activation bêta-adrénergique, ce qui accélère le remodelage du tissu du myocarde. Ce remodelage tissulaire (hypertrophie et fibrose) crée une insuffisance cardiaque. L'effet arythmogène de la nicotine est provoqué par la libération de catécholamine, qui peut contribuer à la tachycardie ventriculaire et à la fibrillation. Un effet de complication de grossesse a été aussi montré chez les femmes enceintes qui consomment du tabac non fumé (England et al., 2003).

Aussi, en termes d'addiction, des études certifient que l'utilisation du tabac non fumé constitue un facteur de risque de passage au tabac fumé ou à la consommation chronique et abusive, augmentant ainsi le risque de dépendance (Krishnan-Sarin et al., 2015; Leventhal et al., 2015; Severson et al., 2007).

7. Renforcement lié aux produits de tabac

La nicotine est connue pour avoir des propriétés récompensantes plus faibles que les autres drogues d'abus, la force de l'addiction aux produits du tabac constitue donc un véritable paradoxe. En effet, bien qu'elle soit nécessaire, l'action pharmacologique de la nicotine n'est pas suffisante pour expliquer le potentiel de dépendance élevé du tabac combustible (Rose, 2006). Les facteurs non-nicotiniques associés à la consommation du tabac (par exemple, le goût, l'odorat et les sensations associées à l'acte de fumer) sont essentiels à l'établissement et au maintien de la dépendance (Fagerstrom, 2012). Les fumeurs continueront à fumer des cigarettes dénicotinisées ou des cigarettes à très faible teneur en nicotine pendant de longues périodes (Donny et al., 2015; Donny et al., 2007). Au niveau central, ce tabagisme dénicotiné peut provoquer une libération importante de dopamine dans le circuit de récompense du cerveau des fumeurs de cigarettes conventionnelles mais à des niveaux inférieurs (Domino et al., 2013). Des facteurs et comportements n'ayant pas d'effet pharmacologique direct produisent des symptômes de dépendance et peuvent être associés à une dérégulation des circuits de récompense (Quester and Romanczuk-Seiferth, 2015). Pour ceci, la dépendance au tabac n'est plus considérée une dépendance à la nicotine seulement (Rose, 2006). Le concept de trouble du tabagisme a été ré-étiqueté ; On ne parle plus de dépendance à la nicotine, mais on emploie des termes reconnaissant le rôle des facteurs autres que la nicotine, tels que « dépendance à la cigarette » ou « dépendance au tabac ».

a. Renforcement primaire

La nicotine seule peut servir de renforcement positif chez beaucoup d'espèces animales, les humains inclus. Le renforcement primaire par la nicotine est étudié par l'évaluation de l'action de cette substance et de son potentiel à rendre l'acquisition et la stabilisation du comportement d'AA possible en l'absence de signaux, souvent associés à sa délivrance dans les études. Plusieurs expériences précliniques ont validé les propriétés renforçantes primaires de la nicotine mais ont démontré que le comportement n'atteint pas les niveaux et la modulation obtenus avec les signaux associés à l'AA. L'acquisition est plus lente, le nombre d'infusions est faible et le changement des conditions de séances ne potentialise pas le comportement (Caggiula et al., 2002; Chaudhri et al., 2007; Chaudhri et al., 2005; Donny et al., 2003). De même, les propriétés renforçantes primaires de la nicotine ont été démontrées dans un modèle d'acquisition sociale de d'AAIV de nicotine où cette molécule, associée avec un stimulus de type goût aversif, la quinine, a montré des nombres d'infusions similaires à son association à une substance appétitive, la saccharine (Wang et al., 2016). C'est donc son action pharmacologique qui guidait le comportement.

b. Renforcement secondaire

La littérature sur le tabac combustible démontre que l'effet direct de la nicotine sur le système nerveux central compte seulement pour une partie de la valeur renforçante de l'action de fumer (Rose, 2006). Les études cliniques et précliniques sur la dépendance à la nicotine mettent de plus en plus la lumière sur le rôle des stimuli non-pharmacologiques associés à l'effet pharmacologique de la nicotine et à l'usage des produits du tabac (Rose et al., 1993; Rose and Levin, 1991).

En effet, plusieurs études ont eu pour but de dissocier le renforcement primaire du renforcement secondaire de la nicotine en AAIV (Palmatier et al., 2006; Palmatier et al., 2019), en utilisant généralement des stimuli visuels (Chaudhri et al., 2006b; Guillem and Peoples, 2011; Vandaele et al., 2018). Ainsi, par le fait d'être associés à la nicotine, ces stimuli gagnent en salience et valeur incitative (Robinson and Berridge, 1993) (Olausson et al., 2004). Des études précliniques montrent une augmentation par la nicotine des effets renforçants du sucrose ou des signaux associés au sucrose (Grimm et al., 2012; Smith and Roberts, 1995). De même, les injections SC de nicotine augmentent les propriétés hédoniques gustatives du sucrose chez les rats naïfs à la nicotine et ceci par une augmentation du nombre des réactions orofaciales positives (Parker and Doucet, 1995).

Plus spécifiquement, l'AA de la nicotine est dépendante des signaux qui lui sont associés (Reisiger et al., 2014). Ces signaux procurent un plaisir et pourraient contribuer à l'acquisition et au maintien de la dépendance (Pickworth et al., 2002). Lorsque l'administration de nicotine par voie IV est associée à d'autres stimuli sensoriels non pharmacologiques agréables ou palatables (un son, du saccharose), les rats acquièrent plus facilement l'AA de nicotine par rapport à une AA limitée en l'absence de signaux (Caggiula et al., 2002; Caggiula et al., 2009). De façon intéressante, ces signaux environnementaux préalablement associés à la nicotine, ont pu maintenir le comportement d'AA pendant plusieurs semaines, même en l'absence de nicotine (Cohen et al., 2005).

En effet, le rôle des signaux contextuels et environnementaux est important dans l'addiction au tabac. Chez les fumeurs humains, la présentation de ces signaux préalablement associés à la nicotine mène à la rechute (Shiffman et al., 1996). Ainsi, le potentiel de dépendance aux produits du tabac dépend des variables contextuelles concomitantes à l'administration de nicotine. La combinaison de stimuli conditionnés au tabagisme (par exemple, le goût, les odeurs, le signal visuel et les sensations au niveau de la gorge ainsi que les gestuels) avec le fait de consommer du tabac engendre une synergie qui, potentiellement, augmentera la dépendance aux produits du tabac. Chez les fumeurs, l'expérience sensorielle due à la fumée de cigarette (surtout les arômes provenant de leur marque de tabac régulière) (Rose and Behm, 2004) a augmenté le plaisir et engendré une satisfaction, même lors de la consommation de cigarettes dénicotinisées (Perkins et al., 2001). Les sensations plaisantes (goût, odeur, stimulation des voies respiratoires supérieures)

associées à la prise volontaire du tabac jouent alors un rôle dans le renforcement lié au tabagisme (Shiffman et al., 2013); les fumeurs apprécient les sensations au niveau de la voie orosensorielle.

Cette hypothèse est renforcée par l'émergence de l'e-cig -forme orale et moins brûlée- où la nicotine est associée à des arômes et facteurs de goût très variés. Est-ce que de la même façon, la nicotine va augmenter la valeur des stimuli gustatifs associés, potentialisant le phénomène de l'addiction ?

c. Rôle des additifs du tabac

De façon intéressante, la nicotine, confirmée molécule addictive du tabac (Stolerman and Jarvis, 1995), n'existe pas seule dans les produits et est quasiment partout associée à des additifs ou produits de métabolisme pouvant aussi contribuer à la dépendance aux produits du tabac (Clemens et al., 2009). Jusqu'à ce jour, plus de 8000 additifs sont répertoriés. Ces additifs peuvent avoir plusieurs rôles :

- amélioration de l'odeur de la fumée ou vapeur de cigarette
- augmentation de l'absorption en agissant sur le pH
- augmentation des sensations au niveau de la gorge en diminuant l'irritation de la nicotine
- agents de texture
- humectants
- édulcorants et saveurs: Les e-liquides disponibles sur le marché contiennent de nombreux additifs destinés à augmenter la palatabilité et à diminuer l'expérience sensorielle aversive de la nicotine.

Certains composants alimentaires et additifs jouent un rôle dans la médiation des enzymes impliquées dans le métabolisme de la nicotine. Aussi, la combustion du tabac engendre une multitude de réactions constituant de nouveaux produits chimiques nocifs pour la santé. En effet, les composants pharmacologiques non nicotiniques de la fumée de tabac peuvent également contribuer à l'addiction au tabac combustible et à ses propriétés psychoactives par augmentation de la concentration de dopamine (par diminution de son métabolisme) au niveau du système de récompense. Parmi ces composants, on retrouve les inhibiteurs de la monoamine oxydase (enzyme dégradant la dopamine recapturée), l'acétaldéhyde (renforçant par lui-même et auto administré) et autres additifs/alcaloïdes du tabac (Clemens et al., 2009 ; Guillem et al., 2005 ; Hoffman and Evans, 2013 ; Peana et al., 2010). La fumée de cigarette se compose alors de plus de 9000 composants, dont 400 sont connus pour être nocifs pour la santé, causant entre-autre cancer (70 substances connues) et maladies cardiovasculaires. Les vapeurs des e-cig peuvent aussi contenir des substances toxiques ou impactant la dépendance.

De nos jours, la sous-estimation du rôle des additifs à la nicotine dans le renforcement tabagique rend plus difficile l'évaluation des produits du tabac et des produits substituants.

i. Flaveurs

Jusqu'à ce jour, il existe plus de 7000 arômes de liquides de l'e-cig (Marynak et al., 2017; Zhu et al., 2014), et pourtant, peu d'études examinent l'exposition à ces arômes. Les additifs aromatiques contenus dans tous les produits du tabac et de l'e-cig sont familiers et agréables au goût, et sont généralement associés à des récompenses, comme le sucre et les pâtisseries (la vanille, menthe, fraise, cerise, cacao, ...). La plupart des arômes sont désignés par la FDA comme généralement reconnus comme sûrs (GRAS), mais ces désignations sont destinées à la consommation orale dans les aliments et ne s'appliquent pas aux arômes utilisés dans les e-cig, qui vont être chauffés et vaporisés ; la plupart d'entre eux n'ont jamais été étudiés pour déterminer leur toxicité par inhalation. Ces arômes peuvent être à l'origine des produits de dégradation par chauffage tels que les furannes et les aldéhydes (Soussy et al., 2016) pouvant provoquer une irritation des voies respiratoires (Tierney et al., 2016).

Les études existantes montrent que les produits aromatisants peuvent contenir de l'alcool, des mélanges de terpène, d'aldéhyde et des produits chimiques connus pour être toxiques tels que le diacétyl et le benzaldéhyde, pouvant causer des lésions pulmonaires. De même, le cinnamaldéhyde, trouvé dans les flaveurs à la cannelle, a été démontré cytotoxique *in vitro* (Barrington-Trimis et al., 2014; Behar et al., 2014).

La présence des flaveurs dans les produits du tabac est liée à une perception plus plaisante (Soule et al., 2016a), une réduction de la perception de danger et de toxicité comparé aux cigarettes combustibles (Pepper et al., 2016) et une initiation de la e-cig chez les jeunes (Zare et al., 2018). Les études suggèrent que ces flaveurs utilisées pour créer des arômes sucrés d'e-liquide peuvent plaire aux jeunes (Villanti et al., 2013). En effet, les études montrent que les produits du tabac à arômes sucrés sont largement utilisés par les jeunes et fumeurs débutants (Klein et al., 2008 ; Minaker et al., 2014). En plus, comparé aux adultes, les adolescents préfèrent plus les e-liquides fruités, saveur alcool ou autres alors que les adultes sont plus attirés aux goûts tels que le tabac, menthol, café et épices (Morean et al., 2018). Le nombre total d'arômes préférés a été associé à un nombre plus élevé de jours de consommation d'e-cig chez les jeunes adolescents. Villanti et collègues démontrent aussi que les produits du tabac aromatisés attirent les jeunes utilisateurs et servent comme premier maillon de la chaîne, conduisant à l'initiation de l'utilisation du tabac conventionnel (Villanti et al., 2017a).

Ce qui est inquiétant est que plusieurs études ont montré l'existence d'arômes là où ils ne sont pas mentionnés. Des produits chimiques aromatisants tels que la vanilline et l'éthylvanilline ont été identifiés (Tierney et al., 2016). Aussi, l'analyse de 54 e-liquides identifie l'éthylvanilline dans 13 échantillons et la thuyone dans 2 échantillons. D'autres produits chimiques aromatisants ont également été mesurés dans les e-liquides. Par exemple, du l'eucalyptol a été trouvé dans des e-cig mentholées. De plus, 40% des produits non mentholés testés dans l'étude présentaient de faibles niveaux de menthol (Lisko et al., 2015).

Autre que leurs effets sur le goût, les saveurs peuvent avoir des effets pharmacologiques par eux même. Le menthol par exemple, aromatisant utilisé depuis longtemps dans les cigarettes conventionnelles et récemment dans les cigarettes électroniques, inhibe modérément le CYP2A6. Des études montrent une inhibition du métabolisme de la nicotine en cotinine et de la glucuroconjugaison après avoir fumé des cigarettes mentholées comparé aux cigarettes non mentholées (Benowitz et al., 2004; Hukkanen et al., 2005). Chez la souris, l'administration IP du menthol réduit significativement la clairance de la nicotine et augmente l'intensité du syndrome de sevrage précipité par la mécamylamine. De même, la co-administration du menthol et de la nicotine, et même du menthol seul augmente l'expression des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ du nAChR au niveau de l'hippocampe, PFC et striatum des souris (Alsharari et al., 2015).

ii. Sucre/édulcorants

Parmi les additifs les plus utilisés dans les produits de tabac et autres produits de consommation se trouve le sucre, édulcorant ajouté afin d'augmenter la palatabilité des produits du tabac et masquer le goût aversif de la nicotine. En effet, les interactions du sucre avec la nicotine sont bien validées. Smith et Roberts, ont utilisé cette substance (0-10 % sucrose) pour permettre la consommation orale volontaire de la nicotine chez le rat (Smith and Roberts, 1995). Les expériences d'administration de choix entre plusieurs bouteilles montrent que le sucre est capable de masquer le goût aversif de la nicotine et entraîner une augmentation proportionnelle de la consommation de la nicotine rendue palatable par des concentrations de plus en plus élevées de sucrose (consommation de 70 $\mu\text{g}/\text{jour}$ de nicotine dans l'eau contre 260 $\mu\text{g}/\text{jour}$ de nicotine dans du sucrose 6 %). Dans l'autre sens, la nicotine diminue la palatabilité du sucrose dans ces expériences puisque la préférence des solutions sucrées contenant la nicotine ne dépassait jamais celle de la solution sucrée dépourvue de nicotine en administration bouteille. Par contre, le sucre a permis aux rats de s'auto administrer la nicotine en cage opérantes et les résultats ont montré que les solutions nicotinisées étaient hautement préférées et avaient des propriétés plus renforçantes que les solutions sucrées seules au cours du conditionnement (Smith and Roberts, 1995).

Dans les tests de palatabilité chez les rongeurs, le sucre constitue une solution fortement appétitive avec des réactivités orofaciales positives et caractérisation de réactions ingestives/hédoniques (Smith et al., 1976; Spector et al., 1998). Parker et Carvel ont montré que l'ajout de la nicotine (1 mg/Kg) diminuait les réponses orofaciales positives déclenchées par le sucrose (0.5 M) mais qu'elle n'augmentait pas les réactions de rejet (Parker and Carvell, 1986).

Le sucre est aussi très utilisé pour masquer le goût amer de produits autre que la nicotine, les médicaments pour enfants et adultes par exemple (Mennella and Bobowski, 2015). Des essais cliniques associant le sucre à des agents aversifs par voie orale montrent une réduction du score d'amertume d'agents comme la caféine, l'urée, le propylthiouracil (PROP) et la quinine. Cette dernière est hautement utilisée en expérimentation animale et connue pour provoquer des réactions aversives par les tests de réactivité au goût (Grill and Norgren, 1978; Naneix et al., 2016). L'ajout du sucre résulte alors en un changement du goût et une augmentation de la palatabilité du produit, surtout chez les enfants (Mennella et al., 2013). Ces arguments justifient en partie l'utilisation des additifs sucrants dans les produits du tabac, d'un côté pour masquer le goût aversif de la nicotine et d'un autre pour jouer le rôle d'émulsifiant ou de gélifiant dans les liquides de l'e-cig par exemple. Le snus et snuff, produits du tabac non-fumé, sont aussi généralement consommés avec des agents sucrants de haute intensité (Miao et al., 2016).

Le sucre est de plus en plus étudié comme renforçateur et des études montrent que, quand les animaux sont donnés le choix entre une drogue (cocaïne) et des solutions sucrées, ces dernières l'emportent (Ahmed, 2010). L'industrie du tabac a, depuis longtemps, utilisé les sucres pour augmenter la stabilité des produits et créer leur identité propre, en plus des saveurs pour viser la population jeune (Carpenter et al., 2005). En effet, des études précliniques ont montré que le goût constituait un déterminant important de la consommation volontaire du tabac (Ksir, 1983; Robinson et al., 1996). En plus, le sucre est souvent associé à d'autres saveurs et arômes volatils pouvant contribuer à la suppression de l'amertume (Isogai & Wise, 2016), l'augmentation de la perception du goût sucré, de l'acceptabilité, de la palatabilité, et de la consommation par la suite. Dans les e-cig, les jeunes choisissent les e-liquides ayant ce profil sucré et les plus vieux apprécient les goûts associés à de fortes perceptions sensorielles (Morean et al., 2018).

iii. Effets renforçateurs de l'arôme ou du tabagisme aromatisé

1. Présentation générale

De plus en plus aujourd'hui, les données de la littérature clinique et préclinique confirment que les saveurs sont plus que des saveurs dans les produits du tabac et peuvent influencer la prise de nicotine et ses effets psychostimulants. En effet, plusieurs études ont montré un rôle important des

flaveurs dans l'initiation et le maintien du tabagisme fumé. Ainsi, l'ajout de flaveurs perçues comme sucrées (arômes fruités et vanille par exemple), a été réglementé en septembre 2009 par la FDA (Food and drug administration, FSPRCA, 2009) pour les cigarettes conventionnelles combustibles, vu leur attractivité aux plus jeunes le menthol a aussi été interdit (Klein et al., 2008; Oliver et al., 2013).

Ces restrictions ne s'appliquent pas encore aux produits du tabac non fumé, ni aux nouveaux produits de vapotage, les e-cig spécifiquement, où ces flaveurs sont largement présentes. Ainsi, au quotidien, sont introduites sur le marché de nouvelles combinaisons de flaveurs. La présence d'additifs aromatisants caractérisants pourraient alors attirer les fumeurs et les non-fumeurs, les adolescents en particulier (McMillen et al., 2015). En effet, après la curiosité, les flaveurs ont été rapportées comme raison principale de l'initiation de l'utilisation de l'e-cig parmi les adolescents et associées à une fréquence d'utilisation plus haute (Kong et al., 2015; Patrick et al., 2016).

Des études cliniques ont montré que les participants fournissent un travail plus important pour les bouffées d'e-cig aromatisées par rapport aux e-cig non aromatisées: les arômes ont augmenté la valeur récompensante appétitive du vapotage chez les jeunes adultes (Audrain-McGovern et al., 2016). De même, dans une étude sensorielle utilisant les e-cig, les utilisateurs de liquides aromatisés type « Piña Colada » et « Vivid Vanilla », décrivent des sensations plus plaisantes et moins amères comparé à des liquides saveurs « tabac » (Kim et al., 2016a). Ainsi, l'amertume et l'irritation dues à la nicotine et qui ont un impact négatif sur le côté plaisant de l'e-cig, sont améliorées par les flaveurs qui confèrent un goût sucré et/ou une fraîcheur. Rao et al., ont aussi montré une amélioration de la perception plaisante du mélange PG-VG par l'ajout de la vanilline et de l'éthyl maltol, ainsi qu'une augmentation de la perception sucrée par l'ajout d'arômes fruités (Rao et al., 2018). Dans d'autres études de cartographie parmi les vapoteurs, 5 « clusters » sur l'utilisation des flaveurs ont été identifiés : augmentation de la satisfaction et du plaisir, personnalisation du mélange d'e-liquide (blend), sensations et goût améliorés par rapport à la cigarette conventionnelle ou à des liquides non-aromatisés, suppression de l'appétit et impact sociaux (Rao et al., 2018; Soule et al., 2016a).

2. Menthol

Bien que le rôle du menthol dans les e-cig soit mal connu, ses effets sur l'augmentation des effets renforçants de la nicotine sur le tabagisme ont été mis en évidence par plusieurs études cliniques et précliniques (Ahijevych and Garrett, 2010). Les propriétés du menthol comprennent le refroidissement et l'anesthésie/analgésie (Macpherson et al., 2006), ainsi que des effets sur l'absorption et le métabolisme de la drogue, la broncho dilatation et les modifications de la respiration (Ahijevych and Garrett, 2004; Fagan et al., 2016). Les consommateurs ont une

appréciation accrue des produits mentholés par rapport aux liquides sans menthol (Rosbrook and Green, 2016). Des effets sensoriels de la nicotine et du menthol ont été rapportés, suggérant que le menthol augmente la sensation de fraîcheur et diminue l'irritation des voies aériennes supérieures, résultant en un attrait subjectif augmenté et indépendant de la concentration du produit en nicotine. Pour les fumeurs de tabac mentholé, une plus grande exposition à la nicotine et aux particules de la fumée de cigarette (goudron) a été observée et peut entraîner une dépendance accrue à la nicotine et une vulnérabilité aux maladies attribuables au tabac (Garten and Falkner, 2004). Aussi, le menthol facilite l'initiation au tabagisme et la dépendance accrue à la nicotine (Hersey et al., 2006; Nonnemaker et al., 2013). Tout ceci explique en partie pourquoi le menthol est l'un des arômes les plus préférés dans les e-liquides (McQueen et al., 2011).

Le menthol se lie et module la fonction des nAChRs et l'administration du menthol seul suffit à up-réguler ces Rs et facilite les comportements liés à l'addiction à la nicotine (Ashoor et al., 2013; Henderson et al., 2017; Henderson et al., 2016; Wickham, 2015). Ainsi, il augmente les effets renforçants de la nicotine chez les rongeurs (Biswas et al., 2016). Cet arôme facilite la libération de dopamine par la nicotine au niveau du Nac du rat (Zhang et al., 2018). En effet, Wang et collègues ont proposé que le menthol par voie orale peut agir en tant que signal conditionné (*conditioned cue*) quand il est associé à la nicotine (Wang et al., 2014). Leurs résultats montrent une augmentation de l'AAIV de nicotine due à l'activation du R TRPM8, responsable de la sensation rafraichissante (Voets et al., 2004) et du renforcement conditionné obtenu avec le menthol.

3. Arômes sucrés

Une étude par imagerie fonctionnelle a montré que les publicités sur la e-cig arôme sucré ou fruité ont déclenché une augmentation plus importante de l'activité du Nac comparé à des e-cig goût tabac ou des images de pâtisseries et fruits (Garrison et al., 2018). Ceci démontre l'effet important de ces saveurs conditionnées au produit sur le système de récompense. Non seulement ces saveurs peuvent être récompensantes mais elles aident à la promotion du tabagisme (surtout fumé d'après les études jusqu'à ce jour), en générant aussi des acides qui neutralisent l'irritation de la fumée de cigarette. De même, les sucres génèrent de l'acétaldéhyde, qui a des propriétés addictives et agit de façon synergique avec la nicotine chez les rongeurs (Belluzzi et al., 2005; Cao et al., 2007); Pour revue voir (Talhout et al., 2006).

Chez le rat, l'ajout de menthol ou de saccharine a augmenté la consommation orale de nicotine dans un modèle de choix libre entre deux bouteilles (Wickham et al., 2018). Ceci soulève la possibilité que les arômes appétants dans les produits du tabac puissent également augmenter la consommation chez les nouveaux utilisateurs de produits du tabac, entraînant ainsi une plus grande

exposition à la nicotine. D'autres études ont investigué le rôle du goût sucré et ont montré que les solutions sucrées produisaient un indice de risque d'abus significativement supérieur pour chaque index par rapport aux solutions non sucrées et sans arômes. Les effets au niveau de la gorge étaient plus élevés pour la nicotine que pour le placebo, mais n'augmentaient pas de manière significative la vulnérabilité d'abus. La perception sucrée est associée positivement à l'évaluation d'abus. Une étude clinique par Goldenson et al. (2016) a montré que les e-liquides produisant une perception augmentée de la saveur sucrée, augmentaient l'attrait aux e-cig (Goldenson et al., 2016a). En effet, ces caractéristiques des nouveaux produits du tabac sont incriminées dans la modification des effets sensoriels et de la perception de la saveur sucrée, l'attractivité et l'utilisation des e-cig, chez les jeunes adultes surtout (Miech et al., 2017; Miech et al., 2016). L'exposition à des e-cig contenant des saveurs sucrées est plus renforçante du comportement et de l'attractivité que celle aux e-cig non aromatisées (Kroemer et al., 2018). Mesurée par IRM fonctionnelle, la réponse aux signaux visuels et odorants sucrés provoque une activation plus forte au niveau du Nac avec une magnitude corrélée avec le changement de la perception hédonique (*liking*). Par contre, les indices visuels et olfactifs prédisant la nicotine seule ne provoquent pas une réponse particulière du Nac.

Des études précliniques utilisent le sucrose comme renforçateur à associer avec la nicotine dans des modèles de prise simultanée (Panlilio et al., 2015). Dans ces études, la nicotine est administrée par voie intraveineuse et le rat avait accès à deux leviers, chacun associé avec la nicotine ou le sucrose en pellets. Cette possibilité de prise a montré que les rongeurs s'auto-administrent la nicotine, même si une autre récompense palatable et plaisante est disponible. Cette préférence des drogues aux agents renforçant mais non-drogues a été associée cliniquement au niveau individuel de dépendance et à la vulnérabilité à la rechute (Perkins and Karelitz, 2013).

Peut-être que l'addiction aux produits de tabac n'est pas qu'une addiction à une substance mais à plusieurs substances à effet synergique, voire même une addiction comportementale, favorisée par des gestuels, des signaux, des facteurs environnementaux et épigénétiques, dont on ne peut contrôler que peu. Ces signaux, ayant préalablement acquis une valeur positive ou négative dans notre vie, peuvent influencer notre comportement de prise de tabac en le renforçant ou en l'inhibant. De même, l'effet renforçateur de la nicotine sur les stimuli qui lui sont associés, permet un plus grand risque d'initiation au cycle de dépendance.

II. Principaux modèles d'étude de la nicotine en expérimentation animale

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les produits du tabac agissent et dans le but de décortiquer les différentes composantes de cette addiction, des recherches précliniques, notamment chez les rongeurs et les singes, ont pu modéliser l'effet renforçant de la nicotine. Ceci a été possible parce que l'ensemble des drogues abusées par l'humain le sont aussi par l'animal,

nicotine incluse. Ainsi, des primates ont été entraînés à fumer des cigarettes et à titrer leur prise orale de nicotine (Glick et al., 1971; Rogers et al., 1985) et les rongeurs ont permis d'explorer les effets de la nicotine, principal ingrédient actif responsable de l'addiction au tabac, par d'autres méthodes expérimentales.

1. Auto-administration intraveineuse (AAIV)

La majorité des études précliniques utilisent le paradigme de conditionnement opérant pour étudier le renforcement par la nicotine, généralement administrée par voie intraveineuse, méthode par laquelle le renforcement de la nicotine a été démontré chez plusieurs espèces animales (Goldberg et al., 1981; Rose and Corrigall, 1997), y compris l'humain (Henningfield and Goldberg, 1983a, b; Henningfield et al., 1983). Cette voie d'AA de nicotine mime la consommation par inhalation chez les fumeurs et permet la mesure du renforcement de cette drogue.

Ce paradigme permet la délivrance de la drogue liquide de façon contingente à la réponse opérante et l'étude de la consommation volontaire. Même par cette voie où l'action pharmacologique est rapide, les effets renforçateurs primaires de la nicotine sont modestes. Pour amplifier cet effet, l'association de stimuli non pharmacologiques contingents à l'administration de nicotine est très commune ; la liste inclut des stimuli visuels (signal lumineux) (Donny et al., 2003), auditifs, olfactifs et gustatifs (Wang et al., 2016). L'AA peut même ne reposer que sur les stimuli et quand la nicotine est présente, des interactions complexes entre la nicotine et ces signaux existent, décelant le rôle de la nicotine dans le renforcement (Chaudhri et al., 2006b).

2. Auto-administration orale (AAO)

L'AAO est une méthode plus simple que la voie intraveineuse ou à travers des injections puisqu'elle ne requiert pas des méthodes chirurgicales compliquées et ne met pas en jeu les pertes causées par des cathéters intraveineux non-fonctionnels ou problèmes liés à la chirurgie. Les animaux peuvent alors être suivis pendant de plus longues périodes expérimentales. Avec la nicotine, ceci devient plus compliqué, vu le goût amer aversif de cette substance par la voie orale. Effectivement, les animaux ne s'auto-administrent pas la nicotine seule (même à des concentrations faibles de 5-10 µg/mL ; (Smith and Roberts, 1995)) et si le goût n'est pas rendu palatable, il reste encore difficile de modéliser les effets propres à cette drogue au niveau comportemental (Flynn et al., 1989). De ce fait, des protocoles basés sur la privation hydrique ou des concentrations très faibles (3-8 µg/mL), indétectables ont été employés afin de modéliser la prise orale de nicotine avec ses effets post-ingestifs (Biondolillo et al., 2009). De même, la nicotine est généralement dissoute dans des solutions sucrées ou très palatables afin de masquer ses propriétés aversives (Fowler and Kenny, 2014 ; Robinson et al., 1996). Ce mode d'administration

a bien prouvé les propriétés de renforcement secondaire de la nicotine. En effet, les solutions nicotinisées étaient généralement plus renforçantes que les solutions contrôle. L'AA de nicotine (0.06 mg/mL) a été aussi possible après privation hydrique des rats et une réduction de ce comportement a été observé par injection de la mécamylamine, antagoniste cholinergique (Glick et al., 1996). Hauser et collègues (Hauser et al., 2014) ont aussi investigué un modèle de co-administration de la nicotine et de l'éthanol chez le rat, ces deux substances étant fréquemment co-consommées chez l'humain. Pour ce faire, la nicotine (0.07 et 0.14 mg/mL exprimés en nicotine tartrate) était dissoute dans une solution de saccharine à 0.025%. Cette expérience a permis d'atteindre des consommations de nicotine comparables à la consommation en AAIV (1 mg/Kg/session) (Le et al., 2006; LeSage et al., 2002; Rezvani et al., 2010) ou à la consommation humaine chez les fumeurs modérés (Benowitz and Jacob, 1994). Ainsi, la prise orale en accès libre, même avec des concentrations de l'ordre de 25 µg/mL dans l'eau, contribue à des taux plasmatiques de nicotine comparables aux taux (10-60 ng/mL) chez les fumeurs humains chroniques (Gourlay et al., 1997; Rowell et al., 1983).

Chez la souris, l'exposition chronique à la nicotine orale (100 µg/mL) a aussi été rendue possible suite à la dissolution de la nicotine dans une solution de saccharine 2% (Mesa-Gresa et al., 2013). Les études précliniques ont montré que la nicotine consommée à ces concentrations été capable d'induire des changements du comportement et des taux détectables de cotinine (Caldarone et al., 2008; Klein et al., 2004). L'AAO a été et est encore limitée par plusieurs facteurs dont le goût aversif ; une augmentation de la concentration de nicotine dans les solutions non aromatisées utilisées se voit difficile sans privation hydrique préalable.

3. Préférence de place conditionnée

Les animaux préférant des environnements préalablement associés à des stimuli ayant des propriétés motivationnelles positives, ce paradigme permet le choix entre deux compartiments dont l'un a été associé à la drogue. Les résultats obtenus avec la nicotine sont hétérogènes (Le Foll and Goldberg, 2005). Vu les propriétés aversives de la nicotine avant l'installation de la tolérance et de la dépendance, l'injection de cette substance a démontré un comportement d'évitement des contextes conditionnés à la nicotine par les rats (Kumar et al., 1983; Rinker et al., 2008). Malgré l'aversion, la nicotine induit une préférence de place conditionnée chez les rongeurs et ceci pour différentes doses (Le Foll and Goldberg, 2005 ; Shoab et al., 1994). Aussi, la comparaison de la réactivité à la nicotine a révélé que l'âge des rongeurs peut être un déterminant important des effets renforçateurs de la nicotine. L'aversion due aux fortes doses de nicotine est absente chez les rats adolescents qui développent une préférence de place conditionnée plus large par rapport aux adultes (Belluzzi et al., 2004 ; Kota et al., 2007).

III. Importance de la voie orale

La rapidité d'absorption et de distribution de la nicotine est positivement corrélée à l'abus (Benowitz, 1990; Henningfield and Keenan, 1993) ; ainsi, la voie d'administration et la dose de nicotine influencent l'entrée centrale de la nicotine et ses effets pharmacologiques et addictifs (Hukkanen et al., 2005). La voie orale est la voie la plus rapprochée (après l'inhalation), du mode de consommation de tabac chez l'humain. Cette voie est de plus en plus valide de nos jours puisqu'elle permet de répondre à des questions authentiques, surtout avec l'émergence, depuis maintenant 10-15 ans de l'e-cig et des nouveaux produits de vapotage où il y a une moindre absorption pulmonaire mais au contraire, un passage augmenté au niveau oral, avec le dépôt de la vapeur et des particules aérosolisées dans la cavité buccale.

En plus, ces nouveaux modes de consommation du tabac font entrer en jeu d'autres stimuli sensoriels forts associés à la nicotine, et pouvant impacter son action et sa perception. Ceci s'applique aux produits industriels récents dans le monde (et spécialement aux États-Unis) tels que jus, eaux, boissons énergétiques (15% de nicotine), friandises et alcools contenant la nicotine et qui se consomment par voie orale (Nico Water®, NicoShot®, Liquid Smoking®, Camel Orbs® et Camel Strips®). L'étude des effets de la consommation orale de nicotine est alors un besoin immédiat.

L'absorption par la voie orale est plus lente que par l'inhalation ou l'administration par injections ; elle peut être affectée par l'absorption gastrique, le métabolisme hépatique de premier passage. Malgré cette lenteur par rapport à d'autres voies, des études ont montré une augmentation significative des taux de nicotine dans le sang et dans le cerveau après consommation orale ou injection intra gastrique (Hauser et al., 2012a; Katner et al., 2015). Cette lenteur acceptée n'est pas du tout un argument pour démontrer l'innocuité face à l'installation de la dépendance à la nicotine orale puisque des études ont montré une stabilisation de la prise à des taux élevés de nicotine après présentations multiples et répétées de solutions de nicotine chez le rat (Biondolillo et al., 2009; Dadmarz and Vogel, 2003). Des effets pharmacologiques de la nicotine au niveau du cerveau (Nac shell) ont aussi été produits suite à la consommation de liquides nicotinisés (Katner et al., 2015); ce mode de consommation est alors impliqué dans les actions de la nicotine et de son codage.

Paradigme	Doses de nicotine	Références
Exposition sans choix sur une bouteille	0.57- 4.56 mg/Kg/jour 10-20 mg/L 50-500 µg/mL 50-200 µg/mL 0-200 µg/mL 50 µg/mL 50 mg/Kg 50-500 µg/mL	Wenzel and Richards, 1970 Balfour, 1980 Nesil et al., 2011 Tammimaki et al., 2008 Gaddnas et al. 2000 Sparks and Pauly, 1999 Grabus et al., 2004 Manhaes et al., 2008 Nordberg, 1985 Pietila and Ahtee, 2000 Vieyra-Reyes et al., 2008
Exposition en choix sur deux bouteilles	0.0003, 0.006 et 0.012% 10-200 µg/mL 50-100 mg/L 25-100 µg/mL 10 µg/mL 25-200 µg/mL 200 µg/mL 75 µg/mL 50 µg/mL 10-20 mg/L 10-200 µg/mL 200 µg/mL 200 µg/mL 13-28 mg/L	Dadmarz and Vogel, 2003 Klein et al., 2004 ; Maehler et al., 2000 Wickham et al., 2018 Lee et al., 2017 Abreu-Villaça et al., 2006 Caruso et al., 2017 Fan et al., 2016 Glatt et al., 2009 Manhaes et al., 2008 Nesil et al., 2015 Peng et al., 2017 Renda and Nashmi, 2014 Renda et al., 2016 Vieyra-Reyes et al., 2008 Smith and Roberts, 1995
Choix sur 3 ou plusieurs bouteilles	5-8 µg/mL 15-30 µg/mL 5-30 µg/mL	Biondolillo, 2009 Halder et al., 2013 Rourke et al., 2016
Conditionnement opérant	2-64 µg/mL 0.07-0.21 mg/mL 32 µg/mL 10-60 µg/Kg/infusion	Glick 1996 Hauser et al., 2012 Frenk et al., 2017 Chaudhri et al., 2007 Donny et al., 1995, 1998, 1999
Consommation intermittente ou à durée limitée	10 mg/L (session 1-2 hr) 5-30 µg/ml (24h chaque lundi, mercredi et vendredi)	Adriani 2002 Rourke et al., 2016
Consommation binge-like: paradigme drinking in the dark	0.14 mg/mL	Kasten et al., 2016
Minipompes (Alza)	19-62 µmol/Kg	Brioni et al., 1994

Tableau 1 : Tableau non exhaustif des différentes études utilisant différents paradigmes et différentes doses de nicotine afin de décortiquer les effets de la nicotine sur le renforcement et la valeur affective

IV. Système sensoriel

1. Système de la perception du goût

a. Papilles gustatives et innervation

Le goût, déterminant du comportement ingestif, est rendu possible par la présence de papilles gustatives (taste buds) situées dans la cavité orale (sur la langue et le palais), en périphérie et dans de multiples zones du cerveau. Ces papilles sont bien conservées sur le plan phylogénétique, elles contiennent plusieurs cellules gustatives qui étendent leurs projections (microvilli) à travers les pores où le contact avec les molécules dissoutes dans la salive se fait.

Chez la souris, chaque papille gustative est composée de 50-100 cellules à récepteurs au goût (Stone et al., 2002 ; Zaidi and Whitehead, 2006) ce qui suggère que chaque fibre sensorielle est connectée à plusieurs cellules. La question qui se pose et qui reste controversée est si chaque saveur est encodée par des neurones séparés ou non et s'il y a une division topographique spécifique pour chaque saveur au niveau de la langue. Plusieurs études ont démontré qu'une réponse à toutes les saveurs basiques était présente dans toutes les régions de la langue (Chandrashekar et al., 2006). Effectivement, contrairement à ce que l'on peut penser, les données moléculaires et fonctionnelles ont démontré qu'il n'existe pas de carte de la langue et que ces 5 modalités basiques sont perçues sur toutes les régions de la langue (Chandrashekar et al., 2006).

Tomchik et collègues ont montré que, dans les papilles gustatives, certaines cellules à Rs sont programmées, mais pas de façon absolue ($\approx 82\%$), pour une qualité gustative spécifique. Il y a par exemple des Rs au goût qui répondent principalement au sucre, d'autres plutôt à des composés amers et encore d'autres à des saveurs umami (Tomchik et al., 2007). De façon opposée, une étude par imagerie calcique ne montre aucune évidence de populations neuronales séparées qui encodent la distinction entre les saveurs ; jusqu'à 65% de neurones répondent à de multiples goûts et ce pourcentage varie dépendamment de la concentration du stimulus testé (Wu et al., 2015). En effet, plusieurs cellules gustatives expriment des Rs pour plus qu'une saveur (Kim et al., 2003; Kusuhara et al., 2013) et/ou répondent à plusieurs stimuli gustatifs (Gilbertson et al., 2001; Kusuhara et al., 2013; Tomchik et al., 2007).

Ces papilles gustatives de la cavité orale sont innervées par 3 nerfs crâniens VII (facial), IX (glossopharyngien) et X (vague) qui transfèrent le message au cerveau. Le nerf glossopharyngien (IX), qui innerve les papilles gustatives postérieures (1/3 postérieur de la langue), répond aux stimuli gustatifs amers plus que le nerf facial (VII), qui innerve les papilles gustatives sur la partie antérieure de la langue (2/3 antérieurs) et le palais (Frank, 1991; Frank et al., 1983). Dans le cortex gustatif des rongeurs (études chez le rat), l'information provenant de la branche chorda tympani

du nerf VII projette sur le GC antérieur, alors que l'information provenant du nerf IX cible le GC postérieur (Hanamori et al., 1998; Yamamoto et al., 1980). Dans le même sens, le hotspot pour l'apprentissage de l'aversion gustative conditionnée (CTA) est trouvé dans l'insula postérieure (Schier et al., 2014)

La stimulation de ces nerfs confère aussi des informations tactiles, des informations relatives à la température et à la proprioception. Les réactions provoquées par le goût sont intuitives et basées sur des fonctions biologiquement adaptatives dans le but d'acceptation des stimuli nutritifs et le blocage d'ingestion des substances jugées toxiques ou nocives (Mennella and Bobowski, 2015). A ce jour, 5 saveurs de base sont définies au niveau gustatif : Sucré, salé, amer, acide et umami (savoureux, provoqué par un acide aminé, le glutamate) (Smith and Margolskee, 2001).

b. Circuit du goût

Chez les primates, le traitement central de l'information chemosensorielle débute avec la conversion du signal chimique en influx électrique envoyé par les nerfs au noyau du tractus solitaire (NTS). Ainsi, les projections gustatives provenant de la langue et qui synapsent dans le NTS, reprennent des voies ascendantes au thalamus (plus particulièrement la division parvicellulaire du noyau thalamique ventroposteromedial (VPMpc) (Beckstead et al., 1980). Les neurones gustatifs de cette région projettent directement sur la partie rostrale du cortex insulaire et de l'operculum frontal. Des études anatomiques (Pritchard et al., 1986) ont montré que l'insula est considérée comme locus du cortex gustatif primaire et ne comporte pas des neurones olfactifs. Le GC projette sur le cortex gustatif secondaire dans la partie caudale de l'OFC (Baylis et al., 1995), qui contient des neurones gustatifs (Rolls, 2005) et montre des réponses multisensorielles.

Chez les rongeurs, le premier relai gustatif à partir de la cavité buccale et des ganglions gustatifs est le noyau du tractus solitaire (NTS) (Spector and Travers, 2005). Au niveau de cette région, plusieurs groupes de cellules répondent à une stimulation gustative et non mécanique (goût unimodal), alors qu'une petite portion de cellule répond faiblement à la stimulation mécanique uniquement et de façon plus robuste à la stimulation mécanique et au goût (goût/toucher bimodal) (Travers and Norgren, 1995). Après le NTS, les informations sont relayées vers le noyau parabrachial (PbN) (intermédiaire anatomique entre le NTS et le thalamus dans le circuit de traitement du goût (Nakashima et al., 2000; Perrotto and Scott, 1976) d'où 2 circuits gustatifs prennent origine (Norgren and Leonard, 1973). Le premier envoi des synapses (sensorielle-informatives) au cortex gustatif primaire à travers l'aire thalamique gustative (noyau thalamique ventroposteromedial, VPM) et l'autre projette largement dans la partie frontale ventrale, notamment l'hypothalamus, l'amygdale et le BNST, régions impliquées dans la caractérisation affective du stimulus (Berridge, 2009; Norgren, 1976). Les neurones thalamiques répondant au

goût dans la partie ventropostéromediale de ce noyau forment une source importante d'entrées vers le cortex gustatif. En effet, le thalamus gustatif joue un rôle important dans le codage de la qualité gustative et de la palatabilité, en plus dans la prédiction des signaux (Liu and Fontanini, 2015).

Plusieurs études par enregistrement chez le rongeur ont montré que la majorité des neurones impliqués dans le traitement du goût se localisent au niveau de la portion granulaire de l'insula. Les neurones dans la partie agranulaire peuvent aussi faire preuve de réponses gustatives (Ogawa et al., 1992; Ogawa et al., 1990; Yamamoto et al., 1984b, 1985; Yokota et al., 2011). Le cortex gustatif envoie ensuite des sorties sensorielles directes au Nac (Hajnal and Norgren, 2005), structure clé du système de récompense, impliquée dans le codage affectif et dans l'apprentissage de flaveur conditionné (de Araujo et al., 2013) (voir Fig. 5). De même, le GC envoie des projections capables de transporter l'information gustative à deux aires frontales, l'OFC (Baylis et al., 1995; Gutierrez et al., 2006) et le mPFC (Gabbott et al., 2003).

Au cours du temps, le profil de réponse de certaines structures aux stimulations par différentes qualités gustatives peut changer. Ceci est le cas des réponses du NTS et du PbN (Sammons et al., 2016) et peut être dû au changement des entrées sensorielles vers ces structures à cause de la mort cellulaire et du remplacement des cellules avec des Rs au goût (Ohla et al., 2019). Aussi, certains neurones gustatifs du NTS et du PbN sont sollicités par des entrées viscérales et olfactives afférentes (Bereiter et al., 1981 ; Hermann and Rogers, 1985 ; Van Buskirk and Erickson, 1977).

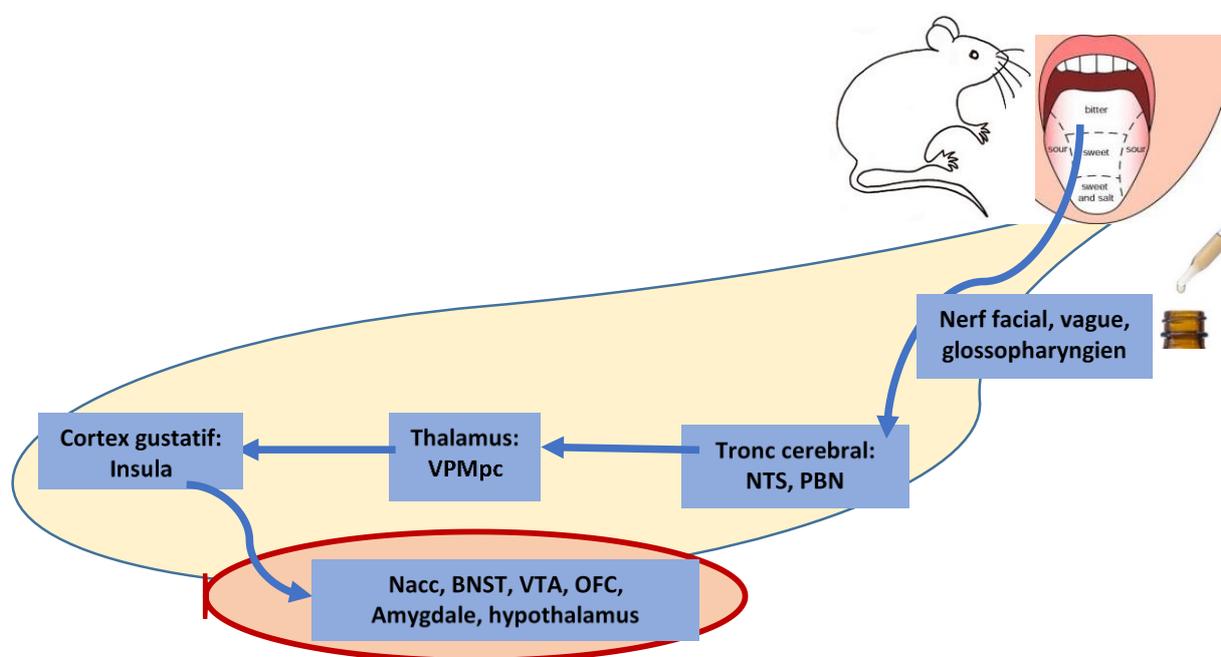


Fig.5 : Circuit du goût chez les rongeurs. Les stimuli engendrent des signaux électriques transmis au tronc cérébral via 3 nerfs majeurs innervant la langue (VII, IX et X). L'information passe ensuite à travers le PbN pour atteindre le thalamus qui envoie ces projections au cortex gustatif insulaire puis au système de récompense et différentes structures d'intégration.

c. Physiopathologie du goût

En clinique, la perception gustative a été étudiée chez des patients avec lésion unilatérale du cortex insulaire. La tâche consistait en l'identification par les patients de la qualité et de l'intensité du stimulus gustatif appliqué de façon séparée à la partie antérieure gauche ou droite de la langue. Les stimuli consistent en des solutions à différentes concentrations (eau, sucrose, NaCl, acide citrique et quinine). Ces tests de reconnaissance des goûts suggèrent que l'information gustative provenant des deux côtés de la langue passe à travers l'insula gauche (séparation hémisphérique ?) (Pritchard et al., 1999).

L'enregistrement électrophysiologique simultané dans le GC et le mPFC chez les rats en activité a montré une modulation de la réponse neuronale du mPFC suite à l'administration passive par injection intraorale de différentes solutions. Cette modulation était plus faible que pour les neurones du GC mais a montré que les stimuli aversifs comme l'acide citrique et la quinine induisaient des réponses plus fortes que celles induites par les solutions appétitives (sucrose et saline) (Jezzini et al., 2013). De plus, les entrées sensorielles provenant de la BLA au GC sont nécessaires pour la représentation de la palatabilité dans le GC. En effet, l'inactivation de la BLA réduit sélectivement la capacité du GC à encoder la palatabilité (Piette et al., 2012). De même, les neurones provenant du cortex responsable du goût sucré projettent sur la BLA antérieur alors que les neurones du domaine cortical amer, projette sur l'amygdale centrale (Wang et al., 2018a).

Les 2 propriétés sensorielles les plus importantes d'un stimulus gustatif sont son identité (qualité) et sa valence. Une séparation des circuits en une logique binaire, sucrée et amère peut permettre l'explication des processus du codage de la valence affective. En effet, depuis quelques années, avec le développement de méthodes optogénétiques innovantes permettant de disséquer des mécanismes de circuits, des études ont montré une cartographie du codage de la qualité gustative, au niveau du GC. En effet, ce codage est inné avec des modalités responsables de la représentation intéroceptive du goût amer vs. sucré et même acide ou umami (Chen et al., 2011b). L'activation optogénétique directe des régions corticales représentant les préceptes suivants, a évoqué des sensations respectivement amères (GC postérieur) ou sucrées (GC antérieur) (suppression des *licks* ou renforcement de l'autostimulation), même en l'absence de stimuli amer ou sucré et la distribution d'eau seule.

d. Codage du goût sucré: « sweetness »

Les composés sucrés sont détectés par un R hétérodimérique composé de 2 sous-unités, T1R2 et T1R3, exprimés au niveau des papilles gustatives de la bouche (Li et al., 2002 ; Nelson et al., 2001 ; Zhao et al., 2003). Toutes les molécules sucrées, incluant les carbohydrates et les édulcorants non-caloriques son détectées par l'activation de ce R non seulement présent au niveau

de la cavité buccale mais aussi dans d'autres organes comme le tractus gastro intestinal, le pancréas, la vessie, le tissu adipeux et le cerveau (Hwang et al., 2019 ; Laffitte et al., 2014).

Plusieurs structures cérébrales répondent de façon robuste et consistante au goût sucré, notamment le cortex insulaire, le striatum et le thalamus (Faurion et al., 1998 ; Haase et al., 2009 ; Kinomura et al., 1994 ; Rudenga et al., 2010).

Il existe des disparités entre le fait qu'une structure confère la réponse au goût sucré ou au plaisir de la perception dus au goût sucré ; ainsi, Rudenga et Small ont constaté que la partie ventromédiale du PFC sous-tend la préférence, la sensibilité au goût positif et la plaisance affective du goût sucré et non pas la signifiante physiologique ou l'intensité (Rudenga and Small, 2013). Ceci est en accord avec les travaux de de Araujo et collègues qui montrent qu'une ingestion calorifique peut être récompensante et déclencher la réponse dopaminergique en l'absence de goût sucré (de Araujo et al., 2008). Ainsi, le vmPFC est impliqué dans l'évaluation hédonique des goûts et a des connections réciproques avec les régions gustatives codant l'impact hédonique (Fontanini and Katz, 2009).

En effet, la région du vmPFC joue un rôle dans l'attribution de la valeur des aliments (Hare et al., 2009) et répond aux goûts et saveurs en fonction de leur caractère agréable (Small et al., 2001). Dans un test de réactivité orofaciale, la lésion des neurones du vmPFC a résulté en une augmentation de la réactivité aversive face aux concentrations élevées de quinine (Berta et al., 2019). Ces résultats sont concordants avec des études par induction lésionnelle de différentes aires gustatives (noyau thalamique ventropostéromédial, PbN et NTS) qui montrent de la même façon des réponses aversives augmentées en réponse à la quinine (Flynn et al., 1991). Ceci peut être expliqué par le fait que cette région envoie des projections glutamatergiques à des aires considérées comme « hotspots » hédoniques telles que la partie shell du Nac, l'OFC, l'amygdale et le cortex insulaire (Gabbott et al., 2003; Hoover and Vertes, 2007; Vertes, 2004, 2006).

La perception sucrée est une sensation gustative intrinsèquement enrichissante associée en partie à des aliments contenant des calories sous forme de sucres. Ces aliments serviraient de sources d'énergie efficaces et offriraient en même temps une expérience gustative agréable lors de la consommation (Lemon, 2015). Cette perception débute par la conversion de l'énergie chimique du saccharose en un message électrochimique lisible par le système nerveux. Cette conversion est due à l'influx électrique vers les cellules du récepteur du goût et médiée par le canal ionique : potentiel à récepteur transitoire mélastatine 5 (TRPM5) (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003), un canal cationique non sélectif qui présente un passage de courant accru en présence de chaleur (Talavera et al., 2005).

Les actions renforçantes du sucre en l'absence de goût sucré pointe sur l'importance du système dopaminergique dans la traduction des signaux métaboliques en action comportementale. Ainsi,

les signaux gastro-intestinaux et liés à l'absorption post-ingestive contribuent à la libération de dopamine et à l'acceptance du sucre de façon indépendante de son goût (pour plus de détails, (de Araujo, 2011b)).

e. Codage du goût amer: « Bitterness coding »

La détection des goûts amers est possible par la présence des Rs de la famille T2R couplés à la protéine G et exprimés au niveau de la langue et du palais. Chez les souris génétiquement modifiées pour permettre l'expression du R au goût amer sur les cellules « au sucre », la stimulation par le goût amer engendre une attraction ; l'expression du même R au niveau des cellules exprimant le T2R résulte en des réactions aversives pour le même composé. Ainsi, les cellules dédiées au goût amer fonctionnent comme détecteurs de l'amertume et médiateurs de l'aversion comportementale (Mueller et al., 2005). La nicotine par exemple élicite un goût amer et cette sensation est médiée par l'activation de l' α -gustducin, un R couplé à la protéine G. Ce R se trouve dans les cellules gustatives et médie la transduction gustative des composants amers, sucrés et umami (McLaughlin et al., 1992; Wong et al., 1996).

Des études par stimulation avec des goûts amers ont montré le rôle par réflexe, des neurones du NTS dans le codage du goût amer, les cellules B-best en particulier. La plupart de ces neurones ont des terminaisons nerveuses réceptives à partir du nerf glossopharyngien et projettent sur le PbN (Geran and Travers, 2009). Travers et Geran suggèrent un rôle de ces neurones dans la contribution aux circuits qui sous-tendent les réactions orofaciales aversives telles que les *gapes*, ainsi que le codage du goût et les qualités déplaisantes (Travers and Geran, 2009).

L'analyse des réponses des neurones du cortex gustatif chez le singe après stimulation orale par des solutions standard et un panel de composés amers a montré que les 16 composés amers formaient un groupe cohérent, plus ou moins relié au goût du HCl et NaCl, très éloigné de la perception du sucrose. Parmi les stimuli, la nicotine avec l'histidine et la vitamine B2 ont occupé le centre du groupe amer (Scott et al., 1999). Ceci démontre encore une fois le goût et la valence affective aversive de la nicotine orale.

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans le traitement de l'information suite à la stimulation par voie orosensorielle. Le traitement et l'intégration gustative ne dépend pas seulement des entrées sensorielles provenant de la cavité buccale mais aussi de la prédiction, des attentes, de l'apprentissage et des effets post-ingestifs (pour revue voir Gutierrez and Simon, 2011).

2. Système de l'olfaction

a. Circuit olfactif

Chez les animaux, la mémoire pour les odeurs environnementales joue un rôle vital pour la régulation des comportements importants pour leur survie (Mouly and Sullivan, 2010). La reconnaissance olfactive est médiée par un large répertoire de Rs olfactifs qui activent une cascade de transduction médiée par les protéines G (Olender et al., 2016). Les neurones sensoriels olfactifs se localisent dans l'épithélium olfactif qui couvre la cavité nasale. Les terminaisons nerveuses atteignent le bulbe olfactif, premier relai de l'information olfactive. Cette structure envoie des projections directes au cortex olfactif (noyau antérieur, tubercule et piriforme). Ensuite, l'information arrive directement du cortex piriforme à l'OFC, sans nécessairement passer par le thalamus (Carmichael et al., 1994; Datiche and Cattarelli, 1996; Shipley and Ennis, 1996). De même, l'information olfactive a un accès direct à l'amygdale (dont la lésion supprime l'acquisition du conditionnement de la peur olfactif (Cousens and Otto, 1998)(pour revue voir Mouly and Sullivan, 2010), ce qui permet de la différencier des autres modalités sensorielles et la rapprocher des structures d'intégration de l'information multisensorielle. En effet, le cortex piriforme correspond au cortex olfactif primaire (Howard et al., 2009; Veldhuizen et al., 2010a) et est l'aire olfactive la plus élargie au niveau du cerveau et est généralement divisée en 2 parties : antérieure et postérieure. La partie antérieure reçoit des entrées provenant de l'OFC (Illig, 2005) alors que le piriforme postérieur reçoit les afférences à partir de la BLA (Majak et al., 2004). Le cortex piriforme et ses projections sont impliqués dans la signalisation de la récompense, dépendamment de l'identité et de la valeur prédictive (Howard et al., 2015).

Une des plus importantes caractéristiques de la perception d'odeur est sa composante affective. Les odeurs sont ainsi marquées comme plaisantes (valeur hédonique positive) ou déplaisantes (valeur hédonique négative). Dans la perception des saveurs, il est important de distinguer entre l'olfaction orthonasale lorsque nous reniflons et l'olfaction rétronasale via les narines postérieures du nasopharynx lorsque l'air et les molécules odorantes sont expulsés de l'arrière du nez au moment de la déglutition des liquides ou les aliments (Pierce and Halpern, 1996; Rozin, 1982). Les produits volatils et odorants arrivent dans la cavité nasale, se lient aux Rs olfactifs et retournent dans la cavité buccale. C'est la perception en rétronasal des arômes qui, combinée aux signaux gustatifs, confère aux saveurs leurs identités (Mozell et al., 1969 ; Small et al., 2005). Ce type d'olfaction peut aussi influencer la perception de la texture des aliments dans la cavité buccale (Roudnitzky et al., 2011). Récemment, Blankenship et al. ont démontré, par manipulation optogénétique chez le rat, que l'olfaction rétronasale et non orthonasale partage les circuits de traitement de l'information associés au goût (Blankenship et al., 2019). Ainsi, l'inactivation du cortex insulaire gustatif résulte

en un dysfonctionnement dans l'expression des préférences rétronasales dans un paradigme d'apprentissage de préférence de flaveur.

b. Discrimination olfactive

Les discriminations de plusieurs stimuli, notamment olfactifs, se font au fur et à mesure à travers le système olfactif. Le bulbe olfactif puis l'amygdale et le cortex piriforme jouent un rôle important dans la discrimination de catégories différentes ou de stimuli à propriétés divergentes. Au niveau du bulbe olfactif, les cellules mitrales et granulaires répondent afin de détecter les odeurs. Ce sont les cellules mitrales qui contribuent à l'information sur l'identité de l'odeur mais aussi sa valeur (odeur récompense ou non ? (Nunez-Parra et al., 2014). Au fur et à mesure, la discrimination des odeurs devient de plus en plus fine et plus spécialisée au niveau du cortex orbitofrontal chez les primates non-humains (Tanabe et al., 1975a). Ceci suggère une amélioration de la discrimination d'odeur tout au long du système nerveux olfactif. Aussi, Rolls et al., ont montré que différentes régions cérébrales étaient activées par les odeurs plaisantes ou déplaisantes. Ainsi, les odeurs plaisantes activent le région rostromediale de l'OFC alors que cette activation est absente lors de la stimulation par des odeurs déplaisantes qui activent la partie latérale de l'OFC (Rolls et al., 2003a).

c. Qualités « taste-like » des odeurs

Il est commun de décrire les arômes de fraise, caramel et vanille comme sentant « sucré » (Bate-Smith, 1968). Aussi, les études sur les flaveurs montrent un renforcement de la perception sucrée par des odorants tels que la vanilline et l'éthyl maltol. Ceci s'explique par le fait que les stimuli olfactifs qui ont été régulièrement associés à des aliments sucrés, salés ou amers, peuvent améliorer la qualité gustative associée, même quand ils sont présents à des quantités minimales (Spence, 2015). Ils acquièrent alors des caractéristiques sucrées et la capacité de renforcer la sensation sucrée après avoir été associés avec le goût sucré (Stevenson et al., 1995, 1999). Aussi, des investigations sur les interactions olfacto-gustatives montrent que le cortex gustatif est impliqué dans la perception olfactive, même en l'absence de stimulus gustatif (Maier et al., 2015). Les études anatomiques indiquent qu'une des sources d'entrées au cortex piriforme postérieur est le cortex insulaire, relayant des entrées sensorielles spécifiques au goût jusqu'au piriforme (Shi and Cassell, 1998).

Plusieurs études ont investigué l'impact d'un stimulus olfactif sur la perception gustative. Cet impact est interprété en termes de renforcement du goût (quand l'intensité du goût du mélange est plus élevée que l'intensité du composé gustatif seul) ou de son atténuation/ suppression. La plupart des études se sont centrées sur la perception sucrée. Par exemple, dans une boisson au cacao, Labbe et collègues observent un renforcement de l'amertume induite par l'arôme de cacao et une

augmentation de la perception sucrée par l'arôme de vanille. Les interactions arôme-goût dépendent de la nature de l'arôme et de l'agent de goût utilisé. La même vanille génère un goût amer lors de son ajout au café (Labbe et al., 2007).

Une portion neuronale du cortex olfactif primaire, le piriforme postérieur, répond de façon sélective au goût et reçoit des projections denses à partir de l'insula (Johnson et al., 2000; Maier et al., 2012). Le goût peut renforcer les odeurs rétro-nasales et causer leur perception au niveau buccal avec des propriétés « taste-like » (Green et al., 2012; Lim and Johnson, 2011), de façon dépendante de la congruence goût-odeur. Par exemple, la vanille est souvent décrite comme plaisante, sucrée et l'odeur du citron comme acide, alors qu'aucun R gustatif n'est activé ; une confusion de la stimulation olfactive avec le goût existe, surtout celle sucrée (Murphy et al., 1977; Stevenson and Oaten, 2010; Stevenson et al., 1999).

Le goût est ainsi capable de capturer les odeurs selon la congruence (Lim and Johnson, 2011). Par exemple, Lim et Johnson démontrent que l'odeur de vanille inhalée par voie rétronasale, peut paraître émanant de la bouche, si elle est associée à la présence de goût sucré, comparé à un goût salé. Et au contraste, l'odeur de la sauce de soja a été plus référée à la cavité orale en la présence de goût salé. Ceci suggère que nos références proprioceptives sont apprises/acquises et sont donc le résultat de mécanismes centraux.

Des réponses supra additives à des mélanges goût-odeur ont été montrés au niveau de l'insula suggérant une émergence de la perception des saveurs par intégration multisensorielle dans cette région (Small et al., 2004; Stein, 1998).

3. Système d'intégration de l'information et codage sensoriel

a. Présentation générale

La perception d'un stimulus administré directement au niveau de la cavité buccale ne dépend pas seulement du goût. Les systèmes olfactif et somatosensoriel permettent la discrimination d'odeur, de texture et de température, facteurs qui participent avec le goût, à la perception des saveurs (Small and Prescott, 2005). L'apparence, la familiarité d'un certain produit, la mémoire affective orosensorielle, olfactive et post-ingestive (Garcia et al., 1955; Sclafani, 2004) liée à sa consommation ou utilisation préalable va aussi influencer la décision d'ingestion ; de même, les facteurs émotionnels, cognitifs et sociaux (Balleine, 2005; Balleine et al., 2005). Ceci est valable pour les nouveaux produits du tabac où l'expérimentation de plaisirs orosensoriels et cognitifs peut inciter à des utilisations répétées et l'installation de l'habitation et de la contextualisation.

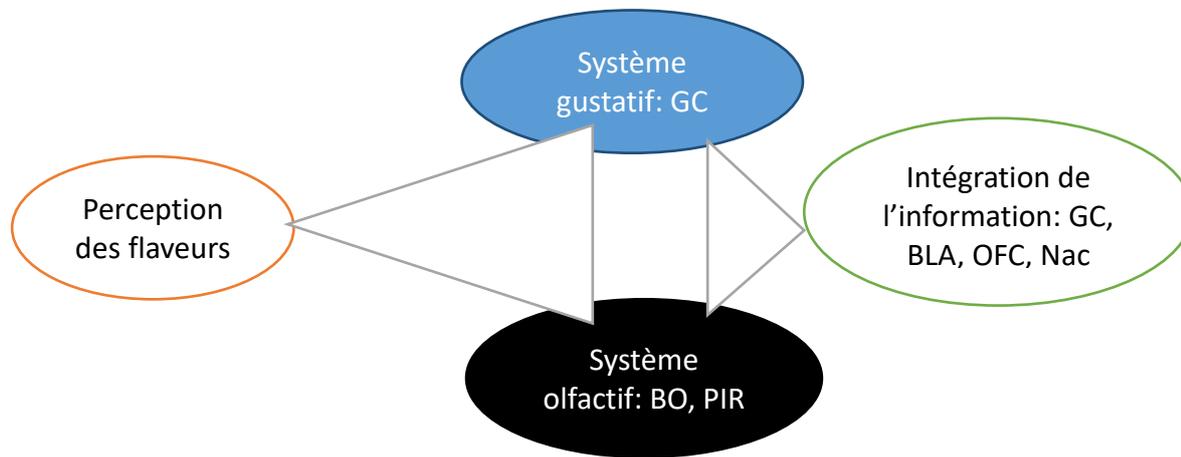


Fig. 6: Représentation schématique de la perception générale des saveurs qui nécessite des entrées sensorielles de type gustatif et olfactif, traitées par des systèmes spécifiques puis rejoignant des régions pour l'intégration des informations et le codage de la valeur affective.

La hiérarchie traditionnelle du traitement unisensoriel de l'information suivi par une convergence et intégration multisensorielle consiste en une partie de l'histoire. De nos jours, des structures étant perçues comme unisensorielles (olfactive, auditive, visuelle...) commencent à démasquer des fonctions multimodales (Wallace, 2015); et la liste des structures considérées comme participantes au niveau multisensoriel s'élargit. Ici, on ne parle pas seulement de l'influence des circuits gustatifs sur l'olfaction, mais aussi de la modulation visuelle des neurones du cortex auditifs et des convergences de plusieurs circuits afin de générer des sorties multisensorielles, ne se limitant pas à une seule structure à une seule fonction (Kayser et al., 2008; Maier et al., 2012; Schroeder and Foxe, 2005).

Les systèmes gustatif et olfactif ont d'ailleurs beaucoup en commun et interagissent. Cette interaction est nécessaire pour créer le percept de saveur qu'on expérimente. D'un côté, ils partagent des Rs sensibles aux stimuli des deux natures (par exemple, la protéine de signalisation chemosensorielle G γ 13 exprimée dans les cellules sensorielles gustatives et olfactives Liu et al., 2012) et d'un autre côté, ces systèmes semblent partager un codage commun et convergent dans plusieurs structures cérébrales chez le rongeurs, chez les humains et les autres espèces (NTS, (Escanilla et al., 2015); GC, (Samuelsen and Fontanini, 2017; Veldhuizen et al., 2010b).

Que ce soit en clinique ou en recherche préclinique, les systèmes de l'olfaction et du goût sont souvent reliés et parallèlement étudiés (Hadley et al., 2004). Le codage de la palatabilité, qui met en jeu la gustation et l'olfaction rétronasale, a été décrit dans plusieurs études précliniques. La plupart des études se sont intéressé à l'étude de régions cérébrales spécifiques tels que le noyau accumbens (Villavicencio et al., 2018) et la modulation de ce codage par des signaux extéroceptifs, auditifs (prédiction de l'augmentation de la palatabilité du sucre). Ces études montrent comment le codage dans des régions impliquées dans le plaisir, la prise alimentaire, les transformations sensorielles peuvent être corrélées au comportement chez les rongeurs. Ce comportement peut être

mesuré par des tests de réactivité orofaciale ou par la mesure de la réponse oro-motrice par le taux de léchage (*lick rate*).

Depuis là une vingtaine d'années, des manques existent quant à la compréhension des mécanismes par lesquels les régions cérébrales recevant à la fois des entrées gustatives et olfactives interagissent et soutiennent des processus neuropsychophysiques tels que la perception des saveurs (Small et al., 1997).

b. Rôle des différentes structures

i. Cortex insulaire gustatif (GC)

De façon importante, il existe des évidences sur le chevauchement et l'intégration des entrées gustatives, olfactives et tactiles au niveau du cortex insulaire (De Araujo and Rolls, 2004; de Araujo et al., 2003b; de Araujo and Simon, 2009). Les entrées olfactives projettent sur le cortex insulaire antérieur agranulaire ; ces projections arrivent directement du bulbe olfactif (Shipley and Geinisman, 1984) ou indirectement via le cortex piriforme (Datiche and Cattarelli, 1996). Il a été conclu que la partie agranulaire du cortex insulaire est le premier site de convergence des informations gustatives, olfactives et orales somatosensorielles (Sewards and Sewards, 2001). En effet, la partie antérieure de l'insula participe à l'intégration de l'information sensorimotrice du milieu interne (information olfactive, autonome, gustative), alors que la partie postérieure de l'insula est plus concernée dans le traitement des informations à partir de stimuli environnementaux (information auditive, somatique : Mesulam and Mufson, 1982; Mufson and Mesulam, 1984).

En appui à ceci, de Araujo et al., ont étudié cette convergence olfactogustative suivant l'administration concomitante chez 11 patients, des stimuli gustatifs et/ou olfactifs en intra-oral (de Araujo et al., 2003b). Les combinaisons goût-odeur incluaient : le sucrose+fraise, monosodium glutamate+méthional, sucrose+méthional et monosodium glutamate+fraise. Les résultats ont montré que les entrées gustatives et olfactives convergent dans le cerveau humain, dans la partie antérieure du cortex insulaire, la partie caudale de l'OFC, l'amygdale et le cerveau antérieur ventral. Des interactions positives entre les 2 stimulations gustative et olfactive rétronasale et la congruence entre les deux stimuli sont représentées dans la partie antérieure respectivement latérale et médiale de l'OFC. Dans le même sens, Malvaez et collègues ont démontré que les projections de l'OFC latéral vers la BLA étaient nécessaires et suffisantes pour l'encodage de la valeur positive d'une récompense, alors que les projections sur la BLA provenant de la partie médiale de l'OFC étaient nécessaires pour le rappel de cette valeur de la mémoire (Malvaez et al., 2019).

La différenciation des neurones du GC est aussi importante pour permettre le traitement des entrées sensorielles. Une proposition de 3 populations neuronales différentes au sein du cortex gustatif insulaire a été faite (Samuelsen and Fontanini, 2017) suggérant 2 populations à fonctionnement unimodal (goût seul ou odeur seule) et une troisième population réagissant au mélange goût+odeur. La stimulation a été faite par le biais de canules intra orales qui ont permis l'injection de 4 agents de goût (sucrose, NaCl, acide citrique et quinine), 2 odorants dissout dans l'eau (isoamyl acétate et benzaldéhyde) et de l'eau seule. L'inactivation nasale par le Triton X-100 a démontré que les réponses aux odorants intraoraux au niveau du GC sont dues à l'olfaction rétronasale. Aussi, les odorants dissous dans l'eau peuvent avoir des propriétés gustatives et ce sont les neurones bimodaux qui encodent la palatabilité.

De façon opposée, il existerait une convergence olfactogustative au niveau de la BLA et du GC mais cette convergence ne serait pas renforcée dans le GC par l'apprentissage de la préférence de flaveur chez le rat (Desgranges et al., 2010). L'activation du GC est donc indépendante de l'expérience préalable de flaveurs. L'expérience et l'apprentissage a par contre augmenté par 4 le nombre de neurones activés par le goût et l'odeur ensemble dans la BLA et ceci a été révélé par l'expression d'ARNmessenger Arc par hybridation *in situ* (catFISH).

ii. Amygdale : BLA et CeA

Une structure essentielle pour l'attribution de la valeur affective aux stimuli est l'amygdale, impliquée dans le traitement des informations émotionnelles, motivationnelles reliées à des stimuli positifs ou négatifs (Beyeler et al., 2018; Douglass et al., 2017; Kim et al., 2016b; Kim et al., 2017; Namburi et al., 2015; Paton et al., 2006). C'est le site de convergence de plusieurs voies sensorielles et de projections à partir du PFC et de l'hippocampe. Les neurones de la BLA projettent sur le Nac shell, le BNST, l'hippocampe et le noyau central de l'amygdale (CeA) (Baxter and Murray, 2002). En effet, des études ont montré que la BLA contenait des populations neuronales distinctes activées par des stimuli positifs ou négatifs (Beyeler et al., 2018; Paton et al., 2006) et que l'activation de circuits insula-amygdala était suffisante pour imposer une valeur positive ou négative au stimulus gustatif neutre (Wang et al., 2018a).

Ainsi, Fontanini et collègues (Fontanini et al., 2009), décrivent l'existence de deux sous-groupes de neurones gustatifs de la BLA, fonctionnant de façon simultanée durant l'intégration perceptive. Le premier type de neurones produit des réponses en harmonie avec celles observées dans le cortex gustatif dans le but du traitement de l'information liée à la palatabilité. Le second type de neurones est suggéré de faire partie du système de récompense, par les connections de la BLA au cortex sensoriel, OFC et système dopaminergique (Berridge, 1996; Cardinal et al., 2002; Saddoris et al., 2005). La BLA reçoit en effet de denses entrées sensorielles (Beyeler et al., 2018) et est nécessaire

pour l'acquisition d'associations récompensantes (Cador et al., 1989; Tye et al., 2008). De plus, des neurones distincts répondent aux stimuli de valeur positive ou négative (Beyeler et al., 2016). La CeA (Huang et al., 2003; Karimnamazi and Travers, 1998; Tokita et al., 2004) et la BLA (Norgren, 1976) reçoivent des entrées gustatives via les connections avec les centres gustatifs et la BLA reçoit aussi un retour gustatif provenant du cortex (Yamamoto et al., 1984a). De façon intéressante, les neurones de l'amygdale sont activés en réponse à une stimulation gustative et une transmission de l'information hédonique de la BLA au cortex est suggérée (Grossman et al., 2008). En effet, Ferreira et al. ont démontré un rôle des interactions BLA-IC dans la régulation de la puissance de l'aversion gustative conditionnée (CTA) (Ferreira et al., 2005). Ceci a été prouvé par la nécessité de l'activation du R NMDA dans le cortex insulaire pour le renforcement de la CTA induite par l'injection de glutamate dans la BLA. De même, les efférences en provenance de la BLA vers les régions du Nac, BNST et CeA codent l'aversion ou la récompense et sont fortement recrutées durant la mémoire de conditionnement aversif au goût (CTA).

D'autres études montrent que les neurones de la BLA (partie médiale) qui projettent vers le Nac répondent à des stimuli à valeur affective positive de récompenses et de comportement appétitif (Beyeler et al., 2016 ; Namburi et al., 2015 ; Ramirez et al., 2015) alors que ceux projetant vers la CeA s'excitent face à un stimulus prédisant une conséquence aversive (Beyeler et al., 2016). La BLA exerce des processus parallèles d'évitement et de palatabilité puisque l'inactivation de la BLA réduit le comportement d'approche des récompenses positives comme les aliments et les drogues (Chaudhri et al., 2013; Parkes et al., 2016). Il existe au sein de la BLA des populations neuronales différentes permettant ainsi de promouvoir ou de supprimer les comportements appétitifs (Kim et al., 2017).

iii. Habenula (Hb)

L'habenula (Hb) est une structure diencephalique localisée à la surface dorsomédiale du thalamus caudal et est divisée en deux parties, l'Hb médiale et l'Hb latérale. Les neurones de l'Hb latérale sont excités par l'exposition à des stimuli aversifs ou à l'omission des récompenses (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011; Hikosaka, 2010; Lecourtier and Kelly, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2009). Cette partie a alors été d'un grand intérêt dans l'encodage des états motivationnels négatifs. L'Hb médiale contient la plus haute densité de sites de liaisons de la nicotine dans le cerveau (Mugnaini et al., 2002) et est constituée de neurones cholinergiques ou produisant la substance P (Cuello et al., 1978; Eckenrode et al., 1987). De façon plus spécifique à la nicotine, les nAChRs contenant la sous-unité $\beta 4$ dans le circuit habenulaire médial-interpedunculaire jouent un rôle important dans la régulation de la sensibilité et le contrôle de la consommation de nicotine en limitant la prise (Fowler et al., 2011). La surexpression de ces Rs

chez la souris génétiquement modifiée a réduit la sensibilité aux propriétés renforçantes de la nicotine orale à partir de solutions et a diminué la consommation de la drogue par rapport aux souris WT (Frahm et al., 2011). Ce circuit est aussi impliqué dans le traitement aversif et le syndrome de sevrage nicotinique (Fowler et al., 2011 ; Salas et al., 2009).

iv. Cortex orbitofrontal (OFC)

L'OFC est une région importante qui confère des informations relatives à la valeur récompensante de stimuli gustatifs (Rolls et al., 1989), olfactifs et visuels (Critchley and Rolls, 1996; Rolls, 2000). L'OFC est activé lors de la présentation de stimuli à valeur affective positive tels que des odeurs (Anderson et al., 2003; Zatorre et al., 1992), des goûts plaisants/récompenses monétaires (O'Doherty et al., 2001a; O'Doherty et al., 2001b) et des stimuli somatosensoriels (Rolls et al., 2003b). L'OFC chez les primates est connu pour être un site d'intégration multimodale et les neurones de cette région sont impliqués dans l'encodage d'informations concernant les propriétés sensorielles de la combinaison complexe de stimuli (de Araujo et al., 2003b).

Le rôle joué par le cortex orbitofrontal dans la perception hédonique des saveurs est bien établi. Des études cliniques de neuro-imagerie ont montré que la perception plaisante du goût (O'Doherty et al., 2001b; Small et al., 2003), de l'odeur (Gottfried et al., 2003), de l'information orosensorielle (Grabenhorst et al., 2010) et des saveurs (de Araujo et al., 2003b; Kringelbach et al., 2003) est corrélée à la réponse dans l'OFC. Ces résultats concordent bien avec les études électrophysiologiques chez les rongeurs (de Araujo et al., 2006, neuronal ensembles) et les singes (Rolls et al., 1989). Chez les macaques, les représentations des entrées liées au goût et à la texture (viscosité) convergent dans le cortex gustatif primaire et sont combinées avec les entrées olfactives dans l'OFC (Rolls, 2005).

Plus spécifiquement, la partie postérieure de l'OFC, qui est dans la continuité de la projection gustative dans l'insula antérieure, reçoit des projections olfactives et est une aire critique pour la discrimination olfactive chez le singe (Tanabe et al., 1975b). En effet, les stimuli gustatifs projettent de la langue au cortex gustatif primaire (insula antérieure), alors que les stimuli olfactifs projettent directement sur le cortex olfactif primaire (cortex piriforme). De ces régions, les stimuli gustatifs re-projettent sur la partie caudale-latérale de l'OFC alors que les stimuli olfactifs projettent sur l'OFC caudale-médiale. L'augmentation de l'activité neuronale au niveau de l'OFC joue un rôle central dans la représentation de la sensation plaisante (ou la valeur récompensante) des aliments ou boissons, spécifiquement après congruence olfactogustative (de Araujo et al., 2003b; Small, 2012). Ainsi, le goût est capable de capturer les odeurs selon la congruence (Lim and Johnson, 2011).

v. Noyau du tractus solitaire (NTS)

Étant le premier relai neuronal dans le circuit gustatif central (Ogawa et al., 1988), le noyau du tractus solitaire (NTS) est une structure importante à analyser, surtout lors d'application des stimuli au niveau de la cavité buccale. Comme traité ci-dessus, les saveurs sont produites par l'intégration du goût, de l'olfaction, de la texture et de la température. Ces entrées multisensorielles interagissent au niveau de plusieurs structures corticales (Small and Green, 2012) comme l'OFC et l'insula par exemple. De même, Escanilla et collègues ont démontré une convergence et forte interaction de l'odeur et du goût au niveau du NTS chez le rat. L'analyse de l'activité neuronale par électrophysiologie montrent que les cellules du NTS étaient plus compétentes dans la discrimination des stimuli goût+odeur vs. goût seul et ceci pour plusieurs qualités gustatives : sucrée (sucrose), salée (NaCl), acide (acide citrique) et amère (quinine) (Escanilla et al., 2015). Ces résultats appuient des études qui montrent que le NTS est un centre de traitement multisensoriel, jouant un rôle dans le contrôle de la réponse gustative (Boucher et al., 2003) et la réponse à des entrées mécaniques et tactiles (Ogawa et al., 1984). Ainsi, cette région, spécifiquement la partie rostrale, contient deux populations distinctes de neurones orosensoriels, l'une sensible à la stimulation orale mécanique et de l'information sensorimotrice (Denman et al., 2019) et l'autre à la stimulation gustative (Travers and Norgren, 1995).

vi. Noyau parabrachial (PbN)

Une convergence olfactogustative a été décrite dans le noyau parabrachial (PbN) (Di Lorenzo and Garcia, 1985), qui constitue le deuxième relai dans le circuit gustatif, recevant des projections liées au goût à partir du NTS. Les études électrophysiologiques ont montré des réponses olfactives dans les aires gustatives du PbN chez le rat en situation d'éveil. De façon intéressante, la réponse à un stimulus olfactif, la vanille, a été éliminée mais pas l'odeur de l'éthanol, par une anesthésie par le pentobarbital (Di Lorenzo and Garcia, 1985).

En plus, l'augmentation de la libération de dopamine (mesurée par microdialyse chronique) dans le Nac suite à la stimulation orale par le sucrose était indépendante du système gustatif thalamocortical mais a été supprimée par des lésions du PbN. Ces lésions ont réduit l'activation c-Fos induite par l'ingestion de sucrose au niveau du Nac (Hajnal et al., 2009). Ces résultats montrent que le PbN est une structure impliquée dans la capacité d'un stimulus gustatif à s'engager dans le circuit de récompense.

De même, la valeur des stimuli (appétitive ou aversive) spécifie leur valeur hédonique et provoque l'exécution de comportements sélectifs (Wang et al., 2018a). Ainsi, le goût et la sensation somatique jouent un rôle dans les comportements de survie/protection, Le goût amer guide

l'évitement de certaines toxines et les signaux de douleur, chaleur, irritation signalent les conditions adverses. Ces deux circuits ont été investigués au sein du PbN, région impliquée dans le goût et la douleur. L'utilisation de techniques électrophysiologiques et optogénétiques ont permis l'évaluation de la relation entre l'activité orale somatosensorielle et gustative dans cette région (Li and Lemon, 2019). Les neurones répondant au goût amer au sein du PbN ont été activées en même temps par la stimulation par des agonistes aux canaux TRP nocisensitif comme la capsaïcine, l'huile de moutarde et la chaleur. C'est les entrées sensorielles convergentes du trijumeau qui ont contribué à cette activité. Il existe alors une convergence gustative-orosensorielle au niveau du PbN, la partie latérale plus spécifiquement.

vii. Pallidum ventral (VP)

Le pallidum ventral (VP) est une structure limbique importante pour le traitement mésocortico-limbique de nombreuses récompenses. Étant une voie de sortie principale des signaux limbiques, cette région était principalement associée à des fonctions motrices plutôt qu'à une structure de récompense à part entière (Mogenson et al., 1980; Mogenson and Yang, 1991). Cependant, de nombreuses études suggèrent que le VP joue un rôle important dans le traitement des récompenses dans le cerveau. C'est un centre de convergence pour des entrées sensorielles à partir de l'OFC, PFC, amygdale (Mitrovic and Napier, 1998), VTA (Klitenick et al., 1992), PbN (Saper and Loewy, 1980), insula (Reep and Winans, 1982b) et autres structures reliées à la récompense.

L'activation stimulée du VP est suffisante pour provoquer des améliorations de la récompense et de la motivation. Les animaux s'auto stimulent quand les électrodes sont implantées dans le VP (Panagis et al., 1995; Panagis et al., 1997). De façon intéressante, les neurones dopaminergiques innervent directement le VP (Klitenick et al., 1992; Napier et al., 1991; Panagis and Spyraiki, 1996). Cette région est une cible majeure de projections GABAergiques provenant du Nac et sa partie postérieure contient un *hotspot* hédonique (Ho and Berridge, 2013; Smith and Berridge, 2005), alors que sa partie rostrale constitue un *cold spot* hédonique, où la stimulation mu opioïde réduit le plaisir dû au goût sucré (Smith and Berridge, 2005).

En effet, un pallidum ventral intact est nécessaire pour une motivation et une récompense normales. Il fait partie du système contrôlant l'appétit et la motivation alimentaire '*wanting*' (Berridge, 1996). Des lésions du VP ou des microinjections de muscimol (agoniste GABA A) suppriment les réactions plaisantes au sucrose/saccharine et les remplace par des réactions aversives, avec une réduction de la motivation dans des taches instrumentales, mimant la déplétion dopaminergique mésolimbique (Cromwell and Berridge, 1993; Farrar et al., 2008; Shimura et al., 2006). Le blocage GABAergique ne renforce cependant pas les réactions hédoniques dans un test de réactivité au goût (Smith and Berridge, 2005).

Enfin, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la perception de flaveur par des interactions sensorielles a été investiguée par des études comportementales, électrophysiologiques, neurophysiologiques et par imagerie. Tous les résultats montrent une unification des perceptions des saveurs à partir de signaux et structures anatomiquement séparées. Cette intégration dépendrait de la nature des stimuli, de la congruence temporelle et spatiale, de l'attention conférée à ces stimuli et de l'expérience personnelle préalable (Small and Prescott, 2005; Small et al., 2004). Il ne faut surtout pas oublier qu'isoler une structure avec une seule fonction est rare.

c. Modulation de la valeur affective

Le mot hédonique prend origine de l'ancienne Grèce et veut dire Plaisir. De nos jours, la valeur hédonique est définie comme plaisir sensoriel qui inclut aussi des plaisirs de haut niveau (cognitif, social, moral) (Berridge and Kringelbach, 2015). Les réactions hédoniques et sensations plaisantes peuvent être objectivement mesurées par l'expression d'une réactivité orofaciale affective provoquée par les goûts. Ces réactions positives et négatives sont valables depuis le premier jour de naissance chez les enfants (Steiner, 1973). Des expressions orofaciales similaires ont été aussi caractérisées chez les primates non-humains, les rats et les souris (Berridge, 2000; Grill and Norgren, 1978; Steiner et al., 2001).

i. Expériences et préférences

Les sensations plaisantes peuvent être modulées par l'expérience, l'apprentissage des préférences et des aversions (Delamater et al., 1986). Au moins chez les rongeurs, les mécanismes post-ingestifs jouent un rôle plus important que les mécanismes oraux sensoriels dans l'établissement des préférences à long terme (de Araujo, 2011a).

En effet, l'association d'un goût palatable à un état de malaise recrute des neurones du GC qui projettent sur la BLA afin de changer la représentation du goût conditionné et la transformer en une représentation similaire à un goût intrinsèquement perçu comme aversif (Lavi et al., 2018). D'autres études préalables ont aussi pointé sur l'importance de la BLA pour l'acquisition de la CTA et du changement des réponses gustatives qui la suivent au niveau du GC (Gallo et al., 1992; Grossman et al., 2008). Ces codages de l'approche ou de l'évitement de certains goûts impliquent d'autres structures, notamment le PbN (Namburi et al., 2016).

De même, plusieurs structures cérébrales comme l'amygdale, l'hypothalamus et le VP participent au traitement des réactions émotionnelles aversives comme la peur, la douleur et le dégoût (Baliki et al., 2010; LeDoux, 2012; von dem Hagen et al., 2009). L'amygdale est suggérée d'être directement impliquée dans l'intégration de stimuli olfactifs et gustatifs lors de la formation

d'aversions aux saveurs (Bermudez-Rattoni et al., 1986; Bermudez-Rattoni et al., 1983; Small et al., 2013).

La consommation ou perception d'un aliment ou d'un signal dépend de la chaîne de transmission de l'information mise en œuvre et de la mémoire passée associée à l'un des éléments lors de la consommation d'un mélange. Les réponses affectives aux saveurs sont fortement dépendantes de l'apprentissage. Ainsi, l'influence des signaux gustatifs sur les signaux olfactifs est importante pour l'acquisition et l'expression d'une préférence ou d'une aversion pour un aliment ou une boisson (Palmerino et al., 1980).

ii. Système sensoriel et dopamine : Motivation ou valeur hédonique?

Les systèmes neuronaux impliqués dans la motivation sont largement distribués dans le cerveau et chevauchent avec ceux impliqués dans le *liking* (Berridge et al., 2009). Ainsi, en plus du rôle dans la médiation des propriétés renforçantes des drogues, l'activité neuronale dopaminergique a été corrélée au traitement des stimuli aversifs (Horvitz, 2000), la nicotine incluse. En effet, durant la phase aiguë d'exposition à la nicotine, le blocage de la transmission dopaminergique peut bloquer les effets aversifs du comportement conditionné, pouvant être mesurée dans les tâches de CTA (Lavolette and van der Kooy, 2003; Sellings et al., 2008). Par contre, dans les procédures mesurant le renforcement du comportement par l'exposition chronique à la nicotine (AAIV), le blocage de la transmission dopaminergique peut atténuer les effets renforçants de la nicotine (Corrigall et al., 1994; Corrigall et al., 1992). De ces faits, la transmission dopaminergique fonctionnelle après exposition chronique à la nicotine (et aux drogues psychostimulantes) joue un rôle dans l'attribution de la salience incitative (Berridge and Robinson, 1998; Robinson and Berridge, 2001).

Ainsi, le système dopaminergique est important pour l'attribution de la valeur hédonique aux drogues, comme la nicotine mais aussi aux aliments palatables. La diminution de la perception de l'aversion de la nicotine est corrélée au développement de l'habitude de consommer (Fowler and Kenny, 2011). Ainsi, l'aversion de la nicotine est régulée par le système mésocorticolimbique, associé à la récompense liée à la nicotine. Ce système inclut le complexe habénulaire qui a des projections primaires de l'habénula médiale sur le noyau interpedunculaire mais aussi de l'habénula latérale sur le noyau tegmental rostromédial et l'ATV (Hong et al., 2011; Proulx et al., 2014).

En effet, le système dopaminergique joue un rôle très important dans l'attribution de la valeur affective de stimuli. Ainsi, les souris mutées KO du transporteur de dopamine (phénotype hyper dopaminergique), montrent moins de réactions positives aux fortes concentrations de sucrose comparées aux WT (Pecina et al., 2003). De mêmes, les rats KO montrent une préférence réduite au sucrose et une anhédonie (Cinque et al., 2018). La manipulation du système dopaminergique

(par injections d'agoniste du R dopaminergique D1) altère alors la consommation, notamment d'aliments palatables (Martin-Iverson and Dourish, 1988; Rusk and Cooper, 1989).

De façon opposée, des études suggèrent que la dopamine n'est pas nécessaire pour l'impact hédonique du plaisir mais seulement pour l'attribution de leur valeur motivationnelle incitative (suppression de la recherche appétitive). Ceci a été montré par des réactivités au goût intactes après blocage pharmacologique dopaminergique ou destruction des projections dopaminergiques mésolimbiques (Pecina et al., 1997).

L'attribution de la valeur affective dépend de l'activation par les stimuli, de régions du système de valorisation, chez l'humain, le Nac, le PFC, l'insula, le thalamus et l'amygdale (Bartra et al., 2013). Parmi ces régions, le noyau accumbens prend un rôle primordial.

iii. Noyau accumbens (Nac)

Le Nac est une structure clé dans l'attribution d'une valeur affective à un stimulus. La mesure de l'activité c-Fos au niveau de cette structure après injections IP de solutions de saccharine ou de chlorure de lithium montre des changements opposés de l'activité de cette région ; celle-ci augmente quand l'aversion conditionnée augmente. De plus, le conditionnement aversif a résulté en une réduction de la consommation de saccharine mais n'a pas changé les réactions orofaciales aversives à la saccharine (Soto et al., 2017).

Au niveau du Nac, des séparations des parties core et shell ont mis en évidence que l'activité au niveau du shell est liée aux effets récompensants des drogues d'abus. De plus, la libération de DA est associée à une augmentation de l'immunoréactivité c-Fos au niveau du shell, alors que l'administration passive d'un stimulus aversif peut diminuer la libération de DA au sein du shell (McCutcheon et al., 2012; Roitman et al., 2008). Un *hotspot* hédonique majeur se localise alors au niveau de la région médiale rostr dorsale du shell du Nac. La stimulation par microinjections d'agonistes du R opioïde mu, delta ou kappa augmente les réactions hédoniques face au goût sucré (Pecina and Berridge, 2005).

La mesure de l'activité neuronale (par électrophysiologie) reflétant la valeur affective montre une augmentation de l'activité neuronale dans la partie shell du Nac (Taha and Fields, 2005; Villavicencio et al., 2018) quand les réactions hédoniques et la palatabilité du sucrose augmentent, surtout quand elle est associée à des signaux environnementaux. Yang et collègues proposent que ce sont les entrées sensorielles à partir de l'hippocampe vers le Nac shell qui augmentent la palatabilité (Yang et al., 2019) alors que de Jong et al., montrent que les terminaisons dopaminergiques au niveau du Nac shell sont excitées par les résultantes négatives et les stimuli qui les prédisent et que ces informations sont médiées par les entrées sensorielles à partir des

neurones glutamatergiques au niveau de l'hypothalamus latéral (de Jong et al., 2019). Ces propos sont encore mitigés parce que d'autres études ont montré l'inverse : une inhibition des neurones du Nac shell par la consommation de sucrose et une activation par la consommation de quinine (Roitman et al., 2005) après injection orale des solutions chez le rat. Cependant, Tandon et collègues ont démontré que l'agonisme opioïde mu au niveau du Nac shell augmente la consommation d'alcool en renforçant les propriétés motivationnelles incitatives de l'alcool et des signaux associés et non pas en modulant la palatabilité, la satiété ou le renforcement (Tandon et al., 2017).

Des *hotspots* hédoniques ont été retrouvés au niveau du Nac et du VP qui lui est connecté, du PbN et récemment dans des régions limbiques telles que le PFC, incluant l'OFC et l'insula (Castro and Berridge, 2014; Pecina and Berridge, 2005; Smith and Berridge, 2005; Soderpalm and Berridge, 2000). Des analyses du système dopaminergique au niveau du Nac par micro dialyse après lésions des relais gustatifs thalamique et du noyau parabrachial ont été faites. Les résultats ont montré une diminution de la libération de la dopamine dans le Nac suite à la lésion du PbN mais pas du thalamus après ingestion d'une solution de sucrose (Hajnal and Norgren, 2005). Aussi, suite à cette lésion du PbN, les rats ont réduit leur consommation de sucrose par rapport à l'eau ou à la consommation des rats contrôles. De façon intéressante, les aliments ou liquides palatables activent les neurones de l'ATV et les lésions de cette région diminuent sélectivement la consommation des solutions de sucrose normalement préférées (Shimura et al., 2002).

iv. Modulation du goût et de l'olfaction par la température et l'irritation

Durant l'ingestion ou le contact des stimuli avec les cavités sensorielles, les substances sont sujettes à des changements de température et il y a un besoin qui est d'identifier d'autres sensations pouvant affecter cette perception comme l'irritation, la couleur et la texture par exemple. Il a été montré que les irritants interagissent avec la perception des goûts et des odeurs, en réduisant leur intensité perçue et que certaines substances odorantes et gustatives contiennent des composés irritants (Cain, 1974). Ainsi, des terminaisons nerveuses contenant les Rs TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) thermosensibles répondent à la capsaïcine, substance conférant les sensations suite à la consommation du piment. Ces neurones sont des nocicepteurs et activent une cascade qui augmente la température au niveau de la langue. Ceci module la réponse aux autres goûts, notamment le goût sucré. D'autres thermorécepteurs sont activés par le menthol et produisent une sensation de fraîcheur. Des processus analogues peuvent entrer en jeu pour moduler les sensations suite à la consommation des produits du tabac contenant la nicotine, substance amère, qui active ce type de Rs (Heng et al., 2014). Par exemple, la réponse chorda tympani à la nicotine a été réduite, mais non éliminée chez les souris KO du R TRPM5 (Oliveira-Maia et al.,

2009). Ce R est nécessaire pour la transduction périphérique des stimuli gustatifs sucrés, amers et umami (Zhao et al., 2003).

Dans les nouveaux produits de vapotage, le liquide et les substances qu'ils contiennent sont chauffés pour être aérosolisés. Une hausse de la température du produit peut significativement affecter la libération de composés aromatiques dans la cavité buccale et nasale. Ce transfert de chaleur est différent en fonction de la texture du produit et change alors la perception des saveurs. Ce changement est démontré au niveau des neurones du NTS chez la souris par des études électrophysiologiques après stimulation orale par différents goûts à des températures différentes. Les résultats montrent une augmentation des cellules excitées par l'administration intraorale d'eau, de sucrose et de saveur umami chauds (30-37°C de température orale) comparé à l'eau, sucrose, umami à température ambiante (22°C) (Wilson and Lemon, 2013, 2014).

Enfin, le codage de la valeur affective se fait par le biais de signaux hormonaux, peptidiques mais aussi neuropsychopharmacologiques, affectifs et humoraux qui contrôlent le comportement de prise. Pour ce faire, une contingence entre la prise et les effets post-consommatoires doit se faire en apprentissage (ex : par conditionnement opérant ou prise en accès libre) pour permettre d'établir un lien entre la perception affective et sensorielle de la drogue ou de l'aliment et ses effets centraux et périphériques post-ingestifs. Aussi, le conditionnement nicotinique chez l'humain dépend de façon critique de la connaissance explicite de cette contingence et des attentes du consommateur (Hogarth and Duka, 2006).

Comme mentionné précédemment, plusieurs études démontrent que les mécanismes d'aversion et de récompense peuvent être médiés par un même système dans des conditions différentes d'exposition ou d'environnement. Ainsi, les mécanismes d'activité neuronale d'une certaine région peuvent être centrés sur une qualité de codage particulière. Il ne faut cependant pas oublier que le cerveau maintient une plasticité, des mécanismes d'apprentissage associatifs et un codage spécifique dépendant de plusieurs facteurs en jeu ; la monopolisation d'un output sensoriel n'est donc pas vraiment possible dans ce système où plusieurs circuits se chevauchent et où la connectivité fonctionnelle est importante. La perception des saveurs est multi sensorielle et repose sur l'intégration des signaux à partir de tous les sens (Spence, 2015).

Dans notre travail, la saveur est une perception qui inclue des signaux gustatifs, oraux-somatosensoriels et des signaux émanant de l'olfaction rétronasale. Tous ces stimuli sont combinés dans la cavité buccale au moment de la consommation des produits du tabac. L'intégration de toutes ces entrées sensorielles n'est pas objective et dépend de l'expérience, de l'anticipation et des croyances (de Araujo et al., 2005; O'Doherty et al., 2002; Plassmann et al., 2008; Veldhuizen et al., 2011) mais aussi de différences individuelles de la densité des Rs linguaux au goût

(Bartoshuk, 2000). Ces facteurs peuvent conduire à une amélioration ou suppression multi sensorielle (de Araujo et al., 2003b).

V. Problématique

La nicotine a le potentiel addictif le plus haut parmi les substances d'abus. L'association de cette molécule à plusieurs additifs olfacto-gustatifs est courante dans les produits du tabac. Jusqu'à ce jour, l'expérimentation préclinique a permis un recueil important d'informations à partir d'études de consommation et de comportement centrées sur des modèles de prise volontaire intraveineuse de nicotine ou des injections de nicotine répétées. La voie orale a été étudiée à moindre mesure malgré l'importance de cette route dans la prise humaine de nicotine. Aussi, l'effet direct de l'association orale simultanée des additifs liés au goût avec la nicotine a été peu investigué en préclinique. Les rares études qui existent s'intéressent à l'effet des injections périphériques de nicotine sur les facteurs de goût (menthol, cerise ou raisins) administrés par voie orale (Palmatier et al., 2013; Wickham et al., 2018). Les observations ne permettent donc pas de caractériser l'effet orosensoriel simultané des 2 substances sur le comportement addictif et ne comblent pas le manque de compréhension des mécanismes neurobiologiques impliqués.

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée aux effets de l'association des stimuli sensoriels oraux avec la nicotine donnée par voie orale dans le but de caractériser l'importance de cette association sur le développement du processus addictif chez la souris. Par ailleurs, j'ai étudié l'effet de cette association orale sur la composante de palatabilité de la solution. Cette question est essentielle dans le contexte de l'émergence de la cigarette électronique qui délivre la nicotine chauffée associée à des facteurs de goût très variés et attractifs. Ce travail permettra de souligner l'importance de la remise en question des additifs dans les produits du tabac, leurs effets propres ou associés à la nicotine et leur action sur l'addiction et l'attractivité des produits du tabac. L'étude de l'interaction bidirectionnelle de la nicotine orale avec les facteurs non-pharmacologiques aidera à la dissection des mécanismes de renforcement et de palatabilité des nouveaux produits du tabac. Notre hypothèse générale postule que les effets addictifs de la nicotine pourraient être en partie médiés par la voie orosensorielle et une transmission importante vers le système de récompense et d'autres réseaux sensoriels.

VI. Objectifs

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée à la nicotine prise par voie orale (la voie la plus rapprochée du mode de prise chez l'humain) et aux interactions entre elle et les facteurs sensoriels qui lui sont associés simultanément par la même voie. Mon hypothèse est que la prise orale de nicotine est capable d'installer les stades du processus addictif et que les arômes agissent en tant que signaux oraux permettant de masquer le goût aversif de la nicotine et servant comme outil de renforcement secondaire de la nicotine. Spécifiquement, nous postulons que ces composants oraux facilitent l'effet de la nicotine en augmentant sa palatabilité et qu'ils ont aussi une action renforçante par eux même.

Les objectifs de ce travail sont donc :

1. Etudier le rôle de la composante aversive et de l'irritation dans la prise orale de nicotine : utilisation de souris mutées TRPV1
2. Modéliser la prise orale volontaire de nicotine associée à un arôme et de caractériser les stades du processus addictif (acquisition, maintenance, extinction et rechute)
3. Etudier la palatabilité de la nicotine avec ou sans arômes et de cartographier le marquage neuronal de la valeur affective suivant l'administration intraorale de solutions

Matériels et méthodes

I. Animaux

Pour toutes les études menées dans ce travail de thèse, des souris mâles C57BL/6J ont été utilisées. Les animaux sont issus des laboratoires Charles River, reproduits et élevés au laboratoire.

Les expériences du chapitre 1 sont faites chez des souris génétiquement modifiées pour le récepteur TRPV1 (Caterina et al., 2000) issues des laboratoires Jackson. Les souris KO (Knock-out) et WT (wild type) ont un fond génétique C57BL/6J et sont issues des mêmes portées lors de la reproduction au laboratoire.

Les souris sont hébergées dans des conditions de stabulation bien contrôlées, en animalerie dont la température ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) et l'humidité ($50 \pm 5\%$) sont régulées et dont le cycle circadien est inversé, la lumière s'éteignant de 8h à 20h. Ainsi, les rongeurs étant des animaux nocturnes, toutes les expériences se déroulent dans la phase d'activité des souris. Quand cela est possible les souris sont en cages collectives (10/cages maximum). En cas de chirurgie avec implant chronique ou en cas de mesure de consommations individuelles, elles sont hébergées en cages individuelles.

Toutes les expériences débutent après sevrage des animaux, entre 30 et 55 jours post-natal. Les souris ont accès à la nourriture *ad libitum*, sont privées d'eau 2h avant et 2h après l'auto-administration en conditionnement opérant et ont accès aux solutions *ad libitum* dans les expériences de consommation et de préférence en bouteille. Les expériences sont réalisées dans le respect des normes françaises (directive 2013-118, février, 2013) et internationales (directive 2010-63, septembre, 2010, Communauté européenne) de l'expérimentation animale et validées par le comité d'éthique français (APAFIS#3265-20 15121811059640 v6).

II. Drogues

1. Nicotine

Les solutions pour la prise orale de nicotine sont préparées à partir d'une solution liquide de nicotine (Sigma Aldrich®, France) ; les concentrations administrées par voie orale en bouteille, auto-administration en cage opérante (10, 20, 40, 60, 80 et 120 $\mu\text{g/mL}$) ou injection intraorale (40, 80 ou 120 $\mu\text{g/mL}$) sont exprimées en concentration de nicotine base. Le pH est ajusté à un intervalle de 7.7-7.9 pour une absorption optimale de la nicotine au niveau de la muqueuse buccale.

Pour les injections systémiques test de nicotine, nous utilisons la nicotine hydrogène tartrate (1g de nicotine base = 2.85 g de nicotine tartrate) dissoute à 0.5 ou 1 mg/Kg/5 mL dans une solution de saline (NaCl 0.9 %, ProAmp®) et le pH est ajusté à 7.2-7.4 avant l'administration par injection intra-péritonéale.

a. Additifs aromatiques

Les arômes de noix de coco (Arômes Caraïbes®) et de vanille (Lechampion bio®, contenant de l'extrait de vanille, du sirop de sucre et de l'alcool éthylique à 20% en volume) sont achetés dans des magasins locaux et dilués dans de l'eau du robinet pour former des solutions à différentes concentrations d'arômes.

b. Antagoniste cholinergique

La mécamylamine (Mécamylamine hydrochloride, Sigma-Aldrich®), antagoniste non-sélectif du nAChR, est dissoute dans du NaCl 0.9% et administrée à une dose de 3 mg/Kg/5mL par injection sous cutanée (SC).

c. Additifs sucrés caloriques ou non caloriques

La saccharine 0.1% sous forme de sel d'hydrate de sodium (Sigma-Aldrich®) est utilisée comme agent édulcorant pour le pré-entraînement en conditionnement opérant et comme diluant de la nicotine dans l'expérience utilisant les souris TRPV1.

Le sucrose 20% (D-(+)-Saccharose, VWR chemicals®) et lait concentré dilué à 20% dans l'eau de robinet (Nestlé®, contenant du lait entier, du sucre, 8% de matières grasses et 20% d'extrait sec lactique dégraissé) sont utilisés comme solutions de références mixtes ou hédoniques pour les tests de réactivité gustative.

d. Solution de référence amère

La quinine 0.1%, sous forme de poudre de chlorhydrate de quinine (Sigma-Aldrich®) est utilisée comme solution de référence amère/aversive pour les tests de réactivité orofaciale.

III. Paradigmes comportementaux

1. Prise orale de nicotine

a. Mesure de la consommation en accès libre

Le but de ce modèle est de déterminer la consommation en accès libre de chacune des solutions et de caractériser si elles ont des propriétés appétitives ou aversives. La question est de savoir si l'ajout d'additifs aromatiques comme la noix de coco ou la vanille permet d'améliorer la palatabilité et d'augmenter la consommation volontaire des solutions contenant de la nicotine. *A posteriori*, l'arôme qui permet une consommation optimale sera sélectionné comme diluant de la nicotine pour les expériences de consommation orale volontaire en chambres opérantes et de réactivité orofaciale.

Tout au long d'une période de référence, les souris sont acclimatées aux nouvelles conditions de stabulation en cages individuelles ce qui permet le relevé précis des consommations individuelles. La consommation basale en eau est mesurée pour 72h (3 x 24h) avant l'introduction des solutions expérimentales. Les bouteilles remplies d'eau de robinet sont accessibles, fixées sur les grilles des cages d'hébergement. Avant chaque test, les solutions expérimentales sont fraîchement préparées le jour même. Le test de consommation est réalisé sur 24h. Le volume de boisson est mesuré par la pesée des bouteilles quotidiennement à la même heure et par la soustraction de ce poids de celui enregistré 24h plus tôt. Le poids des animaux est surveillé régulièrement pour s'assurer d'une courbe de croissance normale pour toutes les souris. La consommation /24h est exprimée en ramenant le volume par rapport au poids corporel moyen de la souris (mL/g).

i. Consommation sans choix sur une bouteille

Les tests de consommation sans choix consistent en une présentation d'une solution unique aux animaux. Les biberons d'eau sont remplacés par un biberon d'une contenance 50 mL de solution expérimentale. Les mesures de consommation sont faites sur une période de 24h.

Les solutions testées: nicotine (60 µg/mL) ; arômes (noix de coco et vanille) (0.01, 0.1 et 1%) ; nicotine (60 µg/mL) + arômes (0.01 et 0.1%).

ii. Consommation avec choix sur deux bouteilles

Le test de consommation en choix libre sur deux bouteilles (« two-bottle choice ») en cage d'hébergement permet de calculer la préférence d'une solution par rapport à une autre suivant les volumes respectivement consommés des deux solutions. Une alternance des côtés de présentation des solutions à la grille des cages est faite à chaque changement de solution afin d'éviter toute préférence de positionnement. Les tests de préférence sont réalisés sur 24h. Nous avons testé les solutions : nicotine 60 µg/mL, vanille ou noix de coco 0.01, 0.1 et 1%.

Vu notre intérêt de mesurer la préférence des solutions aromatisées de nicotine par rapport aux autres solutions présentées, le pourcentage de préférence est calculé par l'équation suivante:

$$\%pref = [volume\ consommé\ de\ nicotine\ aromatisée / (volume\ total\ consommé)] \times 100$$

b. Consommation volontaire en cages opérantes

Ce paradigme est utilisé pour évaluer les propriétés renforçantes de la nicotine orale. Il consiste à une forme d'apprentissage de l'association entre le travail effectué en entraînement et la récompense obtenue. La valeur de la récompense ainsi que la présence de signaux associés à la récompense modulent la motivation et le comportement de l'animal fourni. Dans notre modèle, on évalue la valeur renforçante de la nicotine orale auto-administrée en la présence d'un signal

sensoriel oral (un additif aromatique, un édulcorant) et d'un signal visuel lumineux contingent à la récompense.

i. Cages opérantes



Fig.1 : Cage d'auto-administration orale de drogue. Une seringue de 10mL contenant la drogue liquide est placée sur une pompe d'injection située à l'extérieur de la cage, et qui distribue 50µL/récompense dans l'abreuvoir situé entre les trous actif et inactif.

Les expériences de conditionnement opérant sont menées dans des chambres opérantes (15x18x22 cm, Imetronic, France) (Fig.1) présentes dans une salle d'expérimentation équipée de générateurs de bruit blanc pour empêcher la transmission des sonorisations. Ces cages sont constituées, d'un panneau opérant à gauche, d'un panneau opaque à droite et deux murs en Plexiglas transparents à l'avant et à l'arrière. Sur le panneau opérant, deux trous (nose-poke holes) munis de détecteurs d'entrée se trouvent des deux côtés d'un abreuvoir (pour la distribution de la récompense liquide) relié par un tube à une seringue de 10 mL contenant la drogue en solution. Au-dessus des 2 trous, l'un actif et l'autre inactif (dont la position est alternée d'une cage opérante à l'autre) se trouvent des LED permettant la génération d'un signal lumineux (qui dans nos expériences est associé à la distribution de la récompense après nombre d'entrées correcte dans le trou actif). La seringue est placée sur une pompe d'injection située à l'extérieur de la cage. Les cages sont équipées de faisceaux de lumière infrarouges afin de détecter et d'enregistrer l'activité ambulatoire au cours de la séance. Chaque cage est placée dans une enceinte close ventilée et insonorisée afin de réduire les nuisances sonores et visuelles.

ii. Auto administration orale (AAO)

Au cours de chaque session quotidienne, l'éclairage du plafond de la cage (lumière plafonnier) s'illumine pendant 3 secondes (s) signalant le début de la séance d'entraînement de 30 min. Le nombre de visites demandé dans le trou dit « actif » est récompensé, selon le programme de renforcement, par une distribution de 50 µL de solution. Lors de la distribution de la récompense,

un stimulus lumineux de 3s apparaît au-dessus du trou actif. Ainsi, la contingence de l'association entre la distribution de la drogue et le stimulus lumineux visuel facilite l'apprentissage de la réponse d'auto-administration et le conditionnement. Les visites dans le trou inactif n'ont pas de conséquences sauf la baisse du taux de discrimination défini par l'équation :

$$\% \text{ discrimination} = (\text{nb visites du trou actif} / (\text{nb visites total trou actif} + \text{trou inactif})) * 100$$

L'animal doit boire la totalité du liquide distribué (faire 30 léchages détectés sur l'abreuvoir) pour que le trou actif donne à nouveau accès à des réponses renforcées. Lorsque la séance d'AAO se termine, le plafonnier de la cage s'allume à nouveau pour signaler à l'animal que la drogue n'est plus disponible. Au cours de cette dernière phase et pour une durée de 15 minutes, les visites dans le trou actif sont encore possibles mais n'engendrent plus de distribution. Le nombre de visites du trou actif pendant cette période permet de quantifier le comportement de persévération et de recherche de drogue de l'animal en l'absence de la drogue. Les variables comportementales mesurées pendant la séance d'AAO sont les suivantes : le nombre de visites dans chaque trou, le nombre de distributions, nombres de léchages de l'abreuvoir (que nous appellerons « lick ») et l'activité ambulatoire (POLY, Imetric, Pessac).

1. Pré-entraînement à la saccharine

Afin d'optimiser le comportement de discrimination des souris (Clemens et al., 2010), chaque expérience a commencé par un pré-entraînement à la saccharine débutant à un ratio fixe 1 (FR1), c'est-à-dire une visite pour une récompense, puis augmenté à FR2 sur une période de 2 semaines afin d'obtenir des performances optimales. La saccharine est diluée à une concentration de 0.1% dans de l'eau du robinet, c'est une solution palatable sucrée non-calorique. A l'issue du pré-entraînement, les souris sont réparties, selon les expériences dans les groupes nicotine arôme vanille ou nicotine dans saccharine (groupes tests) et arôme vanille ou saccharine seuls (groupes contrôles) de façon à ce qu'ils aient les mêmes caractéristiques comportementales d'AAO de départ.

2. Acquisition et maintenance d'AAO de nicotine en ratio fixe 3 (FR3)

Les souris sont ensuite exposées à l'auto-administration de récompenses liquides nicotine arôme vanille / arôme seul ou nicotine dans saccharine/saccharine seule sur un programme de renforcement à travail modéré, FR3, sur des séances de 30 ou 60 minutes, suivies de 15 minutes de mesures du comportement persistant de recherche après chaque session d'auto-administration.

3. Sensibilité au changement de la récompense et des signaux sensoriels associés

Le test de sensibilité définit la réponse opérante en fonction de la dose de nicotine délivrée. Ainsi, une courbe de dose-réponse est établie avec des doses croissantes de nicotine allant de 10 à 80 µg/mL afin d'observer une possible titration de la prise volontaire des animaux.

De plus, nous avons étudié l'impact de la modification de la présentation des signaux sensoriels associés à l'AAO de nicotine sur le comportement de prise volontaire. Pour cela, nous avons effectué des tests d'omission de la nicotine et/ou d'autres signaux qui lui étaient préalablement associés (arôme ou signal lumineux).

4. Étude de la motivation : ratio progressif (PR)

Après stabilisation de l'AAO, les souris sont testées pour déterminer leur niveau de motivation pour la solution de nicotine arôme vanille dans un protocole de ratio progressif 2 (PR2), le travail à fournir augmente de 2 visites pour chaque nouvelle récompense. Ce test mesure la charge de travail maximale que les souris sont prêtes à fournir pour obtenir la même récompense. La session s'arrête au temps maximum c'est-à-dire 60 ou 120 minutes, ou bien si aucune récompense n'est délivrée pendant 15 minutes consécutives. Le point de rupture est ensuite mesuré et correspond au ratio maximum atteint pour la dernière distribution de récompense. Ce nombre augmente avec l'augmentation de la valeur incitative de la récompense et des stimuli associés.

5. Extinction et réinstallation du comportement

La réinstallation du comportement de recherche (aussi appelé « rechute » par abus de langage) de nicotine peut être induite par plusieurs facteurs précipitants, tels que les effets incitateurs de la drogue ou des stimuli précédemment associés à la prise de drogue. La rechute est mesurée par la différence de comportement entre la période d'extinction de 30 minutes et la période après la présentation du facteur précipitant. Les différents protocoles sont présentés ci-dessous.

a. Rechute induite par le signal lumineux

Les animaux sont d'abord placés en situation d'extinction pendant 30 minutes dans les cages d'auto-administration : chaque visite du trou actif reste sans conséquence. Puis, le stimulus lumineux précédemment associé à la distribution de la récompense est présenté une fois de façon non contingente et ensuite présenté durant 2 sec de façon contingente à chaque visite renforcée par FR1 pendant 30 minutes. Le nombre total de visites dans le trou actif reflète la réinstallation du comportement de recherche de la drogue.

b. Rechute induite par la présentation de la drogue

Pour ce test, les animaux sont d'abord placés en extinction pendant 30 minutes. Ensuite, ils reçoivent une récompense liquide gratuite dans l'abreuvoir. Pendant 30min, chaque visite ultérieure dans le trou actif est sans conséquence. Le nombre total de visites dans le trou actif reflète la réinstallation du comportement de recherche de la drogue.

c. Rechute à la présentation de la récompense associée au signal lumineux

Pour ce test, les animaux sont d'abord placés en extinction pendant 30 minutes. Ensuite, ils reçoivent simultanément une récompense liquide gratuite dans l'abreuvoir et la présentation du signal visuel lumineux. Ensuite, pendant 30min l'animal est testé en FR1 : chaque visite ultérieure dans le trou actif est récompensée par la présentation pendant 2 sec du stimulus précédemment associé à la récompense liquide. Le nombre total de visites dans le trou actif reflète la réinstallation du comportement de recherche de la drogue.

6. Challenges pharmacologiques

a. Antagonisme des récepteurs nicotiques par la mécamylamine

Le challenge par la mécamylamine (3 mg/Kg/5 mL), antagoniste non-sélectif du nAChR est fait dans le but de bloquer l'effet pharmacologique de la nicotine et de déterminer si cela a une influence sur le comportement AAO de nicotine (Fig.2). Les tests sont réalisés sur des séances d'AAO en FR3 sur de 60 min suivi de 15 min d'AAO en l'absence de la drogue. Le protocole de test est le suivant : le jour 1 l'injection de saline (5 mL/Kg SC) et le jour 2 l'injection de mécamylamine (3 mg/Kg SC ; Keyworth et al., 2018; Stoker et al., 2008) précèdent l'introduction des souris dans les cages opérantes pour l'AAO de nicotine à 120 µg/mL.

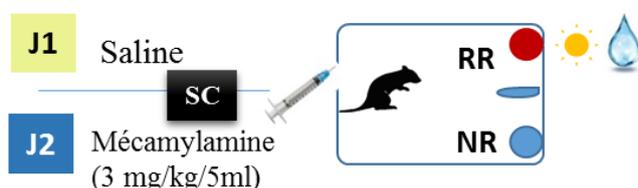


Fig.2 : Protocole de blocage des effets pharmacologiques de la nicotine par injection sous-cutanée de mécamylamine.

b. Stimulation des récepteurs nicotiques par la nicotine

Aussi, l'effet du prétraitement par la nicotine sur les propriétés incitatives de la solution nicotine arôme vanille a été évalué par l'injection intra-péritonéale (IP) de nicotine (0.5-1 mg/Kg/5 mL), 15 minutes avant le début de la séance d'AA. La nicotine est injectée exclusivement aux souris du

groupe nicotine+vanille (reproduction du comportement par les deux solutions sur 3 jours consécutifs). Des études sur cet effet aigu de la nicotine montrent aussi un effet dépressur (Collins et al., 1988; Marks et al., 1993) ou activateur (Sparks and Pauly, 1999) de l'activité ambulatoire. Nous avons choisi cette dose en accord avec les études antérieures chez la souris (Caruso et al., 2018; Sparks and Pauly, 1999).

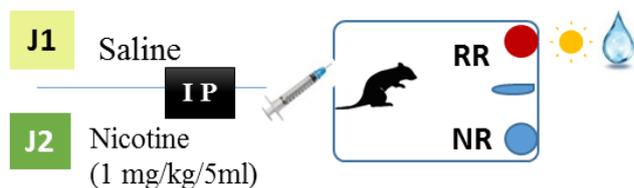


Fig.3 : Protocole de défi par injection intrapéritonéale de nicotine.

2. Test de réactivité gustative

a. Principe

Depuis sa conception par Grill et Norgren en 1978 (Grill and Norgren, 1978), le test de réactivité gustative est considéré comme une mesure objective permettant d'évaluer l'impact hédonique des stimuli oraux. Ce dispositif nous permet de mesurer les réponses affectives à un goût grâce aux mimiques orofaciales où les réactions peuvent appartenir à deux types principaux de réponses gustatives qui sont décrits depuis : les réactions appétitives/ingestives/positives et les réactions aversives/de rejet/négatives. Ces réactions reflètent la valeur hédonique attribuée aux récompenses (« *liking* » ou « *disliking* ») et sont quantifiées à partir des vidéos via un clavier éthologique.

Le principe de ce modèle est de déterminer de quelle façon les qualités gustatives de la nicotine peuvent être modifiées ? Pour y répondre, nous avons examiné l'influence d'un additif aromatique ou d'une solution hautement palatable sur la palatabilité d'une solution de nicotine.

b. Chirurgie intraorale chez la souris

Pour les tests de réactivité gustative, une canule orale unilatérale est implantée pour permettre des infusions intra-orales de différentes solutions expérimentales. Pour ce faire, les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine (Imalgène© 75 mg/Kg) et de xylazine (Rompun©7,5 mg/Kg) administré par voie intrapéritonéale avant la chirurgie. Une prémédication de méloxicam (Métacam© 2 mg/Kg/mL, 0.4 mg/mL en SC (150 µL/souris)) avec une hydratation préalable (NaCl/Glucose 200 µL/souris) est faite après la tonte de la souris. Une injection sous-cutanée de ropivacaine (anesthésique locale) est faite sur le haut du dos à l'endroit où l'incision va être faite. Ensuite, la peau est incisée avec un scalpel à partir des oreilles vers le dos et une aiguille (23G acier inoxydable) collée au tubing de polyéthylène (6 cm de long, diamètre interne de 0,64 mm, diamètre externe de 1.19 mm, Silastic ®, USA) est insérée pour ressortir dans la face interne de la

joue supérieure (droite de la souris) au niveau de la première molaire entre les deux ligaments. Ce tube est ensuite guidé en sous-cutané et sorti du haut de la tête (cou) entre les deux oreilles (Grill and Norgren, 1978; Berridge, 2000; Kiefer et al., 1998). La sortie du tube est sécurisée dans la bouche grâce à un embout en forme de disque qui bloque la canule sur la joue sans gêner les fonctions orales et d'alimentation normales (embout fabriqué à partir d'un cathéter en polyéthylène (1 cm de long, diamètre interne de 0,58 mm, diamètre externe de 0.96 mm, Biotrol ®, France). La canule est fixée au haut du crâne par un disque (découpé à partir d'une grille en polypropylène solide, Sefar Propyltex ®) sous la peau de façon à ne pas gêner les mouvements normaux de la souris. Le tube est relié à un connecteur guide de 1cm fabriqué à partir d'aiguilles 22G en acier inoxydable et par lequel seront possibles les connexions au dispositif afin de pouvoir administrer les solutions expérimentales. Après chirurgie, les souris sont hébergées dans des cages individuelles une semaine avant les tests comportementaux afin de récupérer et sont traitées 3 jours avec le Métacam© (150 µL/souris en SC) pour empêcher la douleur et l'inflammation. Avant les tests, les animaux sont surveillés de près, pesés, manipulés tous les jours. Les canules sont quotidiennement rincées avec de l'eau pour s'assurer du bon fonctionnement de la canule et du connecteur et empêcher la fermeture.

c. Mesure comportementale de la réactivité gustative

i. Dispositif expérimental

Pour les tests, les souris sont placées dans un cylindre en Plexiglas (diamètre 8 cm, hauteur 15 cm) où la canule est reliée à une seringue de 1 mL et un tube en polyéthylène PE-160 (préalablement remplis par les solutions tests) placée dans une pompe de perfusion (Kd Scientific, USA) permettant l'injection à une vitesse de 0.1 mL/min (dans notre expérience, infusion de 110µL pendant 66s en prenant en considération le volume mort pour remplir une canule standard moyenne) (Fig 5). Les souris sont habituées au dispositif 5 minutes -2 fois /jour- pendant deux jours consécutifs précédant le test. Ceci est nécessaire pour familiariser les animaux avec l'environnement, réduire l'anxiété des souris lors des tests de réactivité hédonique et réduire la réactivité à la nouveauté. Le tubing et seringues sont rincées à l'eau après chaque infusion et un tubing est dédié à chaque type de solution afin d'éliminer tout résidu pouvant biaiser nos tests.



Fig 5 : Dispositif de mesure de la réactivité orofaciale comportant un cylindre en plexiglas où les souris sont placées, un miroir reflétant les mimiques orofaciales, une caméra permettant de filmer la réactivité et une pompe permettant l'injection des solutions expérimentales par liaison du cathéter de la pompe au connecteur de la canule intraorale.

ii. Enregistrement vidéo

Pendant les injections, la réponse immédiate des animaux est filmée à l'aide d'une GoPro hero 7 à travers un miroir incliné placé en dessous du cylindre afin d'enregistrer et mesurer les comportements de la réactivité gustative. L'enregistrement des mimiques faciales permet une quantification ultérieure en aveugle, les vidéos étant anonymées (fig 6). Afin d'analyser les comportements enregistrés lors des tests de réactivité hédonique, les vidéos sont lues à une vitesse diminuée 4 fois ($\times 0,25$), permettant ainsi d'isoler les comportements, de les comptabiliser et de les classer en tant que comportements hédoniques ou aversifs (Berridge, 2000).



Fig 6 : Capture d'écran de l'enregistrement vidéo, montrant une souris dans le cylindre, en cours de test de réactivité orofaciale.

iii. Clavier éthologique et quantification du comportement

La réactivité gustative est mesurée grâce aux mimiques orofaciales de la souris pendant l'administration des solutions directement dans la bouche par le biais du système de canule intraorale. On répartit ces réactions en deux catégories : réactions hédoniques d'ingestion et réactions aversives de rejet passif ou actif. Parmi les réactions hédoniques on comptabilise différents évènements : protrusions de la langue (*tong protrusion*), léchages des pattes (*paw lick*) et mouvements de bouche (*mouth movements*), pour les réactions aversives on comptabilise les hoquets (*gapes*), l'agitation des membres antérieurs (*forelimbs flails*), de la tête (*head shake*), les toilettages de la face (*face wipe*) et les écoulements passifs par la bouche (*passive drip*). Les termes en anglais caractérisant les réactions sont majoritairement employés dans ce manuscrit afin de garder l'authenticité des réactions par rapport à la nomenclature d'origine. Dans des expériences préalables chez le rat, la quantification de réactions dites neutres incluait les mouvements de la bouche et l'écoulement passif de liquide. Ces réactions ont ensuite été incluses dans le panel des réactions hédoniques et aversives ((Brining et al., 1991) étude chez le hamster). L'analyse des vidéos est réalisée via un clavier éthologique mis au point au laboratoire (par Dr. Alain Marchand, CR CNRS, INCIA, équipe DECAD). Il permet la quantification des évènements en durée (une unité équivaut à une durée de 2 ou de 5 secondes) et en nombre (évènements ponctuels ; chaque réaction individuelle équivaut à une unité) (cf : tableau des réactions fig.7 adapté à partir de (Berridge et al., 1981; Berridge, 2000)). Les données seront par la suite importées dans Excel et une macro permet de récapituler les comportements observés dans la vidéo analysée. On obtient ainsi une valeur finale pour chaque souris des deux types de réactivité, hédonique et aversive, et qui sont exprimés en évènements par seconde, pouvant contribuer de façon égale au score positif ou négatif. Un coefficient est attribué à chaque évènement puisque tous les évènements ne représentent pas de façon égale le plaisir ou l'aversion. De cette façon, les réactions plus préservées, n'éclipsent pas d'autres réactions rares mais informatives.

	Réactions hédoniques	Réactions aversives
Évènements en durée	Tongue protrusion (2s) Paw lick (5s) Mouth movement (5s)	Face wipe (5s) Passive drip (5s)
Évènements ponctuels		Gapes Forelimb flails Headshakes

Fig. 7 : Comptabilisation des mimiques orofaciales ; tableau des réactions comptabilisées pour les tests de réactivité. Ces réactions sont divisées en réactions hédoniques, quantifiées en évènement en durée et réactions aversives pouvant être ponctuelles ou inscrites dans le temps. Adapté et modifié de Berridge, 2000.

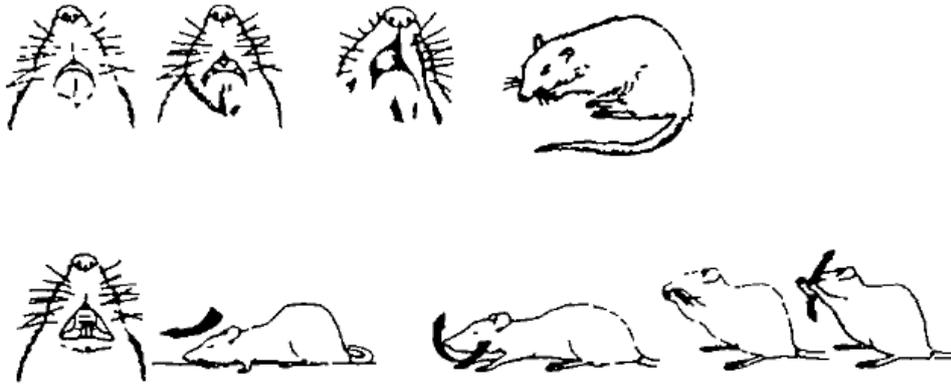


Fig. 8 : Réponses consommatoires déclenchées par le l'injection intrabuccale de solutions chez le rat ; représentation des mimiques orofaciales reflétant (en haut) une séquence de réactions ingestives comprenant les mouth movement, tong protrusions, paw licks et (en bas) une séquence de réactions aversives comprenant les gapes, chin rubs, head shakes, face wipe et forelimb flails. Adapté de Berridge et Grill, 1983.

IV. Analyse des substrats biologiques et neurobiologiques

1. Dosage de la cotinine sérique

La cotinine étant un métabolite important de la nicotine et le marqueur classique de l'intoxication après le CO pulmonaire chez l'humain, nous avons déterminé les taux sériques de cotinine à corréler avec l'exposition à la nicotine orale. Après AAO, les souris de l'expérience de conditionnement opérant de la nicotine arôme vanille 1% (n = 12 divisées en n=7 à nicotine 40 et n=5 à nicotine 120 µg/mL) sont anesthésiées avec un mélange de pentobarbital (300 mg/Kg) et de lidocaïne (30 mg/Kg) afin de permettre un prélèvement sanguin intracardiaque. Environ 0,5 mL de sang est recueilli dans des tubes et placé directement pendant 4 heures dans un bain-marie à 37°C pour permettre la coagulation et la collecte du sérum après centrifugation à 4000 tour/min pendant 10 min à 4°C. Les échantillons sont conservés à -20 ° C jusqu'au dosage. La concentration sérique de cotinine est mesurée à l'aide du kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) direct compétitif phase solide pour le dosage de la cotinine dans le sérum des rongeurs (plaque de 96 puits ; Souris /Rat cotinine ELISA; Calbiotech Inc, USA). Deux aliquots de 10 µL de sérum provenant de chaque animal sont utilisés comme répliques dans les tests ELISA.

Avant le dosage, tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18-26°C). Les puits sont imprégnés d'anticorps anti-cotinine. Les échantillons sériques et le conjugat enzyme de la cotinine (HRP) sont mis en incubation 60minutes au noir après agitation de la plaque (10-30s). La cotinine des échantillons entre en compétition avec le conjugat HRP pour les sites de liaisons. La cotinine non liée et les produits de conjugaison cotinine-enzyme sont enlevés par rinçages et tapotage sec vigoureux sur un papier absorbant pour s'assurer de l'élimination de tous les résidus. A l'ajout du réactif substrat TMB (incubation 30minutes au noir), l'intensité de la couleur est

inversement proportionnelle à la concentration de cotinine dans les échantillons. La réaction est arrêtée par une solution stop du kit et agitation de la plaque pendant 15 minutes avant lecture de l'absorbance. Une courbe standard est préparée reliant l'intensité de la coloration à la concentration de cotinine.

La détection spectrale de l'absorbance est faite par un lecteur de plaques multi-spectral ELISA à 450 nm dans les 15 minutes suivant l'ajout du réactif permettant l'arrêt de la réaction (POLARstar Omega, BMG Labtech, Plateforme de Biochimie et de Biophysique des protéines- Institut François Magendie, avec l'aide de Yann Rufin, Bordeaux Neurocampus). Les concentrations de cotinine sérique sont calculées par rapport à une courbe standard des concentrations de cotinine (0-100 ng/mL) à partir de l'absorbance.

2. Analyse de la réactivité neuronale

Dans notre étude, le marquage par immunohistochimie de la protéine c-Fos est utilisé pour l'analyse de la réactivité neuronale. c-Fos est l'homologue cellulaire d'un gène viral isolé en 1982 du virus du sarcome ostéogène FinkelBiskis-Jinkus (fos). Il est défini comme un type de gène immédiat précoce (IEG-Immediate early gene) qui répond rapidement à la signalisation intracellulaire (Sng et al., 2004) (temps d'attente 90 min post test dans nos conditions). L'expression de la protéine c-Fos reflète l'activation neuronale métabolique et transcriptionnelle induites par différents stimuli, ainsi, l'état du cerveau et l'activation dans les régions d'intérêts par nos tests.

a. Extraction et préparation du tissu cérébral

Le but de la perfusion intracardiaque avec un agent fixateur, est de préserver uniformément et rapidement le tissu afin de faire un instantané de l'activation neuronale (imagerie fonctionnelle). 90 min après les tests de réactivité orofaciale (temps d'expression du facteur de transcription c-Fos), les souris sont bien anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de pentobarbital (Eutasol 300 mg/Kg) et de lidocaïne (30 mg/Kg). Une incision vers le haut du diaphragme et des côtes est faite afin d'ouvrir la cage thoracique et dégager le cœur. A l'aide d'une aiguille reliée au tuyau de perfusion, le cathéter est inséré à la pointe du ventricule en le dirigeant vers la droite du cœur dans l'aorte. La pointe du cœur est ensuite clampée et l'oreillette droite de la souris coupée afin de permettre la sortie du sang et du liquide de perfusion. Le débit de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (agent fixateur, 60 mL, 12 mL/min) mime le débit sanguin de la souris. La fixation des tissus est validée par l'observation de tremblements de l'animal dans les secondes qui suivent le début de la perfusion ; la couleur blanchit et la dureté et rigidité de la souris augmentent au fur et à mesure du passage du PFA. Les cerveaux sont ensuite récupérés puis post-

fixés dans le PFA 4% pendant 24h à 4°C puis sont conservés dans le PB 0.1 M+Sucrose 30 % pour saturer le tissu avant coupe au microtome.

b. Analyse de l'activité neuronale

i. Immunohistochimie

Pour l'étude du codage neuronal suite au test de réactivité orofaciale, 37 cerveaux sont coupés (groupe eau, n=9 ; vanille, n=8 ; nicotine, n=10 ; nicotine+vanille, n=10). Des sections coronales fines de 40 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome à glissière (Leica SM2010R). Tous les niveaux cérébraux sont récupérés pour permettre une analyse étendue des systèmes impliqués dans cette tâche au fur et à mesure de la quantification.

Nous avons réalisé un marquage immunohistochimique avec un anticorps primaire dirigé contre les protéines c-Fos puis un anticorps secondaire biotinylé. La révélation est faite avec la diaminobenzidine (DAB) associée au nickel.

L'application du protocole se fait en deux étapes et les plaques sont en agitation continue. Le premier jour, les coupes sont rincées (3 x 10 min) au buffer phosphate (PBS 0.1M) puis incubées au PBS +Triton 0.3% contenant 1% de peroxyde d'hydrogène pendant 15 minutes. Les coupes sont ensuite rincées au PBST (3 x 10 min). L'incubation dans une solution de PBST 0,3 % contenant du « sérum normal de chèvre » (Normal Goat Serum, NGS) à 5 %, est ensuite faite pendant 90 minutes. Après ceci, les coupes sont exposées à une solution contenant des anticorps primaires Rabbit anti-c Fos (9F6, mAb Cell signaling technology CST, 2250 (S)), dilués au 1/1000 dans du PBST 0,3 %. Elles sont incubées pendant 3 nuits consécutives à 4°C. À la suite de cette incubation et au 4^{ème} jour, des rinçages sont effectués au PBST 0.3% (3 x 10 min) puis une incubation des coupes dans une solution contenant les anticorps secondaires biotinylés (GOAT anti-rabbit biotinylé (c-fos), dilués au 1/1000 dans du PBST 0,3 %) est faite pendant 90 minutes. Des rinçages sont faits par la suite (PBS 3 x 10 min) avant incubation 90 min dans une solution ABC diluée au 1/500 dans du PBST (Avidine, Biotine et Peroxydase, kit Vector Laboratories). Les coupes sont lavées dans du PBS (2 x 10 min) puis dans du Tris (0,1 M - pH 7,4) pendant 10 min. L'étape déterminante de révélation est ensuite faite à la DAB (Sigma, 1 tablette pour 50 mL de Tris) en la présence du nickel (0.8 mg/20 mL) et de H₂O₂ 30% pour 6 min. Des rinçages au Tris et au PBS sont ensuite faits afin d'arrêter la réaction. Les coupes sont ensuite placées sur des lames gélatinées et montées avec l'Eukit (milieu de montage) après séchage et déshydratation par 2 bains de 10 minutes au xylène.

ii. Acquisition et traitement des données

1. Scan et visualisation des lames : Nanozoomer

Toutes les lames sont individuellement scannées à l'aide du NanoZoomer, scanner de lames à haute résolution (Hamamatsu Photonics, Bordeaux Imaging Center) avec un grossissement x20. Les coupes d'intérêt de chaque lame sont ensuite visualisées puis sélectionnées sur le logiciel NDPview2. Le dessin des zones permet aussi l'acquisition des mesures des surfaces dessinées en fonction de l'échelle de l'image. Ainsi, la définition préalable des régions d'intérêt bilatéralement dans les deux hémisphères quand cela est possible est faite à l'aide de l'Atlas Stéréotaxique Souris de Franklin et Paxinos (3^{ème} édition- 2007) et l'Allen Brain Atlas interactif en ligne (Allen Institute, <https://atlas.brain-map.org/>). Les coupes d'intérêt sont ensuite exportées en format Tiff à un grossissement x10 afin d'avoir une qualité d'image à haute résolution qui permettra une quantification efficace et correcte.

2. Identification et Quantification neurones marqués c-Fos

La quantification du marquage c-Fos sur les coupes anonymées est réalisée à l'aide du logiciel de traitement et d'analyse d'image ImageJ Point tool (ij152-win-java8) via une méthode semi-automatique permettant l'application d'un seuillage sur une image transformée en noir et blanc (type 8-bit) après soustraction du bruit de fond (subtract background 50 pixels). Les zones sont ensuite délimitées et considérées comme régions d'intérêt (ROI). Ainsi l'analyse des particules est faite respectivement dans chaque zone en prenant en compte la taille en unités pixels (30-300) et la circularité des noyaux marqués (0.2-1). La quantification est faite à l'aveugle et les résultats du comptage sont exprimés en densité (nombre de noyaux marqués/mm²).

Basé sur les données de la littérature, nous avons quantifiés en priorité les régions d'intérêt suivantes (coordonnées par rapport au bregma suivant l'atlas de Franklin et Paxinos, 3^{ème} édition) (fig. 9) :

- Noyau accumbens antérieur (+1.94 - +1.54) et postérieur (+1.42 - +0.98) en distinguant les régions du shell et du core
- Cortex insulaire incluant partie granulaire, partie gustative (+1.42 - +0.62)
- Noyau basolatéral de l'amygdale, (-0.94 - -1.7)
- Habenula (fusion partie médiale et latérale) : (-0.94 - -1.58)
- Noyau thalamique paraventriculaire PVT, (-0.94 - -1.7)

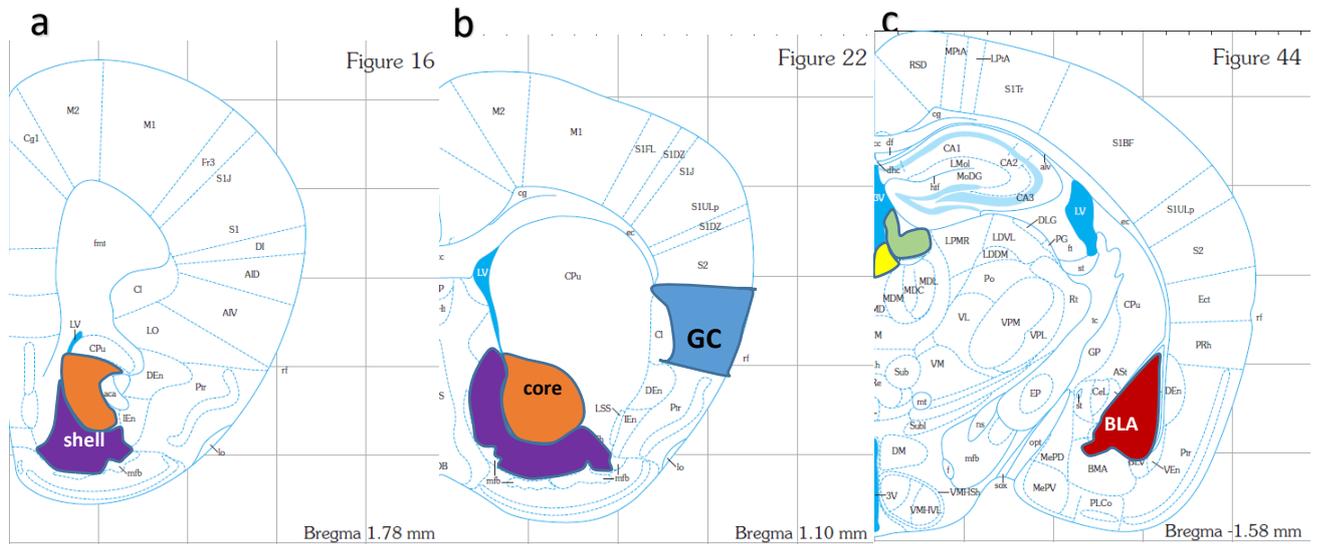


Fig 9 : Représentation des coupes comportant les régions d'intérêt : Exemple de coupe de quantification avec délimitation des zones quantifiées du (a) Nac antérieur, parties core et shell, (b) Nac postérieur, parties core et shell et cortex gustatif et (c) BLA, Habenula et PVT. Adapté et modifié de l'atlas de Franklin et Paxinos, 3^{ème} édition.

Chapitre 1

Effets des récepteurs TRPV1 sur l'auto-administration orale de nicotine édulcorée à la saccharine.

Introduction

Pour les fumeurs, la nicotine exerce des effets pharmacologiques centraux. Elle constitue également un élément essentiel de l'expérience du tabagisme, car elle procure l'impact somatosensoriel recherché et une odeur distincte (Hummel et al., 1992). On a alors, d'une part le renforcement primaire par la nicotine, molécule psychostimulante, et d'autre part, les effets sensoriels menant à des préférences subjectives lors de la consommation des produits du tabac. Ces facteurs aident au maintien chronique du tabagisme et incluent le goût, les saveurs, l'odeur, la texture, la couleur, la température et l'irritation de la gorge (« harshness ») (Cruz and Green, 2000). En effet, dans les produits d'aide au sevrage tabagique, les produits du tabac oral et plus récemment la e-cig, la nicotine joue le rôle d'un stimulant sensoriel qui peut aussi provoquer des sensations de brûlure désagréables et une irritation (Bolliger et al., 2007; Einarson and Einarson, 1997; Talavera et al., 2009). De même, la nicotine déclenche des réactions nociceptives nocifensives chez les animaux lorsqu'elle est appliquée aux muqueuses orale (Dessirier et al., 1997) et nasale (Greiff et al., 1993; Hummel et al., 1992).

L'irritation buccale due à la nicotine semble agir via les nAChRs se trouvant au niveau des terminaisons nociceptives et innervant la langue et la cavité buccale (Steen and Reeh, 1993) (Carstens et al., 2000; Gyekis et al., 2012). Cependant, les nAChRs ne sont pas la seule cible de la nicotine sur les terminaisons nerveuses sensorielles. La nicotine sensibilise et active d'autres Rs.

En effet, plusieurs études démontrent un rôle du goût amer dans la modulation de la consommation des produits du tabac. Par exemple, la réponse chorda tympani à la nicotine a été réduite, mais non éliminée chez les souris KO du R au goût amer TRPM5 (Oliveira-Maia et al., 2009). De même, il a été démontré que le R TRPA1 était activé et que le R TRPV1 était directement sensibilisé (sans nécessité d'activation des nAChRs) par la nicotine (Kichko et al., 2013; Liu et al., 2004; Talavera et al., 2009). L'activation de ces Rs par la nicotine augmente la température de la langue et le flux sanguin au niveau des joues et produit une douleur/irritation au niveau de la bouche et de la gorge (Jensen et al., 2016). Ces effets sont dépendants de la concentration de nicotine au niveau des neurones sensoriels (Kichko et al., 2013) et de la libération de vasodilatateurs tels que le peptide lié au gène de la calcitonine et la substance P (Simon et al., 2006).

Qu'est-ce que les Rs TRPV1 ?

Chez les mammifères, les Rs TRP (Transient receptor potential) se trouvent dans une multitude de tissus et sont impliqués dans les systèmes sensoriels (Damann et al., 2008). Les TRPV1 (Transient receptor potential vanilloïde 1) ou récepteurs de la capsaïcine appartiennent à la grande famille des canaux ligand-dépendants (Beckers et al., 2017; Connolly and Wafford, 2004) et sont des Rs

à canaux ionotropes cationiques non sélectifs (Szallasi and Blumberg, 1999) thermosensibles, contenant 6 domaines transmembranaires (Welch et al., 2000).

Ils interviennent dans divers processus physiologiques et pathologiques tels que la perception de la douleur, la régulation des propriétés pro inflammatoires dans le système immunitaire, la fonction gastro-intestinale, l'asthme, la fonction cardiaque et respiratoire et les maladies neurodégénératives (Bertin et al., 2014; Caterina et al., 1997; Du et al., 2019; Yamamoto et al., 2007). Les Rs TRPV1 sont activés par la chaleur (> 43 C), la tension, un faible pH, des ions métalliques, tels que Ni²⁺ (Luebbert et al., 2010), des irritants, mais également par plusieurs molécules lipidiques endogènes telles que l'anandamide (AEA) (Zygmunt et al., 1999) et autres endovanniloïdes (Caterina et al., 1997; Samanta et al., 2018). Ces canaux ont une spécificité pour la capsaïcine, molécule conférant les sensations suite à la consommation de piment.

Distribution cérébrale et fonctions des Rs TRPV1

Chez les rongeurs, l'expression du R TRPV1 est localisée dans les zones importantes du cerveau, y compris les neurones dopaminergiques de la substantia nigra, les neurones de l'hippocampe, les neurones hypothalamiques, le cortex, le cervelet, l'amygdale, l'habenula, et autres régions (Acs et al., 1996; Cortright et al., 2001; Cristino et al., 2006; Hayes et al., 2000; Merrill et al., 2012; Mezey et al., 2000; Roberts et al., 2004; Sanchez et al., 2001; Szabo et al., 2002; Toth et al., 2005).

Cette localisation cérébrale permet au R TRPV1 d'être impliqué dans plusieurs fonctions et comportements dans le SNC, tels que la peur, l'anxiété, le stress, la thermorégulation, la douleur et, plus récemment, la plasticité synaptique (Mezey et al., 2000; Roberts et al., 2004). Par exemple, le TRPV1 présynaptique dans l'hippocampe est impliqué dans la plasticité synaptique inhibitrice par les interneurons (Gibson et al., 2008). Ceci suggère un nouveau rôle pour les TRPV1 cérébraux dans des domaines tels que l'apprentissage et la mémoire, la récompense et la dépendance, et le développement (Edwards, 2014).

TRPV1 et drogues d'abus

Plusieurs études ont investigué le rôle du TRPV1 dans l'addiction aux drogues, l'anxiété et la peur (Adamczyk et al., 2012; Blednov and Harris, 2009; Marsch et al., 2007; Tian et al., 2010). En effet, le R TRPV1 est exprimé et activé dans les régions du cerveau impliquée dans l'addiction aux drogues telles que le cortex frontal, l'hippocampe, l'ATV et le striatum (Marinelli et al., 2005; Nguyen et al., 2014). Son activation dans la VTA excite les neurones dopaminergiques et augmente la libération de DA dans le Nac (Marinelli et al., 2005).

Le R TRPV1 peut moduler les récompenses opioïdes (Nguyen et al., 2014). Son inhibition réduit la valeur récompensante de la morphine dans le striatum dorsal des souris ce qui réduit l'AA de

morphine par une diminution de l'activité du Nac chez le rat ; ce blocage pourrait par exemple constituer une nouvelle approche thérapeutique pour la prévention et le traitement de la dépendance aux opioïdes (Hong et al., 2017). De même, le traitement répété rendant les rats dépendants à la métamphétamine, augmente l'expression du TRPV1 dans le cortex frontal chez la souris (Tian et al., 2010).

Concernant l'éthanol, la suppression de TRPV1 chez la souris modifie les effets comportementaux (Blednov and Harris, 2009) en augmentant considérablement la préférence et la consommation d'éthanol puisque la présence du TRPV1 dans les cellules du R du goût et leur réponse à l'éthanol (Lyall et al., 2005) fournissent un mécanisme possible pour l'effet irritant de l'éthanol.

Ainsi, l'expression/activation de TRPV1 affecte le comportement addictif des animaux dépendants aux drogues, incluant la nicotine (Adamczyk et al., 2012; Blednov and Harris, 2009; Hayase, 2011) et soutient le rôle de ce R au niveau cérébral dans l'addiction.

De façon intéressante, des études montrent que ces Rs sont sensibilisé par la nicotine (Liu et al., 2004), molécule clé dans notre étude.

TRPV1 et nicotine

La nicotine dans les produits du tabac non brûlé sont perçus comme amers, aversifs et irritants, ce qui provoque des sensations de brûlure et de picotement dans la bouche (Arendt Nielsen et al., 2016; Dessirier et al., 2001). Ceci est dû à l'activation par la nicotine des neurones du trijumeau sensibles à la capsaïcine (Carstens et al., 1998; Thuerauf et al., 2006). La modulation des Rs TRPV1 par la nicotine induit une augmentation des courants activés par la capsaïcine dans les neurones trijumeaux et dans les cellules possédant des Rs TRPV1 (Liu and Simon, 1996; Liu et al., 2004).

Ces données suggèrent que cette particularité de la nicotine pourrait être un mécanisme qui influence l'irritation causée par la nicotine et pouvant moduler la consommation des produits du tabac la contenant. C'est pourquoi le but général de cette étude est de déterminer si le R vanilloïde TRPV1 peut participer à la régulation de la consommation orale de nicotine et à la mise en place du processus addictif lors de l'exposition orale chronique. Notre hypothèse est que l'absence des R TRPV1 devrait diminuer les effets sensoriels oraux négatifs de la nicotine et augmenter la consommation volontaire de solution de nicotine. Par conséquent, l'imprégnation à de plus grandes quantités de nicotine pourrait *in fine* augmenter ses propriétés motivationnelles et incitatrices. Pour tester cette hypothèse, nous étudions l'effet de la mutation génétique des R TRPV1 chez des souris sur la prise volontaire orale de nicotine édulcorée à la saccharine en chambre opérante, avec modélisation des différents stades du processus addictif.

Matériels et Méthodes

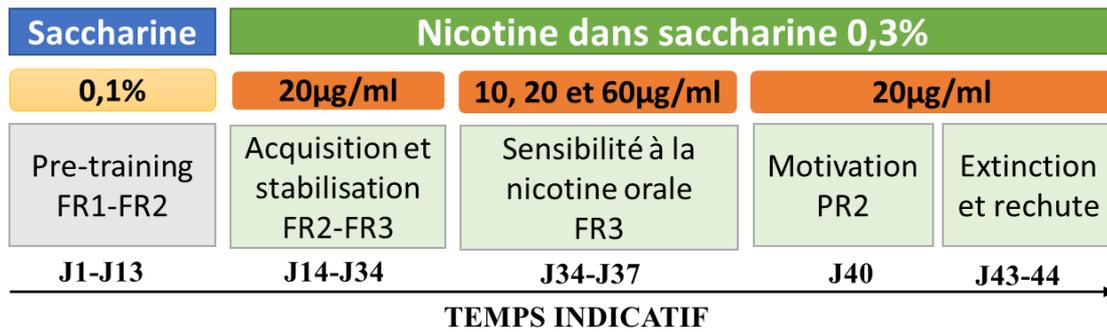


Fig 2: Protocole expérimental: Après pré-entraînement à la solution de saccharine 0.1% (n=46), les différents stades du processus addictifs sont évalués chez des souris WT et KO du R TRPV1: l'acquisition et le maintien du comportement d'AAO sont fait chez les souris assignées aux groupes WT et KO nicotine 20 µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), et WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype). Une fois le comportement stabilisé, la sensibilité, la motivation et la rechute sont respectivement étudiés par une courbe de dose-réponse, un PR2 et un test de rechute.

Pour cette expérience, un total de 46 souris (23 WT et 23 KO) est utilisé. Un pré-entraînement à la saccharine 0.1% est fait avant répartition des souris en 4 groupes : 2 groupes contrôles recevant la solution de saccharine à 0.3% (n=11 souris /génotype (WT et KO)) et deux groupes expérimentaux recevant la nicotine 20 µg/mL/50µL diluée dans la saccharine 0.3% (n=12 souris /génotype (WT et KO)). Les animaux sont entraînés à l'AA journalière de récompenses liquides, phase d'acquisition pendant laquelle ils passent progressivement d'un protocole de renforcement FR2 à FR3 (voir design expérimental Fig.2). Les souris sont ensuite testées pour déterminer leur sensibilité à la nicotine orale (courbe de dose réponse), leur niveau de motivation dans le cadre d'un test par ratio progressif (PR2) et leur rechute à la présentation de la drogue ou du signal lumineux qui leur est préalablement associé. Ceci est fait dans le but de voir la modulation du comportement en fonction des différents traitements et du génotype TRPV1 des souris.

Analyses statistiques

L'effet du traitement et du génotype TRPV1 sur les variables de la réponse opérante en stabilisation et en ratio progressif est évalué par ANOVA factorielle, facteurs indépendants (nicotine et TRPV1).

Les analyses de l'acquisition, de l'effet dose et de la rechute sont faites par ANOVA mesures répétées avec un facteur dépendant de la dose ou du temps et deux facteurs indépendants TRPV1 et nicotine. Au cas où une interaction entre les facteurs existe une analyse post hoc par le test LSD est faite. Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0.05$ pour tous les tests.

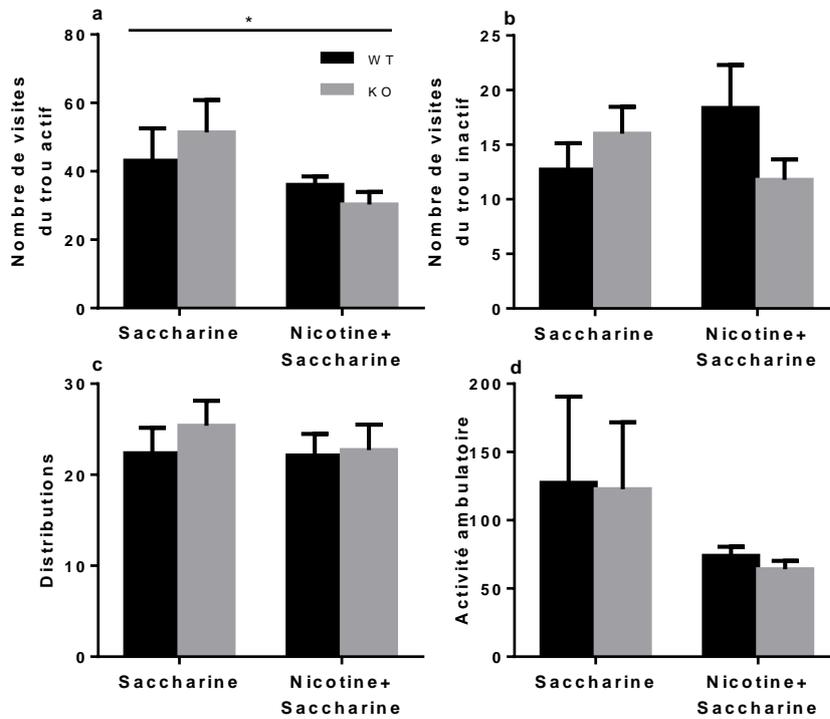


Fig 2.1 : Stabilisation de l'AAO de la solution de saccharine 0.1% en FR2 chez les souris WT et KO du récepteur TRPV1 *a posteriori* assignées aux groupes suivant : WT et KO nicotine 20µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype) ; (a) nombre de visites du trou actif, (b) nombre de visites du trou inactif, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire sur la stabilisation en FR2 30min ; * $p \leq 0.05$ effet principal nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

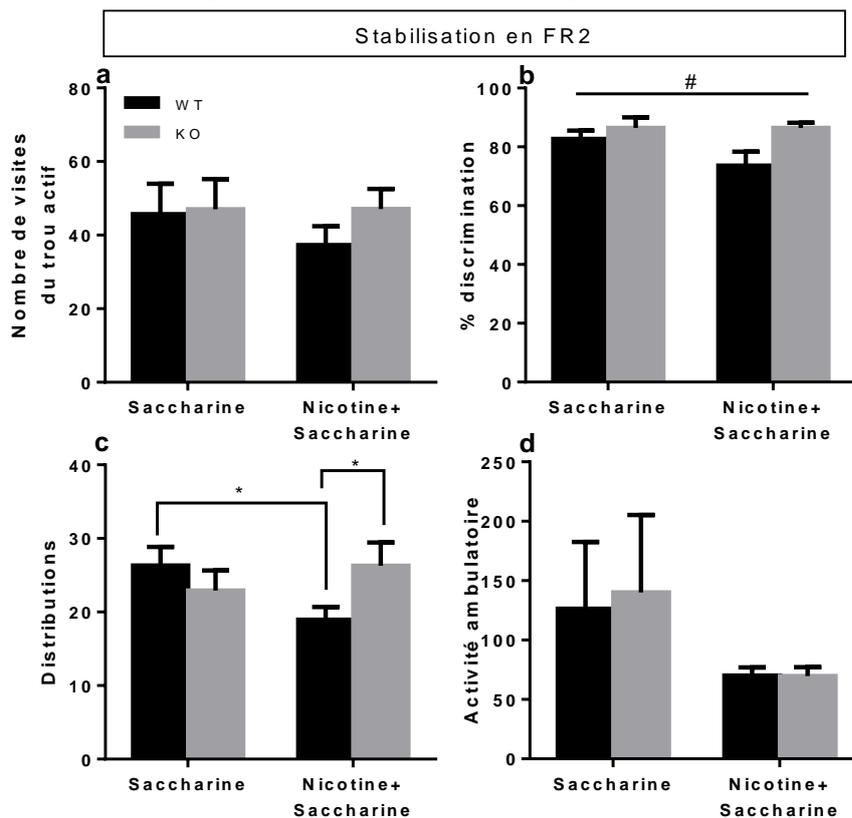
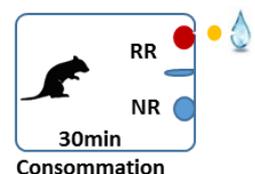


Fig 2.2 : Stabilisation en FR2 de l'AAO de nicotine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype) ; (a) Moyenne du nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) pourcentage de discrimination, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire sur la stabilisation en séances FR2 30min ; # $p \leq 0.05$, effet principal TRPV1 et * $p \leq 0.05$ analyses post hoc LSD. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.



Résultats expérimentaux

1. Pré-entraînement au comportement opérant par exposition à la saccharine 0.1%

Afin de préparer les animaux à une réponse opérante efficace, les souris réalisent d'abord un pré-entraînement à la solution de saccharine 0.1%. Après le même nombre de séances en FR1 et FR2 saccharine, les souris ont été divisées en 4 groupes équivalents dans leurs performances. Les graphiques de la figure 2.1 et l'analyse statistique représentent la stabilisation du comportement en pré-entraînement. Les comparaisons ont été faites par ANOVA factorielle avec 2 facteurs indépendants -Nicotine et TRPV1 pour chacune des 4 variables mesurées.

Ces analyses montrent que les groupes sont *a priori* équivalents avec aucun effet significatif de la présence du R TRPV1 pour toutes les variables comportementales mesurées: nombre de visites du trou actif [F(1,42)=0.03, p=0.86] (fig 2.1a), nombre de visites du trou inactif [F(1,42)=0.34, p=0.56] (fig 2.1b), nombre de distributions de saccharine 0.1% [F(1,42)=0.45, p=0.51] (fig 2.1c) et activité locomotrice ambulatoire [F(1,42)=0.04, p=0.85] (fig 2.1d).

De même, l'analyse ne montre d'effet principal nicotine significatif que pour le nombre de visites du trou actif [F(1,42)=4.3, p=0.044] parmi toutes les variables, sans effet significatif sur le nombre de visites du trou inactif [F(1,42)=0.06, p=0.80], nombre de distributions [F(1,42)=0.30, p=0.59] et activité locomotrice ambulatoire [F(1,42)=2.12, p=0.15].

Aucune interaction TRPV1 x Nicotine n'a été observée pour les variables mesurées, $p > 0.05$, n.s.

2. Rôle du R TRPV1 sur la stabilisation de la prise orale de nicotine

a. Stabilisation en FR2

i. Analyse de la réponse durant la séance

L'analyse des variables comportementales en conditions de séance FR2 a été faite par ANOVA factorielle avec 2 facteurs indépendants -Nicotine et TRPV1 pour chacune des 4 variables mesurées.

Les résultats montrent que la réponse des 4 groupes du le trou actif est similaire et indépendante de la présence ou pas de nicotine [effet nicotine, F(1,42)=0.37, p=0.54] et de l'absence du R TRPV1 [effet TRPV1, F(1,42)=0.66, p=0.42] (fig 2.2a). Pas d'interaction TRPV1 x nicotine pour le nombre des visites du trou actif [F(1,42)=0.39, p=0.53].

En revanche, le pourcentage de discrimination entre les trous actif et inactif n'est pas influencé par la nicotine [effet nicotine, F(1,42)=1.80, p=0.19] mais l'est par l'absence du R TRPV1 qui augmente la discrimination chez les deux groupes KO par rapport aux WT [effet TRPV1 significatif, F(1,42)=5.90, p=0.02] (fig 2.2b). Pas d'interaction TRPV1 x nicotine pour le

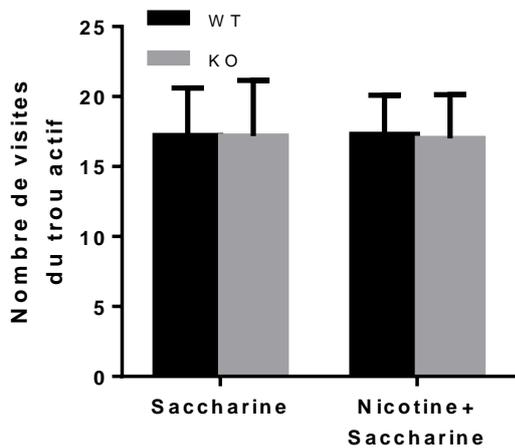


Fig 2.3 : Mesure de la réponse persévérative en FR2 de la nicotine associée à la saccharine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1: WT et KO nicotine 20µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype); Représentation du nombre de visites du trou actif en l'absence de drogue signalée. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

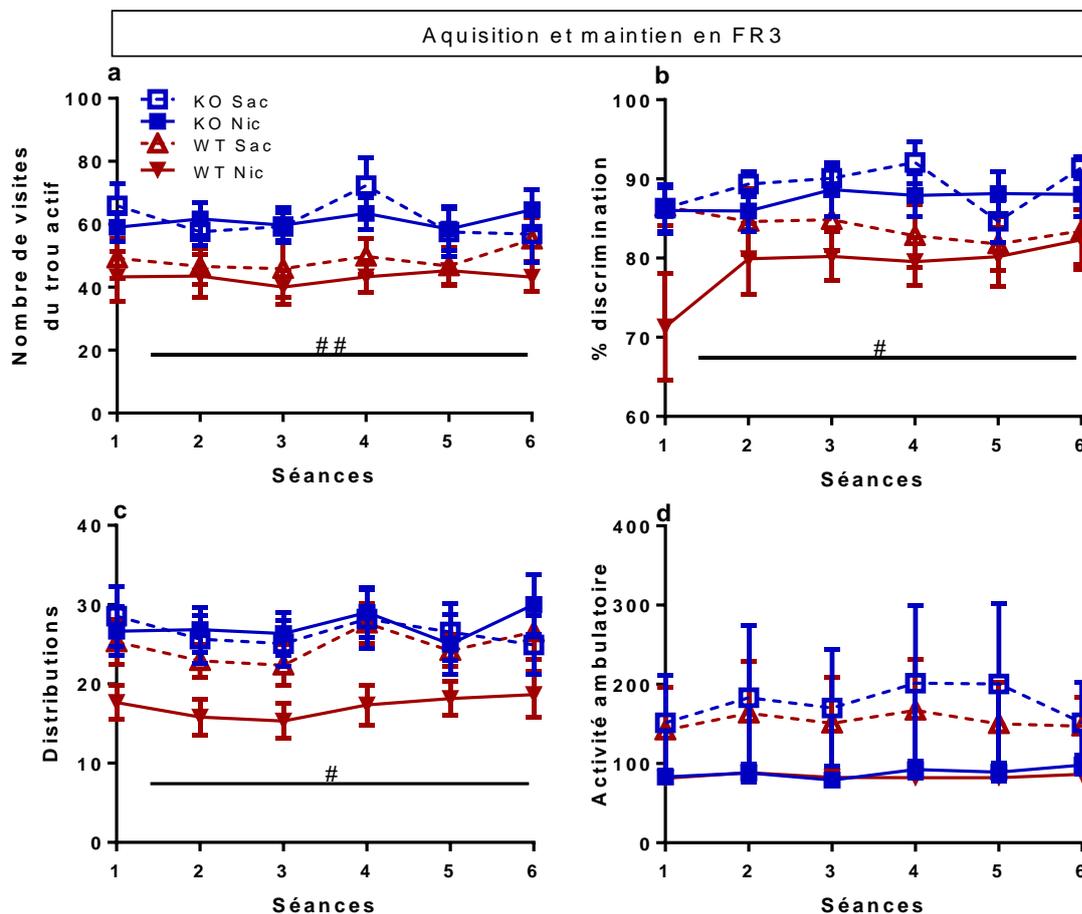
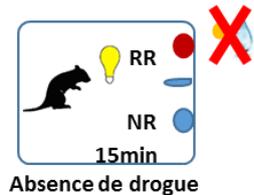
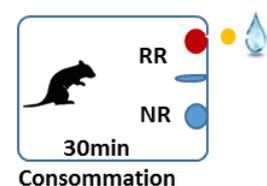


Fig 2.4 : Acquisition de l'AAO en FR3 de la nicotine associée à la saccharine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20 µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype) ; (a) Moyenne du nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) pourcentage de discrimination, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire; # p<0.05, ##p<0.01, effet principal TRPV1. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.



pourcentage de discrimination [$F(1,42)=1.75$, $p=0.20$].

De façon intéressante, l'absence du R TRPV1 promeut la consommation de nicotine. En effet, l'interaction TRPV1 x nicotine est significative pour le nombre de distributions [$F(1,42)=4.27$, $p=0.04$] (fig 2.2c) et l'analyse post-hoc par le test LSD montre que l'absence du R TRPV1 augmente significativement le nombre de distributions par rapport à sa présence chez les souris WT, $26.28\pm 3.16 > 18.94\pm 1.72$, $p=0.047$. En plus, cette analyse montre que l'ajout de la nicotine diminue le nombre de distributions de la solution de saccharine chez les souris wild type (WT nicotine+saccharine, $18.94\pm 1.74 < WT$ saccharine 26.30 ± 2.56 , $p=0.05$), en gardant un nombre de distributions identique en l'absence du R TRPV1 (KO nicotine+saccharine, $26.28\pm 3.16 \equiv KO$ saccharine 22.91 ± 2.73 , $p=0.36$).

Enfin, l'absence du R TRPV1 est sans effet sur l'activité ambulatoire [$F(1,42)=0.02$, $p=0.88$] et la présence de nicotine dans les récompense liquides ne modifie pas non plus la locomotion des souris [effet nicotine, $F(1,42)=2.32$, $p=0.14$] (fig 2.2d). Enfin, il n'y a pas interaction TRPV1 x nicotine pour l'activité ambulatoire [$F(1,42)=0.03$, $p=0.87$].

ii. Analyse de la réponse persévérative

La mutation du R TRPV1 n'influence pas la réponse persévérative par les visites du trou actif en l'absence de drogue signalée, que la nicotine soit présente ou non : interaction TRPV1 x nicotine [$F(1,42)=0.0017$, $p=0.97$, n.s] (fig 2.3).

b. Acquisition et stabilisation en FR3

Après une robuste stabilisation en FR2, nous avons augmenté la demande de travail et avons passé le renforcement sur un FR3. L'analyse de l'acquisition sur l'ensemble des séances a été faite par ANOVA mesures répétées avec un facteur dépendant séance et deux facteurs indépendants TRPV1 et nicotine.

i. Analyse de la réponse durant la séance

L'analyse du nombre de visites du trou actif durant les séances montre que l'absence du R TRPV1 renforce le comportement d'AAO, [effet TRPV1, $F(1,42)=8.32$, $p=0.006$], que la nicotine soit présente ou non [effet nicotine, $F(1,42)=0.34$, $p=0.56$]. Il n'existe pas d'interaction TRPV1 x nicotine, $p>0.05$, n.s et les groupes évoluent de façon similaire au cours des séances, [interaction Séance x TRPV1 x groupe, $F(5,210)=1.12$, $p=0.35$] (fig 2.4a).

Il en est de même pour le pourcentage de discrimination qui est plus élevé en l'absence du R TRPV1, [effet TRPV1, $F(1,42)=5.79$, $p=0.02$]. On n'observe pas d'effet nicotine ni d'interactions TRPV1 x nicotine sur le % de discrimination tout au long des séances, $p>0.05$, n.s (fig 2.4b).

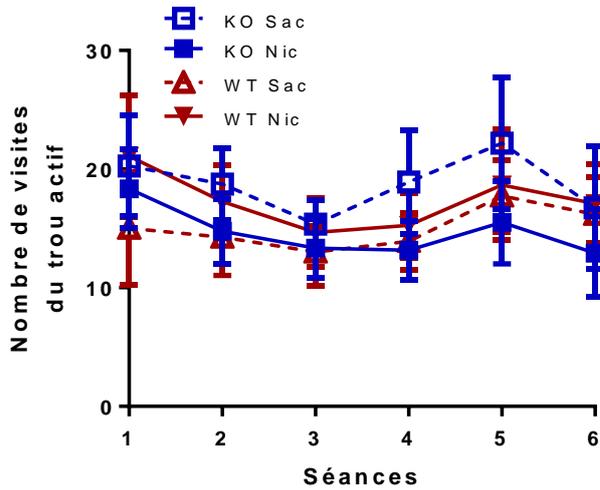


Fig 2.5 : Mesure de la réponse persévérative en FR3 de la nicotine associée à la saccharine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype) ; Représentation du nombre de visites du trou actif en l'absence de drogue signalée. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

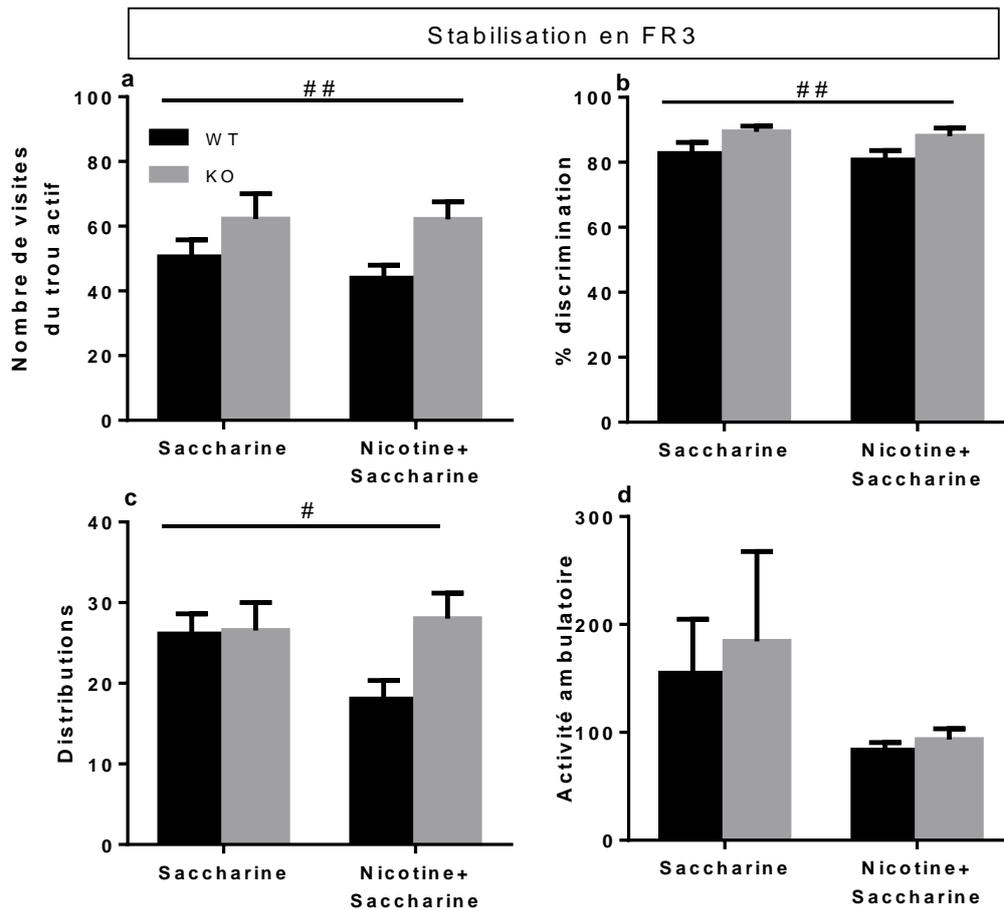
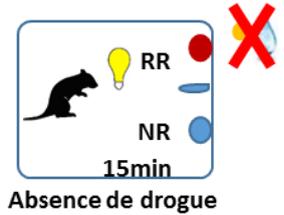
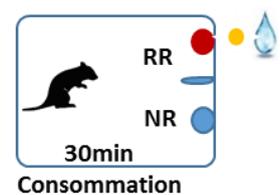


Fig 2.6: Stabilisation en FR3 de l'AAO de la nicotine associée à la saccharine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype) ; (a) Moyenne du nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) pourcentage de discrimination, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, effet principal TRPV1. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.



Cet effet de la mutation du R TRPV1 reste accentué pour le nombre de distributions qui augmente chez les souris KO par rapport à leurs congénères WT, [effet TRPV1, $F(1,42)=4.92$, $p=0.03$], indépendamment de la consommation de nicotine ou pas [effet nicotine, $F(1,42)=1.65$, $p=0.20$] (fig 2.4c). Il n'existe pas d'interaction TRPV1 x nicotine, [$F(1,42)=2.54$, $p=0.12$] et les groupes évoluent leur nombre de distributions de façon similaire au cours des séances, [interaction Séance x TRPV1 x groupe, $F(5,210)=1.23$, $p=0.30$, n.s].

Enfin, l'activité locomotrice ambulatoire n'est altérée ni par la suppression du R TRPV1, ni par la nicotine, $p>0.05$, n.s. Les animaux sont ainsi équivalents en locomotion et aucune interaction n'existe entre les facteurs, séance x TRPV1 x nicotine, $p<0.05$, n.s (fig 2.4d).

ii. Analyse de la réponse persévérative

La réponse persévérative sur le trou actif en l'absence de drogue signalée n'est pas modifiée par l'élimination du R TRPV1, ni par la présence de nicotine dans la récompense liquide, $p>0.05$, n.s. Ainsi, les 4 groupes sont équivalents pour cette variable au cours des séances de FR3, [interaction Séance x TRPV1 x groupe, $F(5,210)=0.14$, $p=0.98$, n.s] (fig 2.5).

a. Stabilisation en FR3

i. Analyse de la réponse durant la séance

L'analyse des variables comportementales en sur la stabilisation en FR3 a été faite par ANOVA factorielle avec 2 facteurs indépendants -Nicotine et TRPV1 pour chacune des 4 variables mesurées.

Les résultats montrent que l'absence du R TRPV1 promeut le comportement et ceci se voit au niveau de plusieurs variables de l'AAO.

En effet, les souris KO TRPV1 ont une réponse plus élevée sur le trou actif durant la séance, [effet TRPV1, $F(1,42)=8.77$, $p=0.005$]. Le nombre effectué de visites du trou actif ne se montre pas influencé par la présence de la nicotine ou son absence [effet nicotine, $F(1,42)=0.81$, $p=0.37$] et on n'observe pas d'interaction TRPV1 x nicotine, $p>0.05$, n. s, (fig 2.6a).

De même, les souris mutées du R TRPV1 sont plus efficaces dans la discrimination entre les trous actif et inactif, [effet TRPV1, $F(1,42)=7.94$, $p=0.007$] indépendamment de la présence ou l'absence de nicotine et sans interaction entre les deux facteurs ($p>0.05$, n.s) (fig 2.6b).

De façon intéressante, l'absence du R TRPV1 promeut l'AAO globale avec un nombre de distributions qui augmente, [effet TRPV1, $F(1,42)=6.19$, $p=0.017$] (fig 2.6c). Cette augmentation est similaire chez les groupes recevant la nicotine ou pas, effet nicotine et interaction TRPV1 x nicotine, $p>0.05$, n.s.

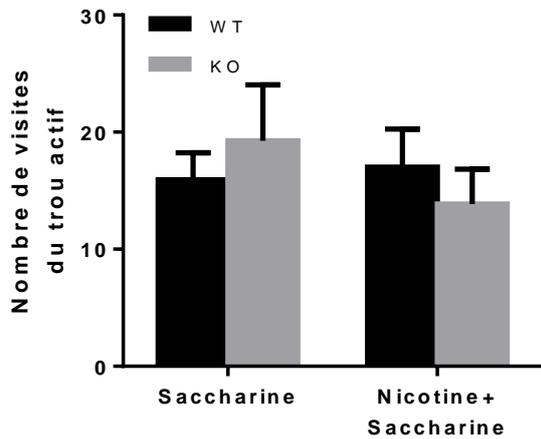


Fig 2.7 : Mesure de la réponse persévérative en FR3 de la nicotine associée à la saccharine chez des souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20 µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype); Représentation du nombre de visites du trou actif en l'absence de drogue signalée. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

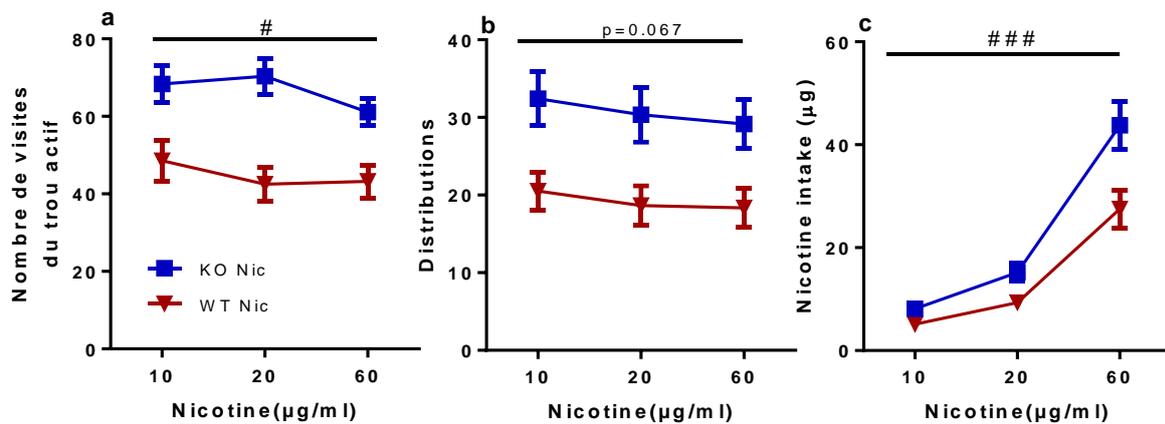


Fig 2.8: Effet dose-réponse de la nicotine à 10, 20 et 60 µg/mL, chez les WT et KO du récepteur TRPV1 (n=12/génotype); (a) nombre de visites du trou actif, (b) nombre de distributions, (c) consommation de nicotine (µg) ; # p≤0.05, ### p<0.001, effet principal dose. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

Enfin, l'activité ambulatoire n'est pas altérée par l'absence ou la présence du R TRPV1 et de la nicotine, et aucune interaction n'existe [TRPV1 x nicotine, $F(1,42)=0.066$, $p=0.80$] (fig 2.6d).

i. Analyse de la réponse persévérative

Les 4 groupes présentent une réponse persévérative équivalente par les visites du trou actif en l'absence de drogue signalée, sans effet TRPV1 [$F(1,42)=0.015$, $p=0.90$], nicotine [$F(1,42)=0.77$, $p=0.38$] ou interaction TRPV1 x nicotine [$F(1,42)=1.60$, $p=0.21$] (fig 2.7).

3. Dose réponse à la nicotine: la mutation TRPV1 produit un déplacement de la courbe vers le haut

L'effet-dose de la nicotine a été évalué pour les 3 différentes concentrations suivantes : 10, 20 et 60 $\mu\text{g/mL}$, associée à la saccharine à 0.3%.

Les analyses par ANOVA mesures répétées montrent que l'absence du R TRPV1 permet un comportement d'AAO facilité, mesuré par l'augmentation du nombre de visites du trou actif [effet TRPV1, $F(1,22)=14.11$, $p=0.001$] de façon dépendante de la dose de nicotine [effet dose, $F(2,44)=3.67$, $p=0.03$] (fig 2.8a). On n'observe cependant pas d'interaction TRPV1 x doses pour le nombre de visites du trou actif [$F(2,44)=2.50$, $p=0.09$].

De même, l'absence du TRPV1 augmente le nombre de distributions [effet TRPV1, $F(1,22)=8.37$, $p=0.01$] avec une tendance à l'effet dose, [$F(2,44)=2.88$, $p=0.067$]. L'interaction TRPV1 x nicotine n'est pas significative, $p>0.05$, n.s (fig 2.8b).

Cette modification dose dépendante de la réponse opérante montre que les souris KO consomment plus de nicotine que les WT [effet TRPV1 sur la quantité de nicotine consommée, $F(1,22)=7.99$, $p=0.01$] mais que ceci n'a pas résulté en une titration des souris puisque l'analyse montre une augmentation de la prise de nicotine consommée [effet « dose », $F(2,44)=122.02$, $p<0.001$] (fig 2.8c). Enfin, il existe une interaction TRPV1 x doses pour la prise de nicotine, [$F(2,44)=6.29$, $p=0.004$].

L'analyse post hoc montre que toutes les prises sont différentes entre elles de façon croissante et proportionnelle à la dose en l'absence du R TRPV1 : 10 ($8.1\pm 0.87 \mu\text{g}$) < 20 ($15.2\pm 1.76 \mu\text{g}$) < 60 $\mu\text{g/mL}$ ($43.8\pm 4.69 \mu\text{g}$). Les prises aux doses de 10 ($5.1\pm 0.6 \mu\text{g}$) et 20 ($9.3\pm 1.26 \mu\text{g}$) sont aussi différentes de celle de 60 ($27.5\pm 3.76 \mu\text{g}$) pour les animaux de génotype WT.

En effet, l'absence du R TRPV1 permet une prise de nicotine plus importante à la plus forte dose de 60 $\mu\text{g/mL}$ (KO, $43.8\pm 4.69 \mu\text{g}$ vs. WT, $27.5\pm 3.76 \mu\text{g}$).

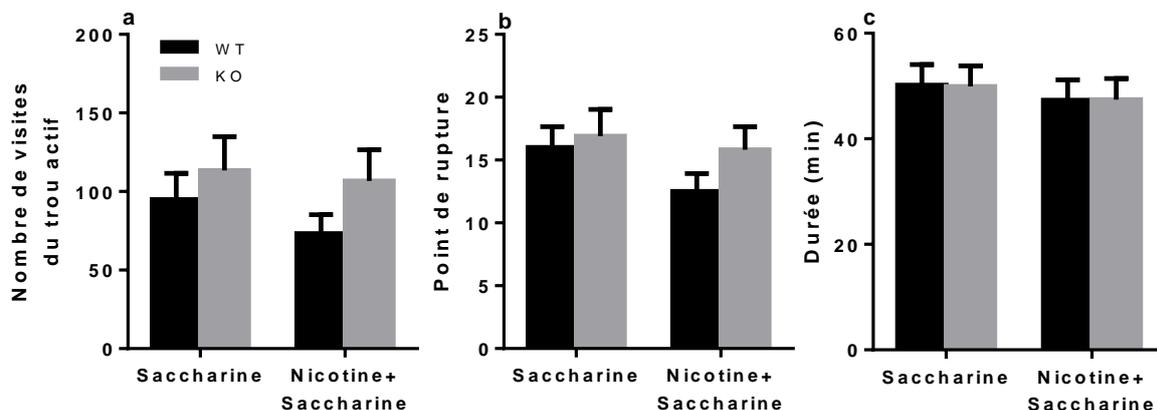


Fig 2.9: Modulation des propriétés incitatives de la nicotine par le R TRPV1 chez les souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype); (a) nombre de visites du trou actif, (b) point de rupture, (c) durée du PR (min) ; Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

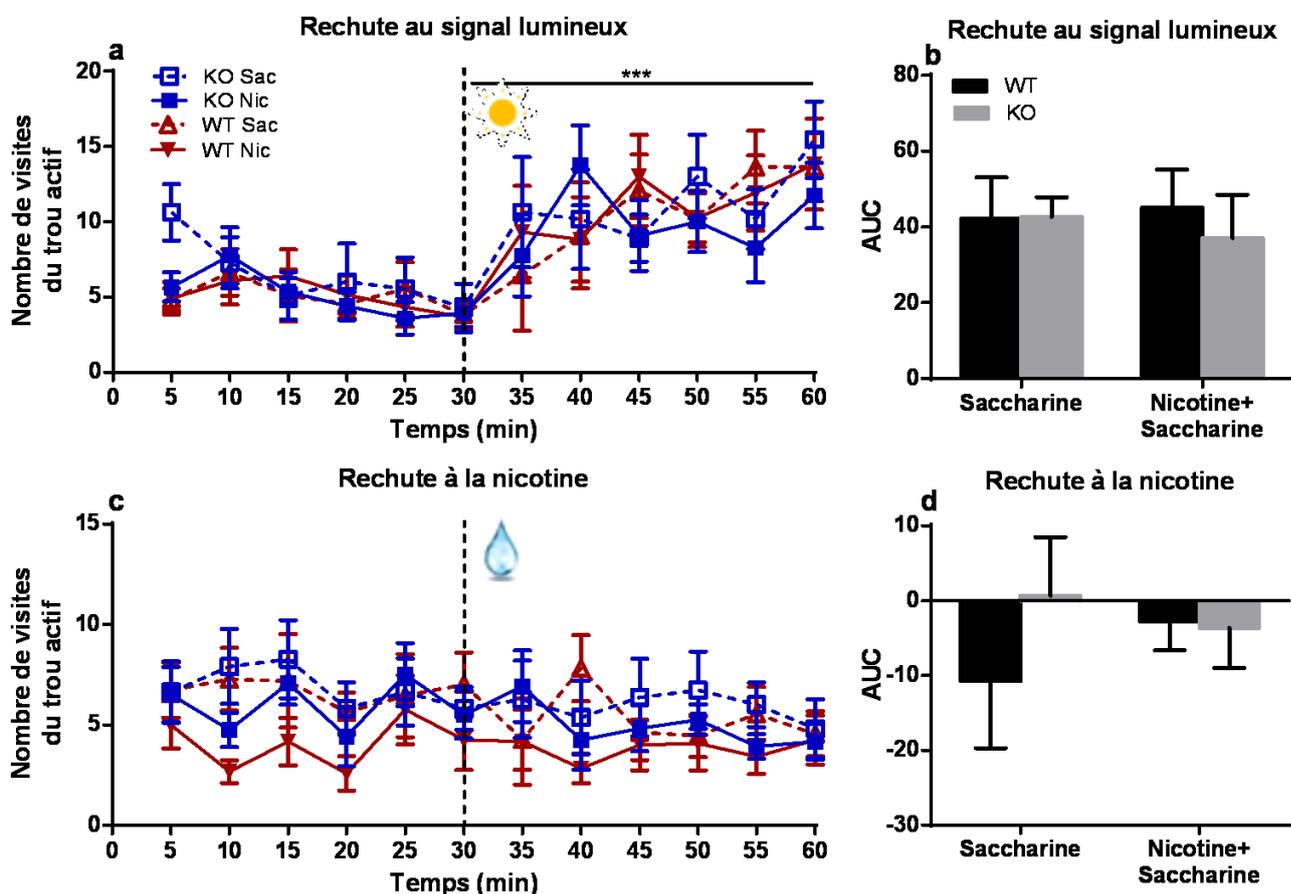


Fig 2.10 : Réinstallation du comportement d'AAO de nicotine par la présentation du signal lumineux préalablement associé à la drogue (a,b) ou à la présentation de la drogue (c, d) ; Souris WT et KO du récepteur TRPV1 : WT et KO nicotine 20 µg/mL dans saccharine 0.3% (n=12/génotype), WT et KO saccharine 0.3% (n=11/génotype); (a) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute au signal lumineux, (b) Aire sous la courbe (AUC) des visites du trou actif durant la période de réinstallation, (c) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute à la drogue (d) Aire sous la courbe (AUC) des visites du trou actif durant la période de réinstallation; ***p<0.001 effet principal du temps sur les visites du trou actif (30-60min) ; Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

4. Performances motivationnelles non modifiées par l'absence du R TRPV1

L'analyse par ANOVA factorielle des paramètres de la réponse comportementale en PR2 montre que la performance de nos groupes est équivalente pour ce test motivationnel.

En effet, l'absence du R TRPV1 ne change pas la motivation des souris qui font le même nombre de visites du trou actif [effet TRPV1, $F(1,42)=2.14$, $p=0.15$], indépendamment de la présence de la nicotine [effet nicotine, $F(1,42)=0.63$, $p=0.43$]. L'interaction TRPV1 x nicotine n'est pas significative, $p>0.05$, n.s (fig 2.9a).

Il en est de même pour le point de rupture motivationnel avec des effets TRPV1 [$F(1,42)=1.44$, $p=0.24$], nicotine [$F(1,42)=1.68$, $p=0.20$] et interaction TRPV1 x nicotine non significatifs (fig 2.9b).

Enfin, la durée du PR n'est pas altérée par l'absence du R TRPV1 [$F(1,42)=0.0006$, $p=0.98$], ni par la présence de la nicotine [$F(1,42)=0.46$, $p=0.50$] (fig 2.9c). L'interaction TRPV1 x nicotine est non significative, $p>0.05$, n.s.

5. Étude du comportement de réinstallation de recherche de nicotine induit par la drogue ou par les stimuli associés à la prise de drogue

a. Rechute induite par la présentation du stimulus lumineux associé à la récompense

L'analyse de la rechute par ANOVA mesures répétées avec un effet dépendant temps et deux effets indépendants TRPV1 et nicotine montre que la présentation du signal lumineux préalablement associé à la disponibilité de la drogue induit une réinstallation significative du comportement de recherche chez tous les groupes. Cette rechute est mesurée par l'augmentation du nombre de visites du trou actif : effet principal significatif du temps [$F(6,252)=9.48$, $p<0.001$] (fig 2.10a).

Ni l'absence du R TRPV1 [$F(1,42)=0.01$, $p=0.91$] ni la présence de nicotine [$F(1,42)=0.07$, $p=0.79$] n'ont eu un effet sur ce comportement. De même, l'interaction TRPV1 x nicotine n'est pas significative [$F(1,42)=0.18$, $p=0.67$].

L'analyse par l'aire sous la courbe (AUC) calculée sur la période qui suit la présentation du signal lumineux (30-60minutes) ne montre aucun effet TRPV1, nicotine ou interaction TRPV1 x nicotine significatifs, $p>0.05$, n.s (fig 2.10b).

b. Rechute induite par la présentation de la récompense liquide

La présentation de la récompense liquide gratuite dans l'abreuvoir ne provoque pas la réinstallation du comportement de recherche de la drogue : effet principal du temps [$F(6,252)=0.68$, $p=0.66$], n.s.

Aucun effet du TRPV1 [$F(1,42)=0.53$, $p=0.47$] ou de la nicotine [$F(1,42)=1.42$, $p=0.24$] n'ont été observés. L'interaction TRPV1 x nicotine n'est pas significative [$F(1,42)=0.1$, $p=0.75$] (fig 2.10c).

L'analyse par l'AUC calculée sur la période qui suit la présentation de la récompense liquide dans l'abreuvoir (30-60minutes) ne montre aucun effet TRPV1, nicotine ou interaction TRPV1 x nicotine significatifs, $p>0.05$, n.s (fig 2.10d).

Discussion

Principaux résultats

Nos résultats montrent que l'absence du R TRPV1 promeut la consommation de nicotine et renforce le comportement d'AAO.

Les souris KO semblent trouver la récompense nicotinique plus appétitive et renforçante; ainsi, on a observé une augmentation du pourcentage de discrimination et de la consommation de nicotine chez ces souris par rapport aux souris WT. On n'observe cependant pas de renforcement secondaire par la nicotine sur la saccharine seule aux doses de nicotine utilisées puisque l'absence du R TRPV1 ne modifie pas l'AA de la solution de saccharine. En effet, les souris KO maintiennent la prise de saccharine 0.3% après l'ajout de nicotine (20 µg/mL) suggérant que la palatabilité reste intacte pour ces souris KO. Notre hypothèse est que les souris KO seraient moins sensibles au goût aversif de la nicotine orale. En revanche, chez les WT, l'ajout de la nicotine diminue l'AAO de saccharine, confirmant une réduction de la palatabilité de la solution et suggérant le développement d'une aversion.

L'effet dose montre que les souris KO détectent la nicotine et le changement de la concentration comme les WT. Ils sont par contre moins sensibles aux effets aversifs, ce qui leur permet de garder un niveau d'AAO et une prise de nicotine plus importants que les WT.

L'absence du R TRPV1 semble sans conséquence sur les propriétés motivationnelles de la nicotine et sur la réinstallation du comportement de recherche de drogue en son absence.

Discussion

Les ingrédients des épices et autres irritants sont piquants et produisent des sensations communes telles que brûlures, picotement et chaleur (Tornwall et al., 2012); ceci est dû à leur stimulation du nerf trijumeau au niveau de la bouche ou du nez (Liu and Simon, 1994). Des processus analogues sont susceptibles de se produire lorsque la nicotine est placée dans la bouche, ce qui entraîne la sensation irritante qui accompagne la consommation des produits du tabac. Les Rs TRPV1 sont important dans la perception gustative et orosensorielle (Prescott and Stevenson, 1995).

Nos résultats concordant avec une partie des résultats de Saunders et collègues (Saunders et al., 2013) qui montrent que les souris C57Bl/6J WT présentent des comportements aversifs à toutes les substances irritantes du trijumeau incluant la nicotine parmi les autres (amyl acétate, benzaldéhyde, cyclohexanone, toluène, acide acétique, capsaïcine et eugenol). Cette aversion est mesurée par un score attribué à l'approche ou l'évitement du stimulus à la présentation de ces irritants sous forme de vapeur ou d'un coton-tige imbibé (Cotton-swab test). Nos effets par AAO sont en revanche contradictoires avec cette étude qui montre que la réponse des souris KO TRPV1 à la nicotine ne différerait pas de celle des WT, indiquant que ces souris sont capables de détecter et de réagir normalement aux irritants du trijumeau sauf la capsaïcine. Ces résultats s'expliquent

par la différence de la porte d'entrée et de la stimulation des Rs oraux et centraux dans notre cas versus la stimulation uniquement du système du trijumeau dans leur étude.

L'hypothèse d'une action centrale post-orale de la nicotine peut entraîner nos effets observés, notamment la promotion de la consommation de nicotine. De façon importante, les Rs TRPV1 ont des ligands centraux communs (tels que l'anandamide, AEA) avec d'autres systèmes tels que le système cannabinoïde (Di Marzo et al., 1998; Howlett and Mukhopadhyay, 2000; Vriens et al., 2009; Zygmunt et al., 1999). Les Rs TRPV1 et Rs aux cannabinoïdes CB1 sont co-exprimés dans plusieurs régions cérébrales telles que le PFC, le shell du Nac, l'hippocampe et l'amygdale (Micalé et al., 2009). Cette co-localisation leur permet de jouer un rôle encore plus important dans les comportements addictifs et explique l'interaction de ces deux systèmes dans la modulation de plusieurs fonctions cellulaires (Caterina et al., 1997). Le système endocannabinoïde a été étudié dans le cadre de la dépendance à la nicotine. Par exemple, l'inhibition de l'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH) réduit la réinstallation du comportement de recherche de la nicotine mais non pas la motivation (Forget et al., 2009). De même, l'exposition chronique à la nicotine est associée à une modulation des concentrations cérébrales en AEA, au niveau du tronc cérébral, hippocampe, striatum et cortex. La nicotine produit alors différents changements dans la transmission des endocannabinoïdes. Dans le cas de l'alcool et de la nicotine, une augmentation commune des teneurs en AEA dans le cerveau antérieur limbique a été observée. Ceci est important étant donné que le système limbique est un domaine clé pour les propriétés renforçantes des drogues, ce qui pourrait favoriser l'implication de la transmission d'endocannabinoïdes dans certains événements spécifiques du système de récompense activé par la nicotine et l'éthanol (Gonzalez et al., 2002).

En effet, des études par Naassila et al., suggèrent que les Rs CB1 participent à la régulation de la consommation orale d'éthanol et démontrent que leur absence conduit à une sensibilité accrue à l'éthanol et à une sévérité accrue du sevrage (Naassila et al., 2004). Aussi, les souris KO du R CB1 montrent une réduction de la CPP induite par l'éthanol et une augmentation du nombre des Rs dopaminergiques (D2) au niveau du striatum (Houchi et al., 2005). De façon intéressante, les souris CB1 - / - ont montré un comportement normal d'AA pour la cocaïne, la d-amphétamine et la nicotine (Cossu et al., 2001).

Etant donné que le R TRPV1 est également activé par l'éthanol, il peut induire des comportements induits par l'éthanol. En effet, les souris TRPV1 - / - ont une préférence et une consommation d'éthanol (Blednov and Harris, 2009) plus grandes que les souris WT. Ceci rejoint notre étude et l'augmentation de la consommation de nicotine chez les KO TRPV1. D'autres investigations ont également signalé une réduction de l'évitement de l'éthanol chez les souris KO TRPV1 (Ellingson

et al., 2009). Ces Rs ont aussi été étudiés pour leur implication dans les comportements dépressifs induits par la nicotine (Hayase, 2011).

L'exposition des données ci-dessus suggère l'implication de TRPV1 et des systèmes qui lui sont associés dans les comportements addictifs en général et non seulement pour la nicotine et l'alcool. Des études par Marinelli et al. suggèrent que le R TRPV1 joue un rôle synaptique et comportemental dans le circuit de la récompense et pourrait être impliqué dans l'addiction au niveau du Nac (Marinelli et al., 2005). En effet, il a été démontré que le Nac, région critique dans la médiation de la rechute aux opioïdes exprimait le TRPV1 (Micale et al., 2009; Roberts et al., 2004) et que la libération de dopamine dans le Nac peut également être facilitée par l'activation glutamatergique des TRPV1 des neurones dopaminergiques situés dans l'ATV, activant ainsi le Nac suite à une stimulation nociceptive (Marinelli et al., 2005; Musella et al., 2009). En intégrant de multiples voies de signalisation, le R TRPV1 semble affecter la libération d'autres neurotransmetteurs, tels que le GABA, la DA et d'autres catécholamines, impliqués dans plusieurs aspects des fonctions neuronales et gliales (Marchalant et al., 2009; Xing and Li, 2007). Cela renforce encore le rôle de TRPV1 dans les circuits de récompense. Le blocage de ces Rs dans le Nac inhibe l'expression de la CPP persistante à la morphine chez les rats (Heng et al., 2014). De même, l'antagonisme du TRPV1 diminue le comportement de recherche de cocaïne provoqué par la drogue elle-même (Adamczyk et al., 2012). L'activation directe des Rs TRPV1 peut aussi induire une baisse de l'activité locomotrice (Di Marzo et al., 2001). Dans notre étude, l'absence du R TRPV1 n'a cependant pas modifié l'activité locomotrice ambulatoire.

Enfin, dans cette étude, l'implication du R TRPV1 est claire dans la modulation du processus addictif par la nicotine puisque son absence augmente la prise. Ceci n'exclut pas des mécanismes de stimulation indépendants du TRPV1 comme la détection de la nicotine par les nAChRs (Alimohammadi and Silver, 2000) ou TRPA1 (Talavera et al., 2009). En effet, la nicotine active plusieurs systèmes sensoriels, y compris des voies gustatives, et est décrite comme étant une substance amère déclenchant des réponses nerveuses du trijumeau avec des sensations de brûlure dans la bouche et le nez (Thuerauf et al., 2006). Ces réponses sont éliminées par la mécamylamine, un antagoniste sélectif des nAChRs (Alimohammadi and Silver, 2000; Hummel et al., 1992; Thuerauf et al., 2006).

D'autres études suggèrent une indépendance et séparation des mécanismes d'irritation par la nicotine et la capsaïcine, donc la non-implication des Rs TRPV1 dans les effets irritants de la nicotine. Ainsi, la mécamylamine, inhibe l'irritation due à la nicotine mais non celle déclenchée par la capsaïcine au niveau de la langue (Dessirier et al., 1998). L'irritation orale due à la nicotine serait alors médiée par les nAChRs neuronaux alors que la capsaïcine active les fibres du trijumeau

via les TRPV1. Notre étude démontre clairement un rôle du TRPV1 dans la modulation de la consommation de la nicotine orale.

Les interactions entre la nicotine et d'autres composés activant les Rs au goût est intéressante au niveau oral comme au niveau des voies centrales et respiratoires puisque les cellules épithéliales des voies intra pulmonaires co-expriment les nAChRs et des molécules impliquées dans la transduction du signal gustatif amer et de l'irritation (Dehkordi et al., 2010).

En conclusion, notre travail soutient l'importance des réponses orosensorielles induites par la nicotine (Etter, 2016c) et leur pertinence pour le développement et le maintien de la dépendance aux produits du tabac. Ainsi, la mutation du R TRPV1, parmi d'autres, constitue un facteur de vulnérabilité à une consommation accrue de nicotine.

Chapitre 2

Rôle des additifs aromatiques dans l'auto-administration orale de nicotine chez la souris

Study of flavored nicotine oral self-administration in mice

Salma Tannous^{1,2}, Florence Darlot^{1,2}, Stéphanie Caille*^{1,2},

¹ Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, BP31, F-33076 Bordeaux, France

² CNRS, UMR 5287-Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, F-33076 Bordeaux, France

*Corresponding author :

Stéphanie Caille, CNRS-UMR5287, Université de Bordeaux BP31, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail address: stephanie.caille-garnier@u-bordeaux.fr

Abstract

Rationale: Tobacco products are very addictive, partly because they contain nicotine but also because of non-pharmacological factors that may enhance consumption and abuse potential. Nowadays, new electronic nicotine delivery devices contain added flavors which play a critical role by increasing products attractiveness in never smokers and adolescents. Bidirectional interactions between these additives and nicotine are poorly understood.

Objectives: The aim of this study is to investigate oral combination of flavors and nicotine. We want to understand how flavors may mask nicotine' bitter taste and reciprocally, how nicotine may reinforce flavors associated to its consumption which ultimately, may enhance of voluntary oral self-administration.

Methods: In the first experiment, we studied the effect of added flavors on nicotine palatability in a bottle-choice preference tests. In the second part, we characterized the different features of flavored nicotine oral self-administration in mice.

Results: Our results show that added flavors increase oral nicotine palatability and allow acquisition and maintenance of nicotine oral self-administration. We demonstrate mice sensitivity to oral sensory input changes regarding the reward. Nevertheless, we did not see any increase of vanilla incentive value by nicotine, compared to flavor alone that was surprisingly reinforcing.

Conclusions: Flavors increase nicotine consumption and help maintaining addiction processes in mice. Moreover, flavors can be very attractive and can have high incentive value by themselves.

Keywords: addiction, nicotine, flavor, e-cigarettes, (oral) liquid self-administration, mice, tobacco, vanilla, operant-conditioning.

Introduction

Nicotine, the primary psychoactive molecule in tobacco products, is the drug of abuse with the highest addictive potential despite its weak reinforcing effects (Anthony et al., 1994; Shaffer, 1986; Chaudhri, Caggiula, Donny, Palmatier, et al., 2006). When presented orally, nicotine has a bitter taste that usually causes avoidance (Smith & Roberts, 1995; Flynn, Webster, & Ksir, 1989) yet, it continues to be consumed.

Interestingly, nicotine does not exist alone in tobacco products and is almost all the time associated with various flavors. Indeed, flavored tobacco products, especially electronic cigarettes, contain many additives (more than 7000) (Zhu et al., 2014) including sugar, strawberry, licorice, menthol, vanilla, chocolate, candies and cakes- most of which have not been tested or validated as non-toxic/non-reinforcing after chronic exposure from electronic devices. These chemicals mask nicotine's bitter and aversive properties and confer each product its character by modulating harshness and astringency (Harris et al., 2019). In fact, many preclinical studies in rodents confirmed that taste is an important determinant of voluntary tobacco consumption (Ksir, 1983; Robinson, Grun, Pauly, & Collins, 1996). Indeed, experiments have shown that sweet additives (sucrose) or cues (menthol) associated with nicotine help acquiring and maintaining nicotine self-administration (Caggiula et al., 2009) and that their value and preference is enhanced by their association with nicotine (Grimm, Ratliff, North, Barnes, & Collins, 2012; Smith & Roberts, 1995). Specifically, menthol additive is largely studied for its pro-addictive and pro-attractive effects on nicotine. On one hand, recent data show that, by systemic administration of menthol, an interaction of this substance and central effects of nicotine occurs to modulate nicotine self-administration and relapse vulnerability (Biswas et al., 2016; Nesil, Narmeen, Bakhti-Suroosh, & Lynch, 2019; Harrison et al., 2017) and facilitate the effects of this drug on the brain dopaminergic (in the nucleus accumbens) (Zhang, Harrison, Biswas, Tran, & Liu, 2018) and cholinergic (Henderson et al., 2017) systems. On the other hand, menthol and sucrose given orally and paired with nicotine intravenous self-administration increased behavior compared to nicotine alone self-administration; they also reversed oral nicotine aversion in a two-bottle choice test (Wickham et al., 2018; Wang, Wang, & Chen, 2014).

Tobacco products composition studies confirmed that high intensity sweeteners are present in smokeless tobacco like snus and snuff (Miao, Beach, Sommer, Zimmerman, & Jordt, 2016). Also, clinical association of sweeteners with other compounds that normally elicit aversive reactions (quinine and caffeine for example) reduced aversion scores and enhanced palatability, especially in kids (Mennella & Bobowski, 2015; Mennella, Spector, Reed, &

Coldwell, 2013). This positive switch in preference and reduction of toxic-harm perception increases attractiveness of tobacco products, particularly in youth, vulnerable populations and non-smokers (Carpenter, Wayne, Pauly, Koh, & Connolly, 2005; Bunch et al., 2018; Yerger, 2011) (McMillen, Gottlieb, Shaefer, Winickoff, & Klein, 2015). In addition to that, young adults were more motivated for fruit or desert-flavored e-cig compared to non-flavored liquids containing nicotine (Audrain-McGovern, Strasser, & Wileyto, 2016) and e-liquids that were perceived as sweetened enhanced e-cig attractiveness (Goldenson et al., 2016). By enhancing product appeal, repeated exposure and increased nicotine exposure are encouraged, facilitating acceptability and transition to abusive consumption and addiction (Alpert, Agaku, & Connolly, 2016; Vogel, Prochaska, Ramo, Andres, & Rubinstein, 2019). Indeed, preclinical studies showed an escalation of nicotine self-administration by nicotine vapor inhalation in rats (Gilpin et al., 2014) and an induction of dependence (George, Grieder, Cole, & Koob, 2010). Addiction-related behavioral, neurochemical and physiological alterations were effectively present after exposure to chronic intermittent nicotine vapor in mice (Ponzoni et al., 2015) and passive vapor exposure produced a withdrawal state and facilitated nicotine self-administration during adulthood (Kallupi, de Guglielmo, Larrosa, & George, 2019). Thus, electronic devices, which at first were presented as potential less harmful substitutes to cigarette smoking in replacement therapy, are now becoming more recreational (Barbeau, Burda, & Siegel, 2013; Etter, 2018; Etter & Stapleton, 2006; Koszowski et al., 2015; Levy et al., 2018; Malas et al., 2016; Rom, Pecorelli, Valacchi, & Reznick, 2015; Westman, Tomlin, Perkins, & Rose, 2001).

Both preclinical and clinical investigations have suggested that the presence of sensory stimuli associated with nicotine self-administration, such as visual or gustatory incentives, had an amplifier effect on nicotine voluntary consumption and on cues incentive values due to nicotine's secondary reinforcing properties of associated signals.(Caggiula et al., 2009; Chaudhri, Caggiula, Donny, Booth, et al., 2006; Chaudhri et al., 2007; Chaudhri, Caggiula, Donny, Palmatier, et al., 2006). In fact, flavors increased the rewarding/reinforcing value of e-cig containing nicotine in young adult smokers (Audrain-McGovern et al., 2016). In other experiments, nicotine pretreatment increased operant responding for oral conditioned stimuli without altering their palatability showing an enhancement of the incentive value of these signals by nicotine (Palmatier, Lantz, O'Brien, & Metz, 2013). Moreover, the addition of flavors with conditioned reinforcing properties increased nicotine self-administration (Palmatier et al., 2019).

Tobacco products have a powerful taste and sensory effects on the buccal cavity and airways. In humans, preferences develop to specific flavors and packaging, raising questions about

characterizing and reinforcing properties of additives alone and sensory experiences (Ayo-Yusuf & Agaku, 2015; Paschke, Hutzler, Henkler, & Luch, 2015; Schneller, Lindgren, Shields, Hatsukami, & O'Connor, 2017). Most recent data even show that the flavors used in electronic nicotine delivery systems (ENDS) are reinforcing by themselves at certain concentrations and able to produce reward-related behaviors (Avelar et al., 2019; Rangel-Gomez et al., 2019) which increases the need to closely examine other flavors (Landry et al., 2019). FDA, WHO and other public health acting organizations are aware of the impact of these flavors in tobacco products in their recent reports and are putting effort on understanding how these flavors can influence the use and abuse of tobacco products given that most previous enhancing effects were shown by intravenous self-administration of nicotine or flavor. The research field lacks information regarding toxicological and reinforcing properties of the variety of aromatic taste additives in tobacco products and their abuse liability, especially in new electronic devices. Recently, more studies have started again to use oral nicotine self-administration in animal models because this route mimics the most human tobacco passage. A better understanding of the behavioral bases of conditioned reinforcing properties of oral nicotine is needed if we want to dissect the neurobiology of these processes.

Our hypothesis is that oral signals (including gustation and retro nasal olfaction components) and nicotine interact together in a bidirectional way: first, these signals mask the bitter taste of nicotine and second, nicotine acts by secondary reinforcing properties to enhance the values of associated flavors and visual signals. Thus, we think that the combination of nicotine with multisensory cues reinforces nicotine incentive properties, triggering increased self-administration of the drug. To evaluate these effects, we first studied the modulation of nicotine palatability by added flavors. To do so, we used bottle-choice preference tests (experiment 1). Second, we characterized the different features of flavored nicotine oral self-administration in mice (experiment 2). Vanilla flavor is one of the most used flavors in tobacco products. We sought to examine this particular flavor, especially knowing that while its use was banned in conventional cigarettes in the French market in 2009, yet there is no regulation regarding its addition to the new tobacco products. An important original issue treated in our presented study is the concomitant oral administration of nicotine and sensory signals in mice.

Material and methods

Subjects

For both experiments, male C57BL6J mice issued from Charles River laboratories (France) and local breeding in our laboratory were used. Animals were maintained in a thermoregulated animal housing (22° C) and in inverted cycle (night from 8:00am to 8:00pm), allowing the experiments to take place during the animal active phase. Mice were grouped housed and had access to food and water *ad libitum* when no other regimen is noted. All experiments were in accordance with French (council directive 2013-118, February 1, 2013) and International (directive 2010-63, September 22, 2010, European Community) legislations for the care and use of laboratory animals and validated by the French Ethics Committee (Approval APAFIS#3265-20 15121811059640 v6).

Drugs

Nicotine hydrogen tartrate (Sigma-Aldrich®, France) was dissolved in flavored or non-flavored tap water for both experiments at concentrations going from 40 to 120 µg/mL and pH regulated at 7.7-7.9 for optimal oral nicotine absorption. Saccharine (Sigma-Aldrich®, France) was dissolved in tap water at a 0.1% concentration. Coconut (Arômes Caraïbes®) and vanilla (Lechampion bio®, containing vanilla extract, sugar syrup and ethylic alcohol 20% vol) flavors were purchased from local stores and diluted at different concentrations (0.01, 0.1 and 1%) in tap water.

Experiment 1: Oral consumption of flavored nicotine: bottle self-administration and two-bottle preference test

The aim here was to determine whether nicotine aversive taste properties could be modified by adding flavored additives. To do so, we used 14 male C57BL6J mice at the average age of 35 days (PND35) and weighing 13.65 g in average at the start of the experiment. They were individually housed into plastic cages to allow the measure of liquid consumption.

First all animals' basal water and nicotine (60 µg/mL) consumption were measured, then tap water was replaced with experimental solutions for forced consumption and preference test. Animals were assigned to 2 experimental groups: nicotine+coconut (n=7) and nicotine+vanilla (n=7).

Flavored nicotine (60 µg/mL) and flavored water (flavors at 0.01%, 0.1% and 1%) were first tested in a forced consumption (only one-bottle available) paradigm. Then, flavored nicotine was compared to tap water or to flavored water (two-bottle free choice). Tests were performed in mice home cages and each measure represents 24 hours of experimental solution availability. Bottles were alternated from left to right after each measure in order to

avoid effect of position preference. Comparisons of 24 h volume consumption relatively to body weight (mL/g).

Statistical analysis:

Data were analyzed using STATISTICA® and GraphPad Prism 6®. Paired-t tests were used to compare consumptions (water vs. nicotine). The effect of solution type and concentration on flavored nicotine preference was analyzed by repeated measures ANOVA with flavor and concentrations factors. It was followed by comparisons of individual score preferences to a standard theoretical value of 50% were also used. Statistical significance for all analyses is fixed as $p \leq 0.05$ and all data are represented as mean \pm SEM.

Experiment 2: Study of flavored nicotine oral self-administration (OSA) in operant chambers

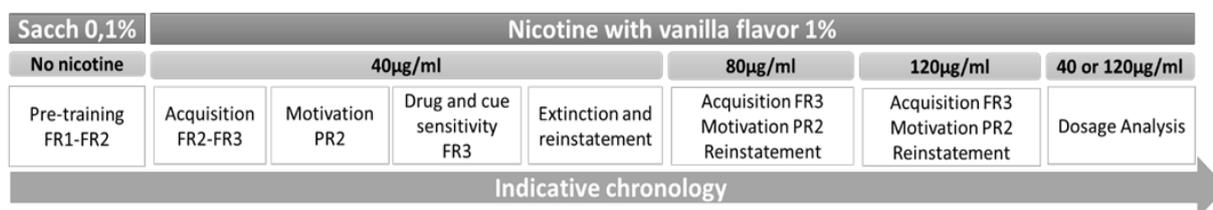


Fig 1 Operant conditioning timeline and design. Mice were first pre-trained for operant responding with liquid saccharine (Sacch) 0.1% in a fixed ratio 1 and 2 (FR1 & FR2) schedule of reinforcement. Then, mice were tested for oral flavored nicotine (40 µg/mL) self-administration using vanilla flavor 1%. Vanilla flavored nicotine (n=12) and control group vanilla only (n=11). Mice were tested for acquisition, motivation, sensitivity and reinstatement at nicotine doses ranging from 40 to 120 µg/mL. At the end of the experiment, myocardial blood sampling was performed for cotinine dosage.

To investigate secondary reinforcing properties of nicotine when associated with oral cues, operant conditioning with vanilla flavored nicotine was conducted. Exploring bidirectional aspects of associating together these signals orally (enhanced conditioning and increased salience of vanilla via its association with nicotine) was possible due to the increased probability of nicotine consumption, its aversion being decreased by added vanilla flavors. For this experiment, we used 23 male mice aged of an average PND 40 and weighting 18.3 g in average at start of the operant conditioning trainings. Home cage water bottles were removed 2 hours before beginning of the session to facilitate acquisition of OSA.

Apparatus

Oral self-administration and tests were conducted in a standard mouse operant chambers isolated from noise and lightening disturbances (Polymodal system 15x18x22 cm, Imetronic, France) and equipped with two nose-poke devices (“active” and “inactive”) located on both sides of a dipper that is connected by an ethylene tube to a 10 mL syringe containing the liquid reward. This syringe is placed on an injection pump located outside and above the cage. 3 seconds (s) illumination of a house-light signaled the start of each test session lasting

30, 60 or 120 min depending on the test session. Correct responses on the active hole resulted in a 50 μ L infusion of solution in the dipper. Each reward delivery was accompanied by the presentation of a visual stimulus consisting of a 3 s cue light above the active nose-poke, except during saccharin pre-training. This contingency between the availability of the reward and the light stimulus facilitates self-administration learning. After each delivery, mice had to empty the liquid dispenser to enable the next count of reinforced visits. Visits to the inactive hole had no consequences but was useful to examine correct discrimination between nose-poke holes. When the self-administration session is over, the house light turns on again to signal the unavailability of the drug. Data are recorded via a computer-coupled system, using POLY program from Imetronic (France).

Acquisition, maintenance and dose-response curve

Mice were first trained to nose poke for saccharin 0.1% sweet solutions (fixed ratio 1 and 2) on daily 30 min-session for two weeks, in order to acquire efficient instrumental response prior nicotine OSA (fig.1). Then, mice were divided into 2 groups of equal performances: controls receiving vanilla 1% (n=11) and experimental mice receiving nicotine (from 40 to 120 μ g/mL/50 μ L) in vanilla 1% (n=12). Training for flavored nicotine started at 40 μ g/ml on a FR2 schedule and then switched to FR3 schedule of reinforcement (30-min sessions) (see fig.1 for the description of the timeline). At the end of each session, house light was switched on in order to signal the unavailability of the drug and the end of the session. After reinstatement test, animals were stabilized on FR3 during 60-min sessions. Then, we examined the maintenance of OSA (FR3 60min-sessions) at nicotine 80 and 120 μ g/mL in order to describe the reinforcing and aversive effects of flavored nicotine at higher concentrations.

Motivation

After robust stabilization, motivation for flavored water or flavored nicotine OSA was tested in a progressive ratio schedule of reinforcement (fig.1). This test measures within a session the work load that mice are ready to do in order to obtain each subsequent reward. The number of reinforced visits increased progressively by 2 (PR2). The session lasts 120 minutes but is stopped if no reward is delivered for 15 consecutive minutes. The breaking point corresponds to the last ratio a mouse completed before the responses was disrupted and is an index of motivation.

Sensitivity to Drug and Drug-associated Cues

A dose-response assay was performed with increasing doses of 0, 20, 40 and 80 μ g/mL/50 μ L of nicotine in order to determine behavioral sensitivity to reinforcing effects of nicotine

(fig.1). Test sessions were done on 4 consecutive days, with a FR3 schedule of reinforcement for 30 min.

To help understand the role of each compound in flavored nicotine oral self-administration, omissions of 3 types of “cues” were tested: drug, flavor and visual cue. To do so, vanilla alone sessions were endured by both groups in order to see the effect of nicotine omission. Also, omission of nicotine and vanilla during “water only” session permits the characterization of operant conditioning response in the absence of nicotine and vanilla flavor, with omission of cue-light or not.

Cue and drug-reinstatement of self-administration behavior

After stabilization at 40, 80 and 120 $\mu\text{g/mL}$, reinstatement of drug-seeking behavior was tested (fig.1). Each session began with a 30 min period of extinction where mice had access to both active and inactive nose-poke holes without any consequence. Then, a visual cue light above the active hole illuminated and a free liquid reward delivery occurred. Each nose-poke in the active hole resulted in a 3sec light stimulus but no further liquid delivery. Reinstatement is thus measured by the difference of behavior between the 30 min extinction period and the post-stimulus presentation period. Finally, at the end of the reinstatement test, animals were left for 15 min in the chamber while the absence of drug was signaled. This last period allowed the measure of persistent seeking while drug unavailable.

Cotinine ELISA

Given that cotinine is the main nicotine metabolite, we determined serum cotinine levels to evaluate nicotine impregnation (fig.1). After the last OSA session, mice (n=23) were anesthetized with a mixture of pentobarbital (300 mg/Kg) and lidocaine (30 mg/Kg) to allow intra-cardiac blood sampling. Approximately 0.5 mL of blood was collected in tubes and directly put 4 hours into a 37°C water bath to allow coagulation and serum collection after centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. Samples were stored at -20 ° C until dosage. Cotinine serum dosage was performed using commercially available Calbiotech Cotinine direct ELISA kit (Calbiotech Inc, USA). Two 10 μl aliquots of serum from each animal were used as replicates in the ELISA assays. Absorbance was measured on ELISA reader (POLARstar Omega, BMG Labtech-Plateforme de Biochimie et de Biophysique, Bordeaux Neurocampus) at 450 nm within 15 min of adding the stopping reagent. A standard curve of cotinine concentrations (0–100 ng/mL) was constructed in order to calculate cotinine concentrations from absorbance.

Statistical analysis

Data were analyzed using STATISTICA® and GraphPad Prism 6®. Repeated measures ANOVA were performed to compare between control and experimental groups (vanilla vs nicotine+vanilla) within sessions for each addiction stage. When a group x session interaction was significant, the comparison was followed by corresponding one-way ANOVA and LSD *post-hoc* analyses. Serum cotinine dosage data were analyzed by using Mann-Whitney test for non-parametric comparisons. Statistical significance for all analyses was fixed as $p \leq 0.05$.

Results

Experiment 1

Flavors enhance nicotine palatability and allow switch in preference for nicotine

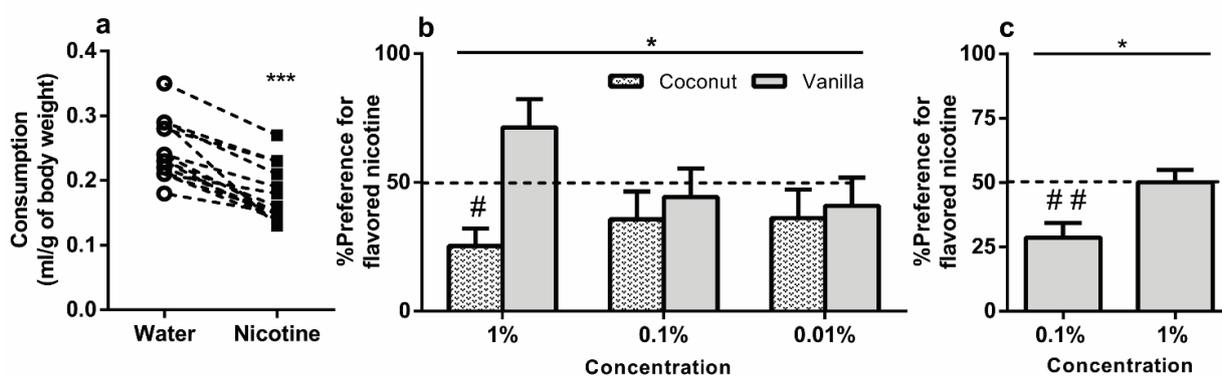


Fig 2 Modification of nicotine aversive properties by added flavors. (a) Basal liquid intake for water or nicotine (60 $\mu\text{g/mL}$) when presented in a one-bottle test ($n=14$), (b) In a two-bottle choice design, dose-response preference score for flavored nicotine over water ($n=7/\text{flavor}$), (c) Preference score for vanilla flavored nicotine over vanilla flavored water at 0.1 and 1% vanilla. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ paired t-test and for comparison to a standard value of 50%, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. All data are represented as mean \pm SEM

All animals were first tested for water consumption to evaluate basal liquid intake, followed by nicotine consumption test in order to evaluate aversive properties of non-flavored nicotine. Water intake, 0.25 ± 0.05 mL/g, decreased to 0.18 ± 0.04 mL/g when nicotine 60 $\mu\text{g/mL}$ was added (paired t-test; $t(13) = 8.27$, $p < 0.001$; fig 2a).

Then, in a two-bottle choice test, we first measured preference for flavored nicotine over water. Comparisons with repeated measures ANOVA showed no significant flavor concentration effect [$F(2,24) = 0.56$, $p = 0.58$] and no concentration x flavor interaction [$F(2,24) = 2.62$, $p = 0.09$]. However, vanilla flavored nicotine was preferred to coconut flavored nicotine (ANOVA, flavor main effect, $F(1,12) = 4.60$, $p = 0.05$; fig 2b). Preference score for coconut flavor at 1% was significantly lower than preference score 50% [$t(6) = -3.65$, $p = 0.011$], indicating an aversion for this flavored nicotine solution.

To determine optimal vanilla flavor concentration, we performed a dose-response on the preference for vanilla flavored nicotine (fig 2c). Preference score for 0.1% vanilla was significantly lower than the score at 1% vanilla (paired t-test, $t(6)=-2.68$, $p=0.04$). When compared to preference score 50%, nicotine in vanilla 0.1% was aversive ($p<0.01$). Vanilla 1% makes nicotine taste undetectable and iso-palatable to vanilla 1% only [comparison to 50% preference score, $t(6)=0.04$, $p>0.05$ ns).

Experiment 2

Characterization of flavored nicotine self-administration

Vanilla flavor allow equivalent acquisition and maintenance of operant self-administration behavior in both groups even if task ratio and time increases

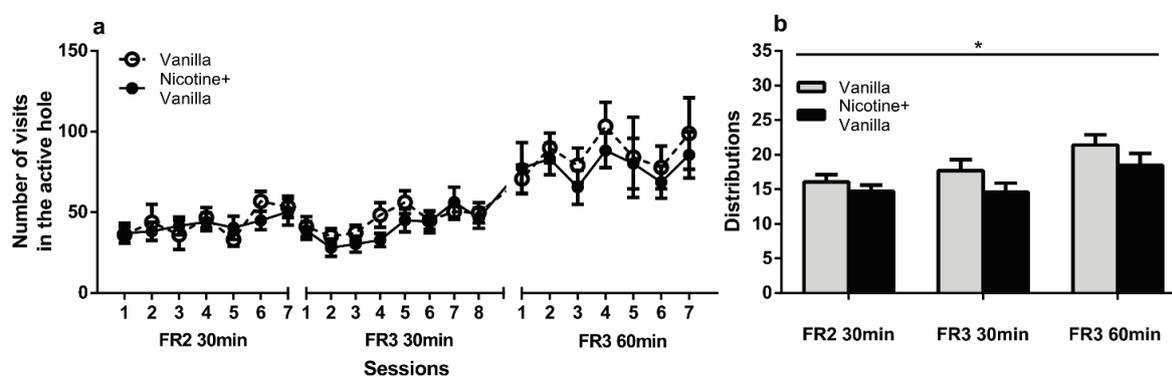


Fig 3 Acquisition of oral self-administration of vanilla 1% flavored nicotine. Nicotine 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in vanilla 1% ($n=12$) and vanilla 1% ($n=11$); (a) Mean number of visits in the active nose-poke hole and (b) Mean number of drug deliveries over the last 3 sessions for each schedule of reinforcement: FR2 & FR3 30 min-session and FR3 60min-session; main effect for schedule of reinforcement, * $p<0.05$. All data are represented as mean \pm SEM

Before nicotine and cue introduction, saccharine 0.1% training and acquisition of operant response (discrimination rate) were evaluated and mice were divided equivalently into 2 experimental groups. Different self-administration stages were thus modeled. Results of acquisition phase showed that addition of vanilla flavor to nicotine (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) allowed sustained oral self-administration over all 22 training sessions. Both conditioned groups were capable of acquiring operant conditioning response, specifically directed to reward, regardless schedule of reinforcement and exercise length. Indeed, comparisons of sessions of each schedule with repeated measures ANOVA showed no significant main effect of group:FR2 30min [$F(1,21) = 0.03$, $p=0.86$], FR3 30min [$F(1,21)=0.67$, $p=0.42$], FR3 60min [$F(1,21)=0.24$, $p=0.63$] (fig 3a). We observed no group x session interaction on any schedule, $p>0.05$ n.s. An evolution of the active responding chronologically across sessions with a main effect of session was observed for FR2 30min [$F(6,126) = 3.98$, $p=0.001$], FR3 30min [$F(7,147) = 5.77$, $p<0.001$] and a tendency to significance for FR3 60min [$F(6,126) = 2.03$,

p=0.066]. Behavior is thus maintained for both groups across sessions. Repeated measure ANOVA showed no main effect of treatment on the number of distribution [F(1,21) =2.38, p=0.14] and no schedule x treatment interaction [F(2,42) =0.52, p=0.60] although we observed a main effect of schedule[F(2,42) =12.57, p<0.001] (fig 3b). Post hoc analysis by LSD test on the schedule effect indicated significant differences between FR3 60min and both FR2-FR3 30min (p<0.001). Other measured variables include visits of the inactive nose-hole, seeking response by visits on the active nose hole when drug is no longer available and total activity. Both flavored nicotine and flavor only groups were equivalent for these behavioral parameters (data not shown). These results showed that flavor (vanilla at 1%) alone is self-administered but that its oral association with nicotine (at 40 µg/mL) does not enhance responding.

Oral nicotine concentration change is detected but mice do not titrate

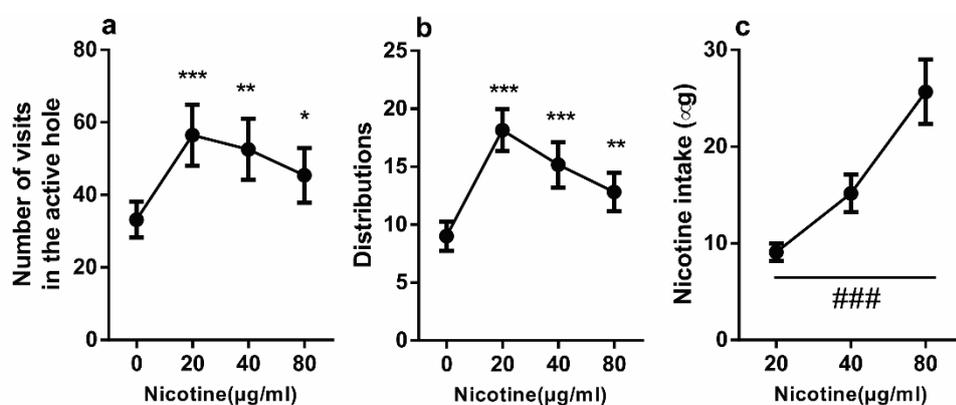


Fig 4 Dose-response function for behavioral parameters maintained by vanilla 1% flavored nicotine oral self-administration. (a) Mean number of visits in the active hole, (b) Mean number of liquid distributions. Even if mice seem to titrate their consumption by responding less, increasing doses of nicotine ranging from 0 to 80 µg/mL results in increased total nicotine intake (c). Post hoc comparison vs Nicotine dose 0 *** p<0.001, **p<0.01, * p<0.05, nicotine concentration main effect ###p<0.001. All data are represented as mean ±SEM, n=12.

In this study, a dose-response curve for behavioral parameters was performed at different nicotine concentrations (0, 20, 40 and 80 µg/mL) with no flavor concentration change (vanilla 1%). Comparisons of response within the different doses were done by repeated measure ANOVA. Tests showed that mice significantly decreased responding on the active nose poke when nicotine concentration increased with a main effect of dose [F (3, 33) =7.06, p<0.001]. LSD post-hoc analysis showed significant differences between all doses, each compared to responding at zero nicotine (20 vs 0, p<0.001; 40 vs 0, p=0.001, 80 vs 0, p=0.03). We also observed significant difference between responding to 20 and 80 µg nicotine (p= 0.05) (fig 4a). In parallel to active responding, mice significantly decreased the number of drug deliveries confirmed by a main dose effect [F (3, 33) =15.43, p<0.0001].

Post hoc tests showed a significant difference of all doses when compared to zero (20 (18.2±6.2 distributions) vs 0 (9±4.4), $p<0.001$; 40 (15.2± 6.8) vs 0, $p<0.001$, 80(12.8±5.7) vs 0, $p=0.01$) and a difference of 40 and 80 μg when compared to 20 μg (20 vs 40, $p<0.04$; 20 vs 80, $p<0.001$) (fig 4b). Despite this decreased responding to nicotine concentration increase, mice do not titrate and we observed a significant increase in nicotine intake for the three doses tested, [main effect of dose $F(2, 22) = 28.87$, $p<0.0001$]. Post hoc analysis confirmed a difference of all doses when compared to each other's (20 vs 40, $p=0.01$; 20 vs 80, $p<0.001$, 40 vs 80, $p<0.001$) (fig 4c).

Nicotine, flavor or cue light omissions decrease oral self-administration

Sensitivity to single or multiple cues was tested by vanilla and water alone sessions in order to evaluate the effect of nicotine and nicotine associated cue omissions on self-administration behavior in a 30 min fixed ratio 3 schedule of reinforcement (FR3).

Mice primarily receiving flavored nicotine detected nicotine omission and modulated their number of active responses along vanilla alone sessions. Comparisons by repeated measure ANOVA with group as a between factor and sessions as a within factor showed a main effect of sessions on active responses [$F(3, 63) = 6.58$, $p<0.001$] but no main effect of group [$F(1, 21) = 0.615$, $p=0.44$] and no interaction [$F(3, 63) = 0.23$, $p=0.87$] (fig 5a). On the other hand, repeated measure ANOVA confirmed a main effect of group [$F(1, 21) = 7.14$, $p=0.014$] and session [$F(3, 63) = 12.32$, $p<0.0001$] with no interactions [$F(3, 63) = 1.02$, $p=0.39$] for the number of distribution during vanilla 1% alone sessions (fig 5b). These results showed that mice previously self-administering flavored nicotine detected nicotine omission that resulted in a reduction of self-administration behavior.

Water alone sessions were then performed in the presence and absence of visual cue light previously associated with reward delivery. Comparisons of results by repeated measure ANOVA showed that both groups reduced their poking on the active nose hole for water without cue compared to water with cue (main effect of test on active responses [$F(1, 21) = 36.5977$, $p<0.0001$] and distributions [$F(1, 21) = 13.40$, $p=0.001$]. On the other hand, we did not observe a main effect of group [$F(1, 21) = 0.20122$, $p=0.6583$] and [$F(1, 21) = 2.85$, $p=0.11$] or a test x group interaction [$F(1, 21) = 1.81443$, $p=0.1923$] and [$F(1, 21) = 1.08$, $p=0.31$] for active responses and drug delivery respectively (fig 5c, 5d). These results showed that cue light contingent with reward delivery could be responsible for a part of the behavior.

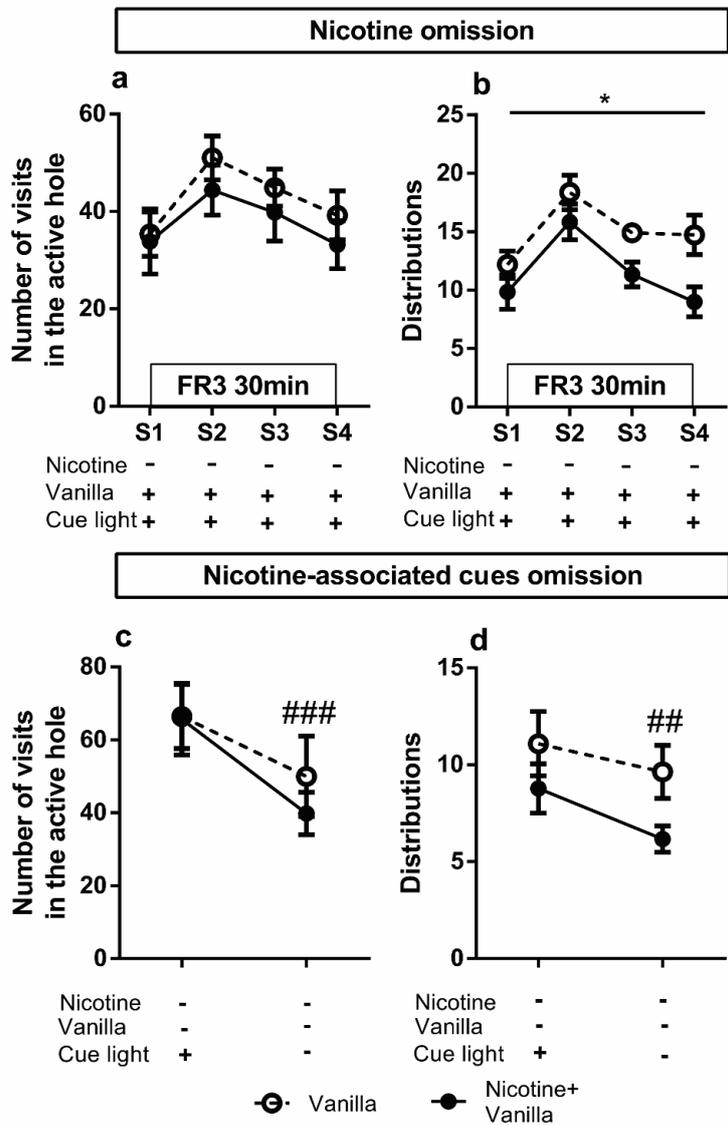


Fig 5 Modulation of nicotine incitative properties by added 1% vanilla flavor. Flavored nicotine (n=12) and flavor only (n=11) groups (a) Mean number of visits in the active nose-poke hole (b) Mean number of breaking points and (c) Mean number of duration in progressive ratio 2 task at different nicotine concentrations (40, 80 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Post-hoc analyses by LSD test or one way ANOVA for each experimental group ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; All data are represented as mean \pm SEM.

Motivation for nicotine is inversely correlated to aversion due to high concentrations

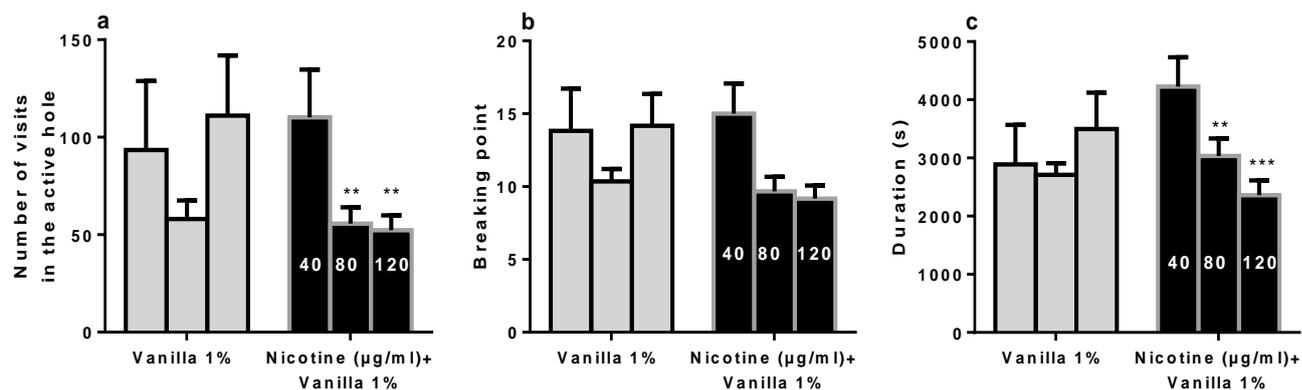


Fig 6 Modulation of nicotine incitative properties by added 1% vanilla flavor. Flavored nicotine (n=12) and flavor only (n=11) groups (a) Mean number of visits in the active nose-poke hole (b) Mean number of breaking points and (c) Mean number of duration in progressive ratio 2 task at different nicotine concentrations (40, 80 and 120 µg/mL). Post-hoc analyses by LSD test or one way ANOVA for each experimental group **p<0.01, ***p<0.001; All data are represented as mean ±SEM.

Progressive ratio motivational task allowed measuring nicotine's incitative property by increased work (2 additional nose-pokes) in order to obtain the next reward in the same test session. Comparisons by repeated measure ANOVA with group as a between factor and dose factor within the same group showed a significant main effect of dose on the total number of active responses [$F(2, 42) = 4.13, p = 0.023$] and a dose x group interaction [$F(2, 42) = 3.13, p = 0.05$] without a main effect of group [$F(1, 21) = 0.34, p = 0.56$]. Indeed, one way ANOVA performed on each group alone for the 3 doses showed a main effect of dose for flavored nicotine group [$F(2, 22) = 6.59, p = 0.006$] but not for flavor only group [$F(2, 20) = 2.10, p = 0.15$]. LSD post-hoc analysis showed a significant decrease of active responses at nicotine 80 ($p = 0.006$) and 120 µg/mL ($p = 0.004$) when compared to 40 µg/mL (fig 6a). In the same motivational task, the evaluation of the breaking point, which is the last ratio reached to obtain the last reward, showed a main effect of dose [$F(2, 42) = 5.61, p = 0.007$] but no effect of group [$F(1, 21) = 0.55, p = 0.47$] and a non-significant tendency of dose x group interaction [$F(2, 42) = 2.88, p = 0.06$] (fig 6b). On the other hand, we observed a non-significant main effect of dose [$F(2, 42) = 2.70, p = 0.08$] or group [$F(1, 21) = 0.11, p = 0.74$] for progressive ratio durations although a significant interaction (dose x group) [$F(2, 42) = 7.21, p = 0.002$] existed. Comparisons of doses for each group by one way ANOVA showed a main effect of dose on PR duration for flavored nicotine group [$F(2, 22) = 10.52, p < 0.001$] but not for flavor only group [$F(2, 20) = 1.28, p = 0.30$]. LSD post-hoc analysis demonstrated a significant dose-dependent decrease of the PR duration at nicotine 80 ($p = 0.008$) and 120 µg/mL ($p < 0.001$) when compared to 40 µg/mL (fig 6c). All these data suggested that higher concentrations of nicotine in our experiments decrease motivation by increasing nicotine aversive effects.

Reinstatement of operant responding by presentation of the reward and reward-associated cue-light

After robust self-administration at each nicotine concentration, liquid reward (flavored nicotine or flavor only) and reward associated cue-light were presented in order to evaluate cue-induced reinstatement after 30 min of extinction at the beginning of each relapse session. All mice reinstated operant behavior (increased visits on the active nose-hole) as it was demonstrated by a significant main effect of time in a repeated measure ANOVA on the period of 30-60 min of the session, the point of 30 min being the last measure before oral and visual cue presentation at the three different concentrations of nicotine: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [F (6, 126) = 3.82, $p=0.002$] (fig 7a), 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [F (6, 126) = 3.60, $p=0.003$] (fig 7b) and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [F (6, 126) = 5.27, $p<0.001$] (fig 7c). Analyses did not show any group effects [F (1, 21) = 0.57, $p=0.46$], [F (1, 21) = 2.04, $p=0.17$] and [F (1, 21) = 0.26, $p=0.62$] or time x group interaction for 40, 80 or 120 μg doses respectively [F (6, 126) = 1.35, $p=0.24$], [F (6, 126) = 0.69, $p=0.66$] and [F (6, 126) = 0.56, $p=0.76$].

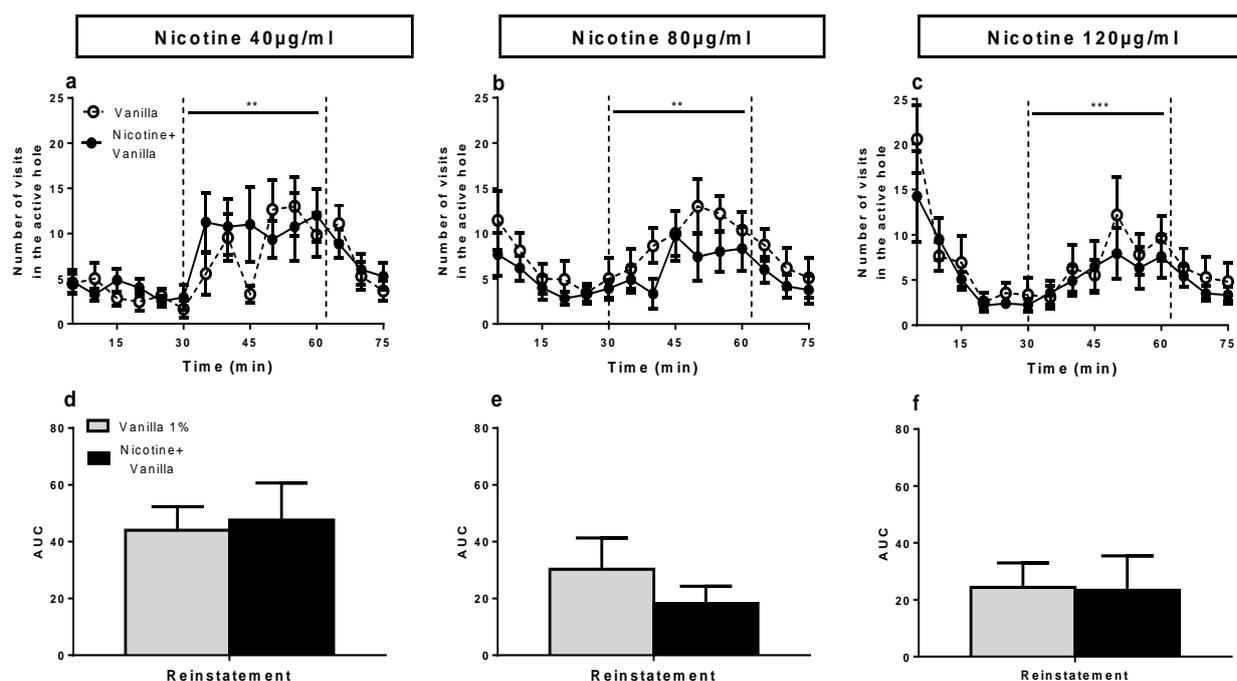


Fig 7 Cue light and nicotine induced reinstatement at different nicotine concentration. Flavored nicotine ($n=12$) and flavor only ($n=11$) groups. Mean number of number of visits in the active nose-poke hole at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a), 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c) Main effect of time (30 min-60 min) by repeated measures ANOVA *** $p<0.001$. Area under the curve (AUC) of visits in the active nose-poke hole for the reinstatement period at different nicotine concentrations: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d), 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (e) and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (f). Data represented as mean \pm SEM.

An analysis by the measure of the area under the curve (AUC) of the reinstatement phase (35-60 min) calculated relatively to the last point of extinction (30 min) by one-way ANOVA showed a significant reinstatement of self-administration behavior after oral and visual cues

presentation at 40 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ and 120 $\mu\text{g/mL}$ nicotine with no main effect of group for the 3 concentrations respectively: 40 μg [F (1, 21)=0.05, p=0.82] (fig 7d), 80 μg [F (1, 21)=0.95, p=0.34] (fig 7e) and 120 μg [F (1, 21)=0.005, p=0.95] (fig 7f).

Oral nicotine self-administration increases serum cotinine and maintains detectable concentrations 90 minutes after the end of FR3 training session

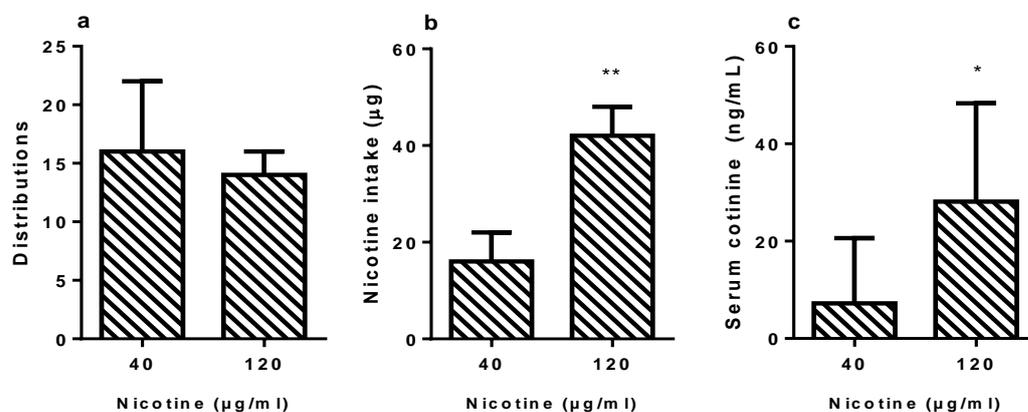


Fig 8 Serum cotinine dosage 90 min after last FR3 training session at 40 (n=7) and 120 $\mu\text{g/mL}$ (n=5) nicotine concentration. (a) Number of drug delivery, (b) amount of nicotine intake and (c) serum cotinine concentration. Dose effect in a Mann-Whitney non-parametric test, *p<0.05, **p<0.01. Data represented as median with range.

For serum cotinine dosage, flavored nicotine receiving mice (n=12) were divided into two groups: 7 mice receiving nicotine at 40 $\mu\text{g/mL}$ and 5 receiving it at 120 $\mu\text{g/mL}$. Results showed that nicotine oral intake increases cotinine serum concentration at 90 min post oral self-administration whether it was consumed at a low (40 $\mu\text{g/mL}$) or higher concentration (120 $\mu\text{g/mL}$). This cotinine increase is dose-dependent and significantly higher in mice receiving nicotine at 120 $\mu\text{g/mL}$ compared to 40 $\mu\text{g/mL}$ (p=0.01) (fig 8c) for an equivalent number of drug deliveries (p=0.18) (fig 8a). This cotinine serum increase mimics the increase of nicotine intake for 120 $\mu\text{g/mL}$ compared to 40 $\mu\text{g/mL}$ (p=0.009) (fig 8b). Thus, oral nicotine intake is positively correlated with elevation of serum cotinine concentration at a precise 90 min point of time in our study, after a habitual FR3 training session. Dosage of cotinine in the serum of vanilla receiving mice resulted in a confirmation of cotinine absence for all 11 mice of flavor only group.

Discussion

The objective of this study was to investigate the effects of flavor additives on oral nicotine taking behavior. Our hypothesis was twofold: first adding flavors to nicotine promoted its

volitional consumption, and second, enhancing the conditioned value of sensory associated cues nicotine further invigorated taking and seeking behaviors.

As expected, adding nicotine to water reduced total liquid consumption and confirmed once again that nicotine aversive oral properties decreased nicotine solution consumption (Flynn et al., 1989; Fowler & Kenny, 2014; Fudala & Iwamoto, 1987). We found that adding flavors to the nicotine solution increased intake. More specifically, our results indicated that vanilla 1% was the optimal flavor condition that allowed nicotine consumption and made the mixture isopalatable to vanilla 1% flavor alone.

Once we had characterized the optimal flavored nicotine solution, we examined the mixture in the oral self-administration model in order to assess the development of the addictive processes in mice: acquisition, drug- and drug-associated cue sensitivity, motivation and relapse. Results indicated that vanilla flavor was efficient to sustain the acquisition of nicotine oral self-administration. Moreover, we showed that changes in nicotine concentration or nicotine omission altered self-administration behavior although mice failed to self-titrate. Since the hypothesis was that adding a flavor to the nicotine solution may enhance its incentive value, mice motivation was tested in a progressive ratio and reinstatement tests. Our findings showed that motivation for the flavored nicotine solution was decreased when nicotine dose was increased. Importantly, mice reinstated seeking behavior after the presentation of both oral and visual stimuli, underlying the role of environmental and drug-paired cues in nicotine self-administration. Quite surprisingly, our results demonstrated that the vanilla flavored solution without nicotine sustained oral self-administration, motivation and reinstatement as well.

In this study, we couldn't show the enhancement of the behavior and stimuli's value by nicotine, even if nicotine omission was detected. Indeed, nicotine pharmacokinetics differ between routes of administration (Compton et al., 1997; Digard, Proctor, Kulasekaran, Malmqvist, & Richter, 2013; Zins et al., 1997). Our results can be explained by the delayed time between the operant responding, the action to get the reward, and nicotine absorption. It was too long to be efficient for the development of an associative learning. This might inhibit contingent incentive response in a self-administration task, even if nicotine intake was transformed in cotinine which was detected in blood 90 min after self-administration and met preclinical and clinical concentrations (McGrath-Morrow et al., 2015) .

It is now well established that nicotine activates bitter taste receptors, which can be unpleasant and aversive (Enoch, Harris, & Goldman, 2001). Available studies on oral nicotine showed that drinking nicotine-containing water was not palatable nor satisfactory to

rodents; it also produced weight loss and large decreases in fluid intake (Murrin, Ferrer, Zeng, & Haley, 1987). Here as well, animals having no other choice than nicotine diluted in water decreased their consumption compared with control groups. These results are replicated with sucrose and sweetened nicotine solutions (Smith & Roberts, 1995). Animals do not like and more importantly, do not prefer nicotine. Also, oral menthol, which did not alter intravenous nicotine administration, reversed oral nicotine aversion (50 and 100 mg/L) in a two-bottle choice test (Wickham et al., 2018). At the clinical level, studies on e-cigarettes suggest a significant increase of tobacco products palatability by flavors through masking nicotine's bitter taste and modification of harm perception (Soule, Lopez, Guy, & Cobb, 2016). In order to obtain an addictive effect of nicotine, the reinforcing effect of the drug must be more important than its aversive taste (Mangold, Payne, Ma, Chen, & Li, 2008). The present study indicates that flavoring nicotine facilitates nicotine oral self-administration and meets literature with studies that used sucrose or saccharine in order to make nicotine containing solutions more palatable and facilitate voluntary consumption.

The effects of vanilla flavor in the operant conditioning corroborate the frequent use of this flavor in tobacco products due to its motivating and sensory appealing properties. In fact, the attractiveness of e-liquid flavors to non-smoking youth have been shown to stimulate use of electronic devices and consumption of nicotine (Harrell et al., 2017; Krusemann, Boesveldt, de Graaf, & Talhout, 2018). Does this flavor act as a characterizing flavor, recalling the menthol case? Vanilla is the most widely used flavor (Makkar & Becker, 1993) (Havkin-Frenkel & Belanger, Biotechnological production of vanillin, 2016). Vanillin is perceived as similar to sucrose at low concentrations and has also been proven to have a reinforcing effect on appetite (Ogawa, Tashima, Sadakata, & Morinaga, 2018; Rankin & Marks, 2000). Also, this use of vanilla flavor as a tobacco additive was regulated for conventional cigarettes on the French market but no regulations exist until now for its use in e-liquids and smokeless tobacco products. More evidence from research show that sweet-tasting flavors are particularly attractive to youth (De Graaf & Zandstra, 1999; Morean et al., 2018) and that sucrose is reinforcing and has addictive properties (Ahmed, Guillem, & Vandaele, 2013). Indeed, aromas and flavors play a non-negligible role in tobacco products and consumption maintenance (Grimm et al., 2012).

We expected flavored nicotine to be more reinforcing in mice because it is now well known that nicotine enhances responding to contextual cues and non-drug rewards such as lights or sweet taste associated with its self-administration and can thus allow cues to influence its subsequent taking (Caggiula et al., 2009; Chaudhri, Caggiula, Donny, Booth, et al., 2006; Chaudhri et al., 2007; Chaudhri, Caggiula, Donny, Palmatier, et al., 2006) (Barret & Bevins,

2013; Palmatier et al., 2013; Palmatier et al., 2019). In fact, nicotine increases the reinforcing effects of sucrose and sucrose-paired cues (Grimm et al., 2012) and increases the incentive value and the motivation of animals (Palmatier, O'Brien, & Hall, 2012). In addition to that, many studies emerged on the effect of menthol on nicotine addiction and recently, the FDA report on health effects of menthol cigarettes concluded that adding menthol to cigarettes was associated with increased dependence (Lazard et al., 2017).

In conclusion, these data highlight the complexity of modeling oral nicotine addiction in mice with ambiguity to decipher the interactions between multisensory stimuli, due to nicotine's unmasking and increased aversion with increased concentrations. Tobacco abuse remains a serious public health problem and the impact of added taste and odorant stimuli to nicotine should be taken into consideration when evaluating nicotine's actual addiction. By modifying oral sensory perception and positively influencing the affective valence associated with nicotine, aromatic additives contained in e-liquids could therefore play a major role in the initiation of e-cig consumption and in the transition from use to abuse or even addiction to these devices. On the other hand, toxicological studies showed that vanillin and other electronic cigarette flavorings, significantly induced inflammatory and cytotoxic responses (Behar et al., 2016; Muthumalage et al., 2017), stressing on the importance of questions about safety of e-cigarettes is urgent to public health decision-making. Nicotine is therefore not the only responsible for toxicity and reinforcement in e-cigarettes and new tobacco products. Recent studies and our investigation emphasize the appeal of flavors and their reinforcing effects. Experimental designs should thus be refined in order to fill the gaps left by the rapidity of sales and marketing and resolve the paradox of e-cigarettes when it comes to public health. The paradox of nicotine abuse remains, until this day, unanswered and the separation of risk factors that can impact tobacco addiction are more and more complex.

Acknowledgment

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, University of Bordeaux and Region Aquitaine. ST was supported by the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur". The authors thank Yoan Salafranque for the care provided to the mice during the experiments. The authors declare no conflict of interest.

References

- Ahmed, S. H., Guillem, K., & Vandaele, Y. (2013). Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(4), 434-439. doi:10.1097/MCO.0b013e328361c8b8
- Alpert, H. R., Agaku, I. T., & Connolly, G. N. (2016). A study of pyrazines in cigarettes and how additives might be used to enhance tobacco addiction. *Tob Control*, 25(4), 444-450. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-051943
- Anthony, L.A Warner, R.C Kessler Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey Exp. Clin. Psychopharmacol., 2 (3) (1994), pp. 244-268
- Audrain-McGovern, J., Strasser, A. A., & Wileyto, E. P. (2016). The impact of flavoring on the rewarding and reinforcing value of e-cigarettes with nicotine among young adult smokers. *Drug Alcohol Depend*, 166, 263-267. doi:10.1016/j.drugalcdep.2016.06.030
- Avelar, A. J., Akers, A. T., Baumgard, Z. J., Cooper, S. Y., Casinelli, G. P., & Henderson, B. J. (2019). Why flavored vape products may be attractive: Green apple tobacco flavor elicits reward-related behavior, upregulates nAChRs on VTA dopamine neurons, and alters midbrain dopamine and GABA neuron function. *Neuropharmacology*, 158, 107729. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107729
- Ayo-Yusuf, O. A., & Agaku, I. T. (2015). The association between smokers' perceived importance of the appearance of cigarettes/cigarette packs and smoking sensory experience: a structural equation model. *Nicotine Tob Res*, 17(1), 91-97. doi:10.1093/ntr/ntu135
- Barbeau, A. M., Burda, J., & Siegel, M. (2013). Perceived efficacy of e-cigarettes versus nicotine replacement therapy among successful e-cigarette users: a qualitative approach. *Addict Sci Clin Pract*, 8, 5. doi:10.1186/1940-0640-8-5
- Barret, S. T., & Bevins, R. A. (2013). Nicotine enhances operant responding for qualitatively distinct reinforcers under maintenance and extinction conditions. *Pharmacol Biochem Behav*, 114-115, 9-15.
- Behar, R. Z., Luo, W., Lin, S. C., Wang, Y., Valle, J., Pankow, J. F., & Talbot, P. (2016). Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols. *Tob Control*, 25(Suppl 2), ii94-ii102. doi:10.1136/tobaccocontrol-2016-053224
- Biswas, L., Harrison, E., Gong, Y., Avusula, R., Lee, J., Zhang, M., . . . Liu, X. (2016). Enhancing effect of menthol on nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(18), 3417-3427. doi:10.1007/s00213-016-4391-x
- Bunch, K., Fu, M., Ballbe, M., Matilla-Santader, N., Lidon-Moyano, C., Martin-Sanchez, J. C., . . . Martinez-Sanchez, J. M. (2018). Motivation and main flavour of use, use with nicotine and dual use of electronic cigarettes in Barcelona, Spain: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 8(3), e018329. doi:10.1136/bmjopen-2017-018329
- Caggiula, A. R., Donny, E. C., Palmatier, M. I., Liu, X., Chaudhri, N., & Sved, A. F. (2009). The role of nicotine in smoking: a dual-reinforcement model. *Nebr Symp Motiv*, 55, 91-109.
- Carpenter, C. M., Wayne, G. F., Pauly, J. L., Koh, H. K., & Connolly, G. N. (2005). New cigarette brands with flavors that appeal to youth: tobacco marketing strategies. *Health Aff (Millwood)*, 24(6), 1601-1610. doi:10.1377/hlthaff.24.6.1601
- Chaudhri, N., Caggiula, A. R., Donny, E. C., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., . . . Sved, A. F. (2006). Operant responding for conditioned and unconditioned reinforcers in rats is differentially enhanced by the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*, 189(1), 27-36. doi:10.1007/s00213-006-0522-0
- Chaudhri, N., Caggiula, A. R., Donny, E. C., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., . . . Sved, A. F. (2007). Self-administered and noncontingent nicotine enhance reinforced operant responding in rats: impact of nicotine dose and reinforcement schedule. *Psychopharmacology (Berl)*, 190(3), 353-362. doi:10.1007/s00213-006-0454-8
- Chaudhri, N., Caggiula, A. R., Donny, E. C., Palmatier, M. I., Liu, X., & Sved, A. F. (2006). Complex interactions between nicotine and nonpharmacological stimuli reveal multiple roles for nicotine in reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 184(3-4), 353-366. doi:10.1007/s00213-005-0178-1
- Compton, R. F., Sandborn, W. J., Lawson, G. M., Sheets, A. J., Mays, D. C., Zins, B. J., . . . Green, J. (1997). A dose-ranging pharmacokinetic study of nicotine tartrate following single-dose

- delayed-release oral and intravenous administration. *Aliment Pharmacol Ther*, *11*(5), 865-874. doi:10.1046/j.1365-2036.1997.00236.x
- De Graaf, C., & Zandstra, E. H. (1999). Sweetness intensity and pleasantness in children, adolescents, and adults. *Physiol Behav*, *67*(4), 513-520. doi:10.1016/s0031-9384(99)00090-6
- Digard, H., Proctor, C., Kulasekaran, A., Malmqvist, U., & Richter, A. (2013). Determination of nicotine absorption from multiple tobacco products and nicotine gum. *Nicotine Tob Res*, *15*(1), 255-261. doi:10.1093/ntr/nts123
- Enoch, M. A., Harris, C. R., & Goldman, D. (2001). Does a reduced sensitivity to bitter taste increase the risk of becoming nicotine addicted? *Addict Behav*, *26*(3), 399-404.
- Etter, J. F. (2018). Comprehensive causal models and harm minimization principles should guide regulations on vapourizers. *Addiction*, *113*(10), 1788-1789. doi:10.1111/add.14384
- Etter, J. F., & Stapleton, J. A. (2006). Nicotine replacement therapy for long-term smoking cessation: a meta-analysis. *Tob Control*, *15*(4), 280-285. doi:10.1136/tc.2005.015487
- Flynn, F. W., Webster, M., & Ksir, C. (1989). Chronic voluntary nicotine drinking enhances nicotine palatability in rats. *Behav Neurosci*, *103*(2), 356-364. doi:10.1037//0735-7044.103.2.356
- Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 533-544. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.008
- Fudala, P. J., & Iwamoto, E. T. (1987). Conditioned aversion after delay place conditioning with nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*, *92*(3), 376-381. doi:10.1007/bf00210847
- George, O., Grieder, T. E., Cole, M., & Koob, G. F. (2010). Exposure to chronic intermittent nicotine vapor induces nicotine dependence. *Pharmacol Biochem Behav*, *96*(1), 104-107. doi:10.1016/j.pbb.2010.04.013
- Gilpin, N. W., Whitaker, A. M., Baynes, B., Abdel, A. Y., Weil, M. T., & George, O. (2014). Nicotine vapor inhalation escalates nicotine self-administration. *Addict Biol*, *19*(4), 587-592. doi:10.1111/adb.12021
- Goldenson, N. I., Kirkpatrick, M. G., Barrington-Trimis, J. L., Pang, R. D., McBeth, J. F., Pentz, M. A., . . . Leventhal, A. M. (2016). Effects of sweet flavorings and nicotine on the appeal and sensory properties of e-cigarettes among young adult vapers: Application of a novel methodology. *Drug Alcohol Depend*, *168*, 176-180. doi:10.1016/j.drugalcdep.2016.09.014
- Grimm, J. W., Ratliff, C., North, K., Barnes, J., & Collins, S. (2012). Nicotine increases sucrose self-administration and seeking in rats. *Addict Biol*, *17*(3), 623-633. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00436.x
- Harrell, M. B., Weaver, S. R., Loukas, A., Creamer, M., Marti, C. N., Jackson, C. D., . . . Eriksen, M. P. (2017). Flavored e-cigarette use: Characterizing youth, young adult, and adult users. *Prev Med Rep*, *5*, 33-40. doi:10.1016/j.pmedr.2016.11.001
- Harris, A. C., Muelken, P., Swain, Y., Palumbo, M., Jain, V., Goniewicz, M. L., . . . LeSage, M. G. (2019). Non-nicotine constituents in e-cigarette aerosol extract attenuate nicotine's aversive effects in adolescent rats. *Drug Alcohol Depend*, *203*, 51-60. doi:10.1016/j.drugalcdep.2019.05.023
- Harrison, E., Biswas, L., Avusula, R., Zhang, M., Gong, Y., & Liu, X. (2017). Effects of menthol and its interaction with nicotine-conditioned cue on nicotine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *234*(23-24), 3443-3453. doi:10.1007/s00213-017-4736-0
- Henderson, B. J., Wall, T. R., Henley, B. M., Kim, C. H., McKinney, S., & Lester, H. A. (2017). Menthol Enhances Nicotine Reward-Related Behavior by Potentiating Nicotine-Induced Changes in nAChR Function, nAChR Upregulation, and DA Neuron Excitability. *Neuropsychopharmacology*, *42*(12), 2285-2291. doi:10.1038/npp.2017.72
- Kallupi, M., de Guglielmo, G., Larrosa, E., & George, O. (2019). Exposure to passive nicotine vapor in male adolescent rats produces a withdrawal-like state and facilitates nicotine self-administration during adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol*. doi:10.1016/j.euroneuro.2019.08.299
- Koszowski, B., Viray, L. C., Stanfill, S. B., Lisko, J. G., Rosenberry, Z. R., Potts, J. L., & Pickworth, W. B. (2015). Nicotine delivery and pharmacologic response from Verve, an oral nicotine delivery product. *Pharmacol Biochem Behav*, *136*, 1-6. doi:10.1016/j.pbb.2015.06.010
- Krusemann, E. J. Z., Boesveldt, S., de Graaf, K., & Talhout, R. (2018). An E-liquid Flavor Wheel: A Shared Vocabulary based on Systematically Reviewing E-liquid Flavor Classifications in Literature. *Nicotine Tob Res*. doi:10.1093/ntr/nty101

- Ksir, C. (1983). Taste and nicotine as determinants of voluntary tobacco use by hamsters. *Pharmacol Biochem Behav*, *19*(4), 605-608. doi:10.1016/0091-3057(83)90335-0
- Landry, R. L., Groom, A. L., Vu, T. T., Stokes, A. C., Berry, K. M., Kesh, A., . . . Payne, T. J. (2019). The role of flavors in vaping initiation and satisfaction among U.S. adults. *Addict Behav*, *99*, 106077. doi:10.1016/j.addbeh.2019.106077
- Lazard, A. J., Kowitz, S. D., Huang, L. L., Noar, S. M., Jarman, K., & Goldstein, A. O. (2017). Believability of Cigarette Warnings about Addiction: National Experiments of Adolescents and Adults. *Nicotine Tob Res*. doi:10.1093/ntr/ntx185
- Levy, D. T., Borland, R., Lindblom, E. N., Goniewicz, M. L., Meza, R., Holford, T. R., . . . Abrams, D. B. (2018). Potential deaths averted in USA by replacing cigarettes with e-cigarettes. *Tob Control*, *27*(1), 18-25. doi:10.1136/tobaccocontrol-2017-053759
- Makkar, H. P., & Becker, K. (1993). Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *J Chem Ecol*, *19*(4), 613-621. doi:10.1007/BF00984996
- Malas, M., van der Tempel, J., Schwartz, R., Minichiello, A., Lightfoot, C., Noormohamed, A., . . . Ferrence, R. (2016). Electronic Cigarettes for Smoking Cessation: A Systematic Review. *Nicotine Tob Res*, *18*(10), 1926-1936. doi:10.1093/ntr/ntw119
- Mangold, J. E., Payne, T. J., Ma, J. Z., Chen, G., & Li, M. D. (2008). Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans. *J Med Genet*, *45*(9), 578-582. doi:10.1136/jmg.2008.057844
- McGrath-Morrow, S. A., Hayashi, M., Aherrera, A., Lopez, A., Malinina, A., Collaco, J. M., . . . Chen, G. (2015). The effects of electronic cigarette emissions on systemic cotinine levels, weight and postnatal lung growth in neonatal mice. *PLoS One*, *10*(2), e0118344. doi:10.1371/journal.pone.0118344
- McMillen, R. C., Gottlieb, M. A., Shafer, R. M., Winickoff, J. P., & Klein, J. D. (2015). Trends in Electronic Cigarette Use Among U.S. Adults: Use is Increasing in Both Smokers and Nonsmokers. *Nicotine Tob Res*, *17*(10), 1195-1202. doi:10.1093/ntr/ntu213
- Mennella, J. A., & Bobowski, N. K. (2015). The sweetness and bitterness of childhood: Insights from basic research on taste preferences. *Physiol Behav*, *152*(Pt B), 502-507. doi:10.1016/j.physbeh.2015.05.015
- Mennella, J. A., Spector, A. C., Reed, D. R., & Coldwell, S. E. (2013). The bad taste of medicines: overview of basic research on bitter taste. *Clin Ther*, *35*(8), 1225-1246. doi:10.1016/j.clinthera.2013.06.007
- Miao, S., Beach, E. S., Sommer, T. J., Zimmerman, J. B., & Jordt, S. E. (2016). High-Intensity Sweeteners in Alternative Tobacco Products. *Nicotine Tob Res*, *18*(11), 2169-2173. doi:10.1093/ntr/ntw141
- Morean, M. E., Butler, E. R., Bold, K. W., Kong, G., Camenga, D. R., Cavallo, D. A., . . . Krishnan-Sarin, S. (2018). Preferring more e-cigarette flavors is associated with e-cigarette use frequency among adolescents but not adults. *PLoS One*, *13*(1), e0189015. doi:10.1371/journal.pone.0189015
- Murrin, L. C., Ferrer, J. R., Zeng, W. Y., & Haley, N. J. (1987). Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Sci*, *40*(17), 1699-1708. doi:10.1016/0024-3205(87)90020-8
- Muthumalage, T., Prinz, M., Ansah, K. O., Gerloff, J., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2017). Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine. *Front Physiol*, *8*, 1130. doi:10.3389/fphys.2017.01130
- Nesil, T., Narmeen, S., Bakhti-Suroosh, A., & Lynch, W. J. (2019). Effect of menthol on nicotine intake and relapse vulnerability in a rat model of concurrent intravenous menthol/nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*, *236*(4), 1219-1232. doi:10.1007/s00213-018-5128-9
- Ogawa, K., Tashima, A., Sadakata, M., & Morinaga, O. (2018). Appetite-enhancing effects of vanilla flavours such as vanillin. *J Nat Med*, *72*(3), 798-802. doi:10.1007/s11418-018-1206-x
- Palmatier, M. I., Lantz, J. E., O'Brien, L. C., & Metz, S. P. (2013). Effects of nicotine on olfactogustatory incentives: preference, palatability, and operant choice tests. *Nicotine Tob Res*, *15*(9), 1545-1554. doi:10.1093/ntr/ntt016

- Palmatier, M. I., O'Brien, L. C., & Hall, M. J. (2012). The role of conditioning history and reinforcer strength in the reinforcement enhancing effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 219(4), 1119-1131. doi:10.1007/s00213-011-2439-5
- Palmatier, M. I., Smith, A. L., Odineal, E. M., Williams, E. A., Sheppard, A. B., & Bradley, C. A. (2019). Nicotine self-administration with tobacco flavor additives in male rats. *Nicotine Tob Res*. doi:10.1093/ntr/ntz053
- Paschke, M., Hutzler, C., Henkler, F., & Luch, A. (2015). Toward the stereochemical identification of prohibited characterizing flavors in tobacco products: the case of strawberry flavor. *Arch Toxicol*, 89(8), 1241-1255. doi:10.1007/s00204-015-1558-x
- Ponzoni, L., Moretti, M., Sala, M., Fasoli, F., Mucchietto, V., Lucini, V., . . . Braidà, D. (2015). Different physiological and behavioural effects of e-cigarette vapour and cigarette smoke in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25(10), 1775-1786. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.06.010
- Rangel-Gomez, M., Cruz-Cano, R., Van Wagoner, C., Kidanu, A., McDonald, C. G., & Clark, P. I. (2019). Dissociating the effect of flavor and nicotine in smokeless tobacco products using electroencephalography: The case of wintergreen flavors. *Addict Behav*, 91, 82-89. doi:10.1016/j.addbeh.2018.11.013
- Rankin, K. M., & Marks, L. E. (2000). Chemosensory context effects: role of perceived similarity and neural commonality. *Chem Senses*, 25(6), 747-759. doi:10.1093/chemse/25.6.747
- Robinson, S. F., Grun, E. U., Pauly, J. R., & Collins, A. C. (1996). Changes in sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors following chronic nicotine and corticosterone treatments in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(3), 587-593. doi:10.1016/0091-3057(95)02281-3
- Rom, O., Pecorelli, A., Valacchi, G., & Reznick, A. Z. (2015). Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann N Y Acad Sci*, 1340, 65-74. doi:10.1111/nyas.12609
- Schneller, L. M., Lindgren, B. R., Shields, P. G., Hatsukami, D. K., & O'Connor, R. J. (2017). Strong preference for mint snus flavor among research participants. *Addict Behav Rep*, 6, 51-55. doi:10.1016/j.abrep.2017.07.004
- Shaffer, H. J. (1986). On smokeless tobacco, addictive behavior and warning labels. *J Subst Abuse Treat*, 3(1), 41-46.
- Smith, A., & Roberts, D. C. (1995). Oral self-administration of sweetened nicotine solutions by rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 120(3), 341-346. doi:10.1007/bf02311182
- Soule, E. K., Lopez, A. A., Guy, M. C., & Cobb, C. O. (2016). Reasons for using flavored liquids among electronic cigarette users: A concept mapping study. *Drug Alcohol Depend*, 166, 168-176. doi:10.1016/j.drugalcdep.2016.07.007
- Vogel, E. A., Prochaska, J. J., Ramo, D. E., Andres, J., & Rubinstein, M. L. (2019). Adolescents' E-Cigarette Use: Increases in Frequency, Dependence, and Nicotine Exposure Over 12 Months. *J Adolesc Health*, 64(6), 770-775. doi:10.1016/j.jadohealth.2019.02.019
- Wang, T., Wang, B., & Chen, H. (2014). Menthol facilitates the intravenous self-administration of nicotine in rats. *Front Behav Neurosci*, 8, 437. doi:10.3389/fnbeh.2014.00437
- Westman, E. C., Tomlin, K. F., Perkins, C. E., & Rose, J. E. (2001). Oral nicotine solution for smoking cessation: a pilot tolerability study. *Nicotine Tob Res*, 3(4), 391-396. doi:10.1080/14622200126973
- Wickham, R. J., Nunes, E. J., Hughley, S., Silva, P., Walton, S. N., Park, J., & Addy, N. A. (2018). Evaluating oral flavorant effects on nicotine self-administration behavior and phasic dopamine signaling. *Neuropharmacology*, 128, 33-42. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.029
- Yerger, V. B. (2011). Menthol's potential effects on nicotine dependence: a tobacco industry perspective. *Tob Control*, 20 Suppl 2, ii29-36. doi:10.1136/tc.2010.041970
- Zhang, M., Harrison, E., Biswas, L., Tran, T., & Liu, X. (2018). Menthol facilitates dopamine-releasing effect of nicotine in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav*, 175, 47-52. doi:10.1016/j.pbb.2018.09.004
- Zhu, S. H., Sun, J. Y., Bonnevie, E., Cummins, S. E., Gamst, A., Yin, L., & Lee, M. (2014). Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*, 23 Suppl 3, iii3-9. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-051670
- Zins, B. J., Sandborn, W. J., Mays, D. C., Lawson, G. M., McKinney, J. A., Tremaine, W. J., . . . Lipsky, J. J. (1997). Pharmacokinetics of nicotine tartrate after single-dose liquid enema, oral, and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*, 37(5), 426-436. doi:10.1002/j.1552-4604.1997.tb04320.x

Partie 1

Association orale de la nicotine à un additif aromatique dans le but de modifier ses propriétés gustatives aversives et de déterminer les conditions optimales du mélange

Design expérimental

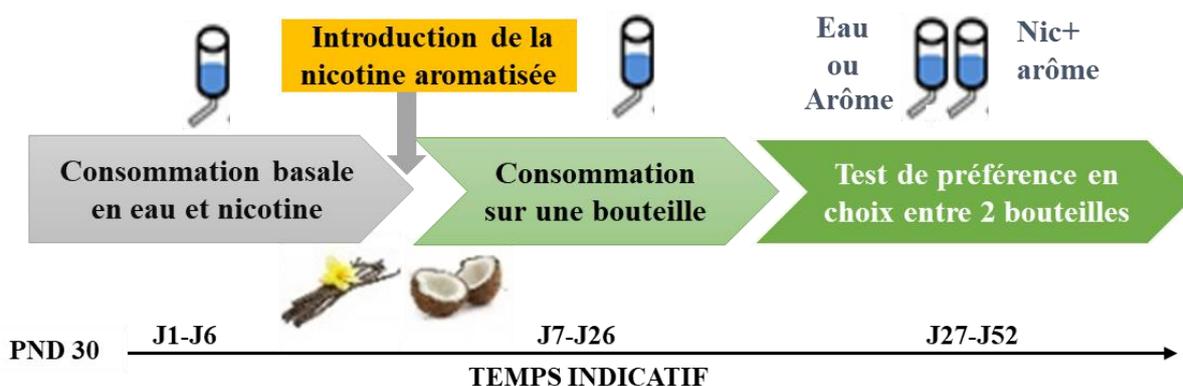


Fig1.1 : Protocole expérimental : Consommation de solutions en accès libre. Les mesures individuelles des consommations d'eau et de nicotine (n=14) sont faites avant introduction des solutions contenant les additifs aromatiques de vanille (n=7) et de noix de coco (n=7). La consommation de chaque solution est mesurée par accès à une bouteille avant la mesure des préférences des solutions de nicotine aromatisées par rapport à l'eau ou à l'arôme.

Tout au long d'une période d'une semaine précédant les tests, 14 souris mâles C57BL/6J âgées de 32 jours et pesant 13,65 g en moyenne, sont acclimatées aux conditions de l'animalerie. Elles sont ainsi hébergées en cages individuelles afin de permettre des mesures individuelles de leur prise liquide.

En début d'expérience (J1-J6), les animaux établissent des habitudes de consommation cohérentes individuellement sur des bouteilles remplies d'eau du robinet et accessibles, fixées sur les grilles des cages d'hébergement (consommation basale en eau mesurée avant l'introduction des solutions expérimentales). Après ceci, ces animaux ont accès à une bouteille de nicotine dissoute dans l'eau à 60 µg/mL (voir fig. 1.1, design expérimental).

Au J7, les souris sont assignées à deux groupes expérimentaux: un groupe recevant les solutions aromatisées à la vanille (n=7) et un autre à la de noix de coco (n=7). La nicotine aromatisée (60 µg/mL) et l'eau aromatisée (arômes à 0,01%, 0,1% et 1%) sont d'abord testées selon une consommation en accès à une seule bouteille (voir fig. 1.1, design expérimental).

A partir de J27, nous avons procédé à des tests de préférence sur 2 bouteilles. Nous avons premièrement mesuré la préférence de solutions de nicotine aromatisées par rapport à l'eau puis par rapport à l'eau+arôme. Ceci est fait afin de choisir les conditions permettant une consommation orale volontaire de nicotine optimale.

Analyses statistiques

La comparaison de la consommation des deux solutions d'eau et de nicotine par le même groupe de souris sur une bouteille est faite par un Test-t pour échantillons appariés.

L'effet de la solution (type et concentration) sur la consommation en accès une bouteille et sur la préférence des solutions aromatisées de nicotine par rapport à l'eau ou à l'arôme pour les deux groupes (vanille et noix de coco) est analysé par ANOVA mesures répétées avec un facteur arôme et un facteur test. Au cas où une interaction entre les facteurs existe une analyse post hoc par le test LSD est faite.

Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0.05$ pour tous les tests.

Partie 2

Association de la nicotine à un additif aromatique : Effets sur les propriétés renforçantes de la nicotine et sur les différents stades du processus de dépendance par auto-administration orale

Design expérimental

Saccharine	Nicotine arôme vanille ou vanille 1%					
0,1%	40, 80 et 120µg/ml		0, 20, 40 et 80µg/ml		120µg/ml	40 ou 120µg/ml
Pre-training FR1-FR2	Acquisition et stabilisation FR2-FR3	Motivation PR2	Extinction et rechute	Sensibilité à la nicotine orale FR3	Effets centraux: Tests nicotine et mécamylamine	Prélèvement de sang et dosage de la cotinine sérique

Fig 1.2 : Protocole expérimental: Après pré-entraînement à la solution de saccharine 0.1%, les différents stades du processus addictifs sont évalués : l'acquisition et le maintien du comportement d'AAO de nicotine arôme vanille (n=12) ou de vanille 1% seule (n=11) sont faits graduellement sur 3 concentrations croissantes de nicotine (40, 80 et 120 µg/mL). Une fois le comportement stabilisé, la motivation est testée en PR2 afin d'évaluer la valeur incentive des mêmes récompenses liquides. La rechute est aussi étudiée après présentation de la drogue ou du stimulus visuel qui lui est préalablement associé. Enfin, les sensibilités aux effets oraux, centraux et sanguins de la nicotine orale sont respectivement étudiées par une courbe de dose-réponse, des challenges pharmacologiques (mécamylamine/nicotine) et le dosage de la cotinine sérique.

L'AAO est faite dans le but de disséquer les différents stades du processus addictif modélisés grâce aux différentes conditions de réponse opérante pour la nicotine associée à un additif aromatique. La vanille est l'additif choisi dans la partie 1 de ce chapitre afin de permettre la consommation volontaire de nicotine.

Dans cette expérience, 23 souris C57BL/6J mâles (PND 37-41) pesant en moyenne 18,30 g au début du conditionnement sont utilisées. Pour optimiser le travail pour les récompenses liquides, les souris sont privées d'eau, 2h avant le début de chaque session d'AAO.

Suite au pré-entraînement les souris sont divisées en deux groupes équivalents en réponse opérante: le groupe vanille 1% seule (n=11) et le groupe nicotine (à partir de 40 µg/mL/50µL) arôme vanille (n=12). Les animaux sont entraînés à l'AA journalière de récompenses liquides, phase d'acquisition pendant laquelle ils passent progressivement d'un protocole de renforcement FR2 à un FR3 (voir design expérimental fig1.2). Un stimulus lumineux de 3s apparaît au-dessus du trou actif après le nombre requis de visites du trou actif, signalant la distribution de la récompense dans l'abreuvoir. La fin de la séance est signalée par éclairage de la lumière du plafonnier de la cage d'AAO. Chaque séance est suivie de 15 minutes de mesure de la réponse persévérante en l'absence de drogue signalée reflétant la recherche de la drogue en son absence (accès aux trous mais impossibilité de distribuer des récompenses) (voir fig. 1.3).

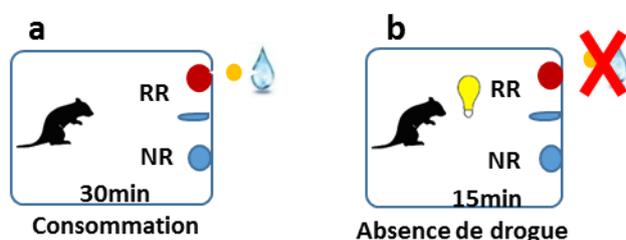


Fig1.3 : Représentation schématique des conditions de séance d'AAO : (a) phase de consommation et de disponibilité de la drogue avec association à un stimulus visuel et (b) conditions de fin de séance avec absence de drogue signalée par l'illumination de la lumière du plafonnier de la cage.

Une fois le comportement d'AAO est stable et robuste, les souris sont testées pour déterminer leur niveau de motivation dans le cadre d'un PR2 permettant la mesure du point de rupture motivationnel (breaking point).

Ensuite, le comportement de réinstallation est modélisé dans le but de dissocier les facteurs pouvant être impliqués dans la rechute à la nicotine. Ce comportement est mesuré par la différence de comportement entre la période d'extinction de 30 minutes et la période de présentation après le stimulus.

Au fil du conditionnement, nous avons remis en question la concentration de nicotine (40 µg/mL) à cause de la non-observation de l'augmentation de la valeur incitative de la récompense chez le groupe recevant la nicotine. L'acquisition et la stabilisation de la réponse, les tests de motivation et de rechute ont alors été reproduits chez les mêmes souris à des concentrations plus élevées (80 et 120 µg/mL) afin d'optimiser les effets renforçateurs primaires de la nicotine sur le comportement et secondaire sur les signaux qui lui sont associés. Ceci nous permet aussi de caractériser les effets aversifs de la nicotine à des concentrations plus élevées par voie orale.

La modulation du comportement est ensuite évaluée par plusieurs tests. Une courbe de dose-réponse à 20, 40 et 80 µg/mL de nicotine est faite en plus des défis de changement de récompense

(séances vanille ou eau seule) permettent d'évaluer différents critères pouvant jouer un rôle dans l'AAO de nicotine. De même, l'effet sur le comportement du prétraitement par la mécamylamine ou la nicotine a été évalué.

Enfin, 90 min suivant la fin de la dernière séance d'AAO, un prélèvement sanguin est fait afin de permettre le dosage de la cotinine sérique suivant l'AA de nicotine à 40 et 120 µg/mL.

Analyses statistiques

La comparaison des deux groupes pour la même variable est faite par ANOVA à un facteur (groupe, à 2 niveaux).

Les analyses de comparaisons entre les groupes, les tests et la chronologie de la réponse opérante sont faites par ANOVA mesures répétées. Au cas où une interaction entre les facteurs existe une analyse post hoc par le test LSD est faite.

Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0.05$ pour tous les tests.

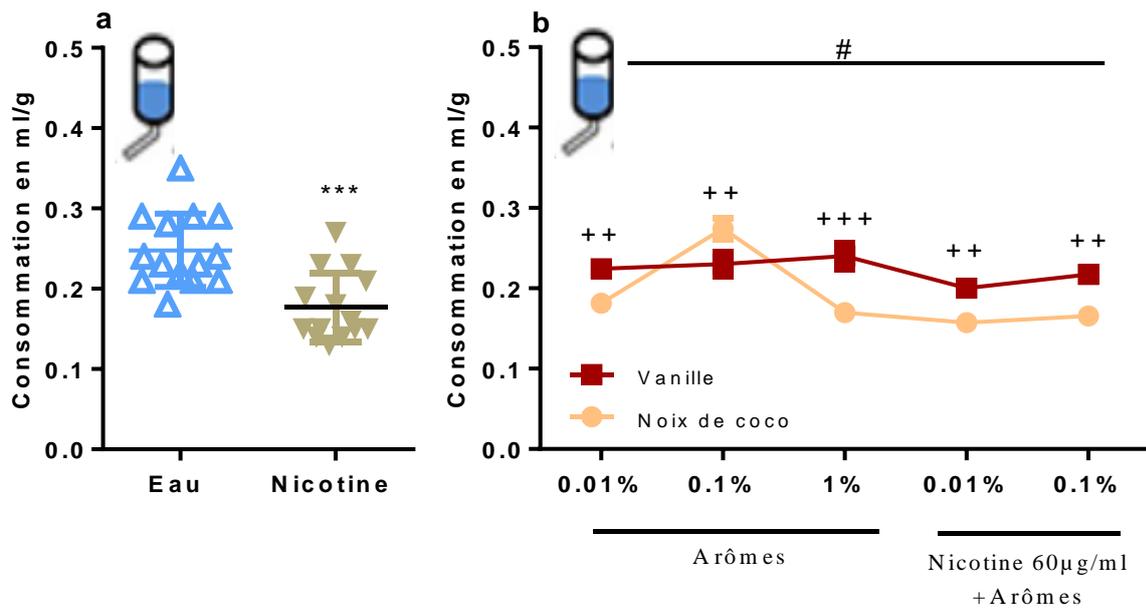


Fig 1.1.1 : Consommation sans choix sur une bouteille : (a) Consommation basale de solutions d'eau et de nicotine 60 µg/mL (n=14) chez les souris *a posteriori* assignées aux groupes suivant : noix de coco (n=7) et vanille (n=7) pour l'étude de (b) la consommation par accès à une seule bouteille de solutions aromatisées, nicotinisées ou pas. ***p<0.001, test-t, # p<0.05 effet principal arôme par ANOVA mesures répétées, ++p<0.01 et +++p<0.001, post-hoc vanille vs. noix de coco. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

Résultats expérimentaux

Partie 1

Association orale de la nicotine à un additif aromatique dans le but de modifier ses propriétés gustatives aversives et de déterminer les conditions optimales du mélange

Ces expériences ont été faites dans le but de déterminer si les propriétés gustatives aversives de la nicotine peuvent être modifiées par l'ajout d'additifs aromatiques sans ajout d'édulcorants tels que le sucrose ou la saccharine qui sont classiquement utilisés pour permettre une prise volontaire.

1. La nicotine réduit la consommation de liquide

Nous avons procédé en premier lieu à l'évaluation de la consommation basale en eau de toutes les souris afin de pouvoir ensuite examiner la consommation de nicotine à 60 µg/mL dans l'eau. Des analyses Test-t pour échantillons appariés montrent une baisse significative de la consommation globale en liquide sur 24h avec un volume de 0.25 ± 0.01 mL/g de poids pour l'eau contre 0.18 ± 0.01 mL/g pour la nicotine [$t(13)=8.27$, $p<0.001$] (fig 1.1.1a). Ce résultat montre l'impossibilité d'auto-administration de solutions de nicotine sans additifs.

2. La consommation sans choix sur une bouteille dépend de l'arôme et de la concentration de l'additif aromatique

Les souris sont réparties en deux groupes équivalents en consommation basale en eau afin de procéder à des tests de consommation avec les arômes de vanille et de noix de coco. L'analyse par ANOVA mesures répétées montre un effet principal de l'arôme [$F(1,12)=6.87$, $p=0.02$] et un effet principal test [$F(4,48)=36.23$, $p<0.001$] sur la consommation des solutions ainsi qu'une interaction arôme x test significative [$F(4,48)=22.53$, $p<0.001$]. Une différence significative des deux groupes sur tous les tests ($p<0.01$ minimum) est démontrée par une analyse post-hoc par le test LSD Fisher. L'analyse de l'effet principal arôme montre que les solutions aromatisées à la vanille sont plus préférées à celles aromatisées à la noix de coco (0.22 vs. 0.19 mL/g) (fig 1.1.1b).

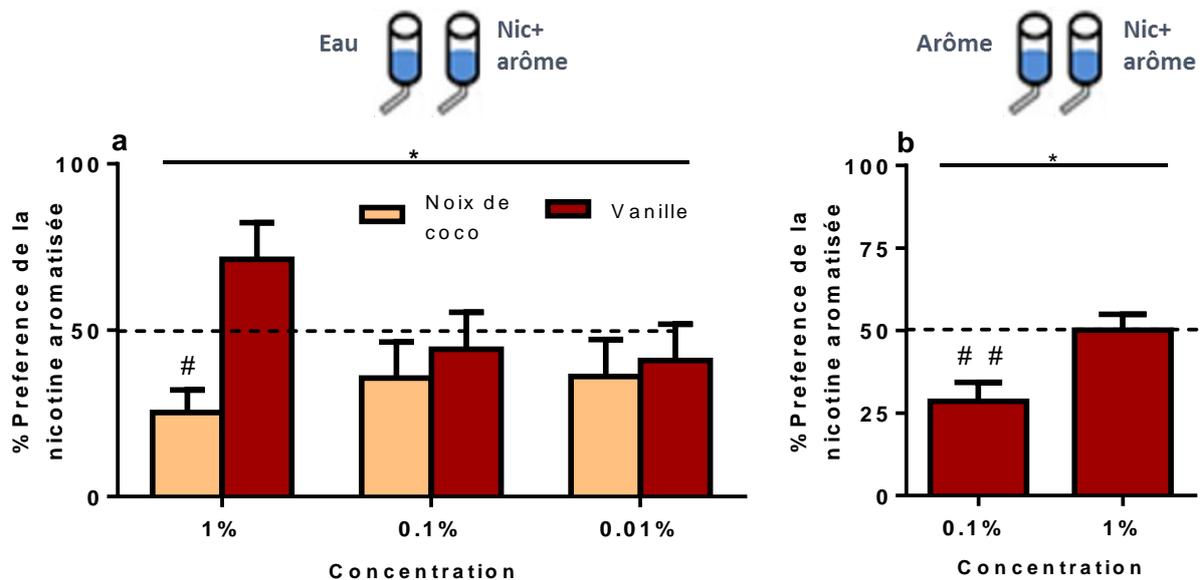


Fig 1.1.2 : Examen des propriétés aversives de la nicotine après l'ajout d'arômes dans un paradigme de choix entre deux bouteilles : pourcentage de préférence des solutions aromatisées de nicotine à différentes concentrations d'arômes (a) par rapport à l'eau (n=7/arôme) ou (b) par rapport à une solution aromatisée à la vanille sans nicotine (groupe nicotine+vanille, n=7). *p<0.05 pour les résultats du test-t et #p<0.05, ##p<0.01 pour la comparaison à une valeur standard de 50%; Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM

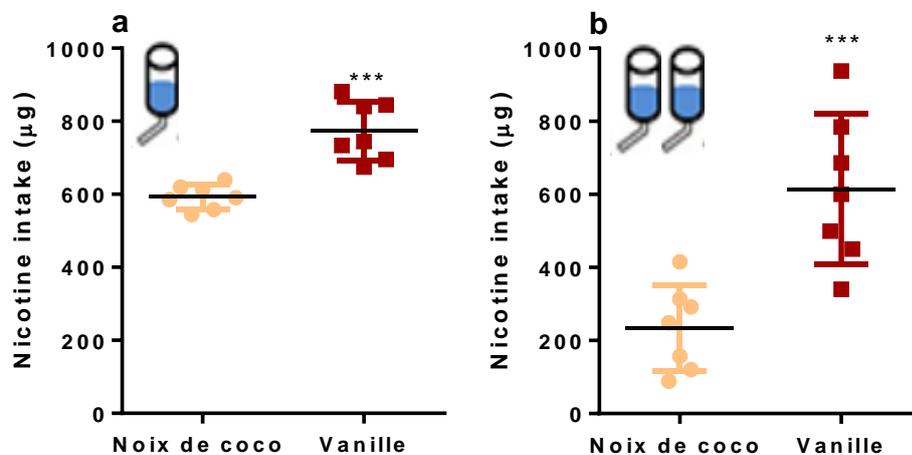


Fig 1.1.3 : Mesure de l'exposition à la nicotine en μ g par souris : (a) consommation sur une bouteille et (b) consommation en choix entre deux bouteilles; nicotine+noix de coco (n=7) et nicotine+vanille (n=7). ***p<0.001 ; Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

3. *Les additifs aromatiques améliorent la préférence pour la nicotine*

En utilisant le protocole de choix entre 2 bouteilles, nous avons examiné la préférence pour une solution de nicotine aromatisée par rapport à l'eau. Nous avons réalisé une comparaison de l'arôme vanille à l'arôme noix de coco en dose-réponse (fig. 1.1.2a). L'ANOVA mesures répétées montre que la nicotine aromatisée à la vanille est préférée à la nicotine aromatisée à la noix de coco (effet principal arôme vanille vs. noix de coco [$F(1,12)=4.6$, $p=0.05$]). En revanche, l'analyse ne montre pas d'effet concentration [$F(2,24)=0.56$, $p=0.58$], ni d'interaction arôme x concentrations [$F(2,24)=2.62$, $p=0.09$]. La comparaison de préférence à une valeur standard de 50% montre aussi que la solution de nicotine aromatisée à la noix de coco 1% est moins préférée que l'eau [$t(6)=-3.65$, $p=0.01$], suggérant une tendance à l'aversion pour ce mélange.

L'arôme de vanille étant préféré à l'arôme de noix de coco, des tests de préférence qui suivent ont été conduits avec l'arôme vanille. Dans un protocole de choix entre deux bouteilles : nicotine arôme vanille vs. eau arôme vanille, la dose réponse indique que la préférence pour la nicotine arôme vanille à 1% est significativement supérieure à celle pour la vanille à 0.01% [$t(6)=-2.68$, $p=0.04$]. De plus, le mélange de la nicotine avec l'arôme à 0.01% ne masque pas l'aversion pour la nicotine ($p<0.01$). La vanille à 1% rend la nicotine 60 µg/mL indétectable dans nos conditions avec une préférence équivalente en comparaison avec la vanille seule [$t(6)=0.04$, $p>0.05$, n.s.] ce qui montre que ces deux solutions sont isopalatables (fig 1.1.2b).

4. *L'ajout d'additif aromatique vanille augmente l'exposition à la nicotine*

Nous avons ensuite examiné la consommation de nicotine à une bouteille ou en choix sur deux bouteilles, et comparé les résultats entre les arômes par Test-t pour échantillons non-appariés. Les résultats montrent que l'association de la nicotine à l'arôme vanille permet une exposition plus importante à la nicotine comparée à son association avec l'arôme noix de coco. Ceci est valable pour la consommation sur une bouteille 593 ± 13 µg vs. 774 ± 31 µg, ($t(12)=-5.44$, $p<0.001$) (fig 1.1.3a) et en choix entre deux bouteilles 234 ± 44 µg vs. 614 ± 78 µg, ($t(12)=-4.24$, $p<0.001$) (fig 1.1.3b).

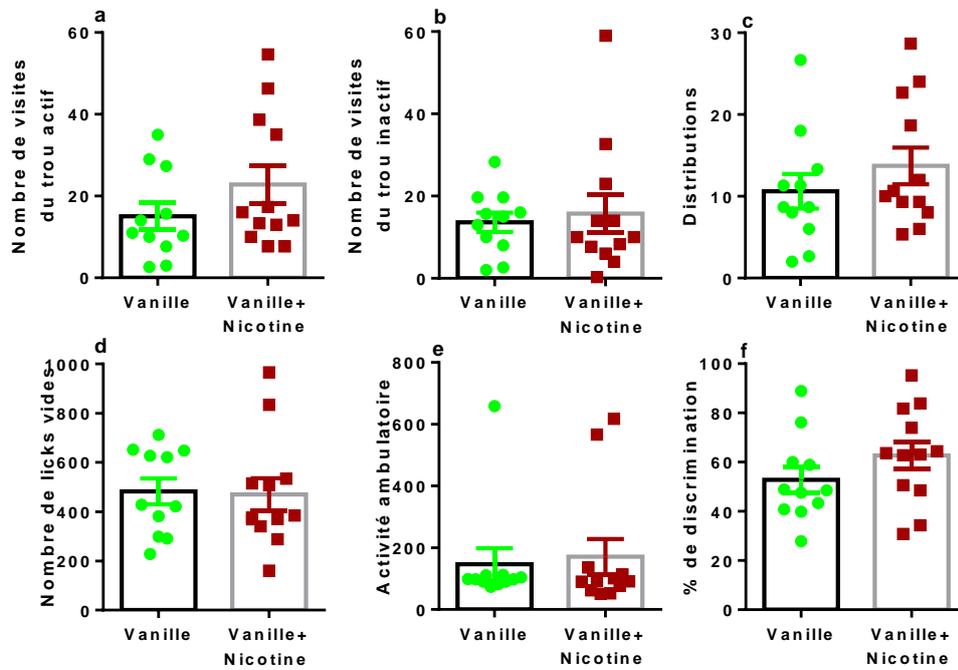


Fig 1.2.1 : Stabilisation de l'AAO au cours du pré-entraînement saccharine 0.1% en FR 2 chez les souris *a posteriori* assignées aux groupes suivant : nicotine+vanille 1% (n=12), et vanille 1% (n=11) ; (a) nombre de visites du trou actif, (b) nombre de visites du trou inactif, (c) nombre de distributions, (d) nombre de licks vides, (e) activité locomotrice ambulatoire et (f) pourcentage de discrimination sur la stabilisation en séances FR2 30min. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

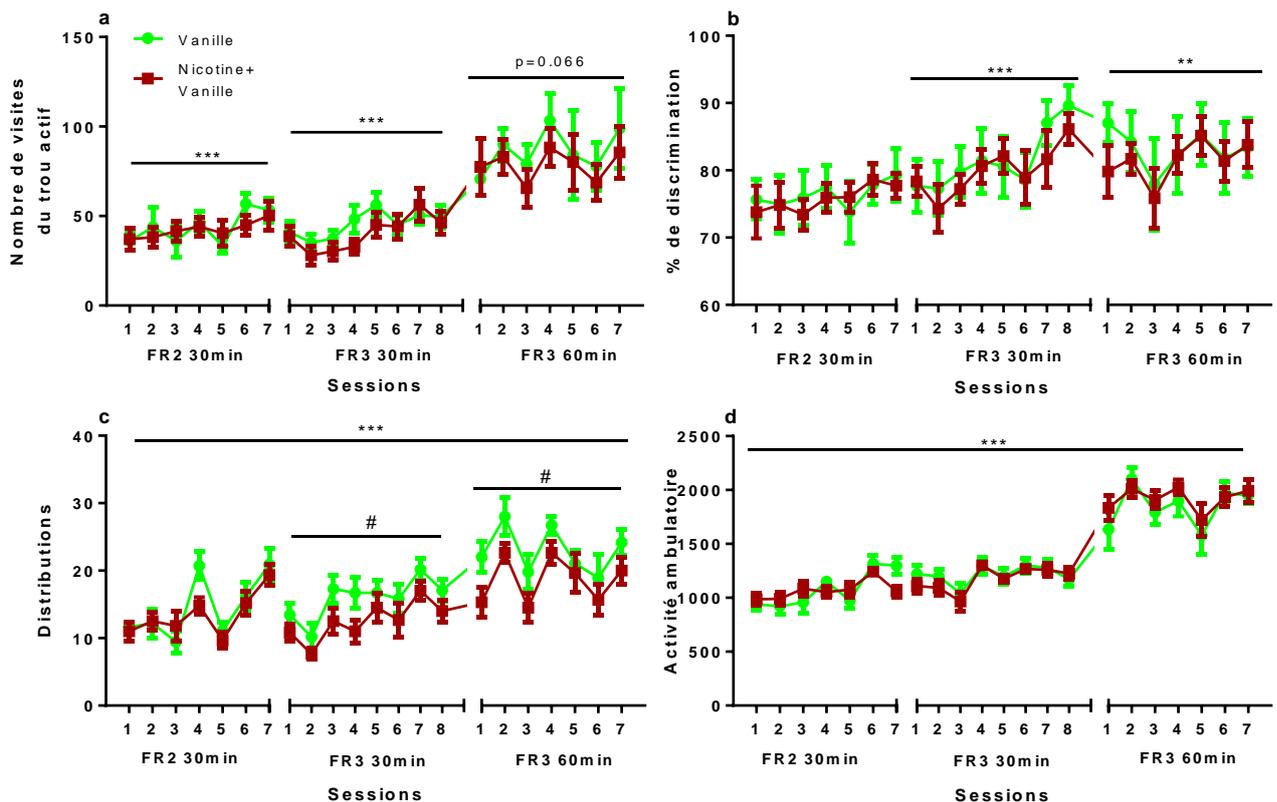
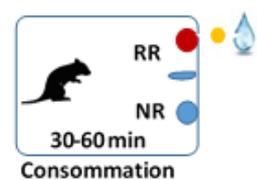


Fig 1.2.2 : Acquisition de l'AAO de la nicotine 40 μ g/mL associée à la vanille1% chez les souris assignées aux groupes: nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11) ; (a) nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) pourcentage de discrimination, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire, sur la chronologie en séances FR2 30min, FR3 30 min et FR3 60min ; # $p \leq 0.05$, effet principal du groupe ; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, effet principal des conditions de séance. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.



Partie 2

Association de la nicotine à un additif aromatique : Effets sur les propriétés renforçantes de la nicotine et sur les différents stades du processus addictif dans un protocole d'auto-administration orale

Cette expérience est faite dans le but d'examiner les effets bidirectionnels de l'association orale de nicotine à un additif aromatique. Ces effets comprennent : (1) la promotion du processus addictif avec ses différents stades (acquisition, stabilisation, extinction et rechute) et (2) le renforcement secondaire par la nicotine sur les stimuli, augmentant ainsi leurs propriétés incitatives.

1. Groupes équivalents en pré-entraînement à la saccharine

Tous les animaux sont pré-entraînés à la réponse opérante pour une solution de saccharine 0.1% afin d'associer les visites dans le trou actif avec la distribution d'une récompense liquide. Après le même nombre de séances en FR1 et FR2 saccharine, les souris ont été divisées en deux groupes équivalents. L'analyse par ANOVA à un facteur indépendant (groupe) sur la moyenne des 3 dernières séances après stabilisation du comportement en FR2 confirme que les 2 groupes sont équivalents pour toutes les variables comportementales mesurées. Ainsi, la réponse opérante du groupe « vanille » n'est, *a priori*, pas différent du groupe « nicotine arôme vanille » : visites du trou actif [$F(1,21)=1.77$, $p=0.2$] (fig 1.2.1a), visites du trou inactif [$F(1,21)=0.15$, $p=0.7$] (fig 1.2.1b), le nombre de distributions [$F(1,21)=1.01$, $p=0.33$] (fig 1.2.1c), le nombre de *licks* vides [$F(1,21)=0.02$, $p=0.89$] (fig 1.2.1d), l'activité ambulatoire [$F(1,21)=0.09$, $p=0.76$] (fig 1.2.1e), et le % de discrimination entre les trous actifs et inactifs [$F(1,21)=1.7$, $p=0.21$] (fig 1.2.1f).

2. Acquisition et stabilisation de l'auto administration orale (AAO) de nicotine arôme vanille

a. Analyse chronologique de l'acquisition complète

Qu'ils travaillent pour la vanille ou pour la nicotine arôme vanille, les animaux montrent la même courbe d'acquisition du comportement d'AAO.

ii. Analyse de la réponse durant la séance

L'augmentation du travail demandé pour l'AAO produit une augmentation similaire du nombre de visites dans le trou actif au fur et à mesure des séances : effet principal séance pour FR2 30min [$F(6,126) = 3.98$, $p=0.001$], FR3 30min [$F(7,147) = 5.77$, $p<0.001$]. Quand on augmente le temps d'accès à 60 min, les 2 groupes montrent une tendance à travailler plus au fur et à mesure des séances FR3 60min [$F(6,126) = 2.03$, $p=0.066$] (fig 1.2.2a).

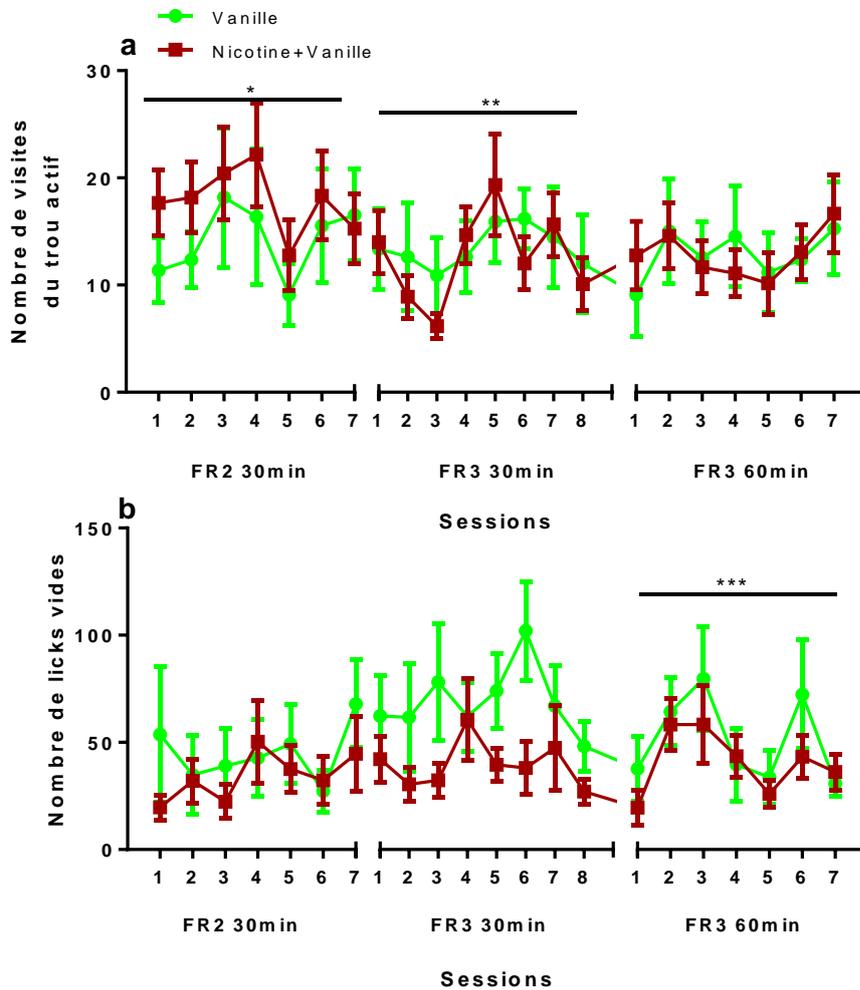
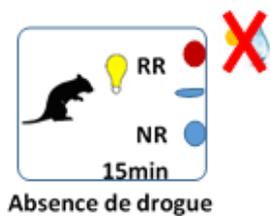


Fig 1.2.3 : Mesure de la réponse persévérative en l'absence de drogue signalée en fin de séance d'AAO de nicotine 40 µg/mL associée à la vanille 1% chez les souris assignées aux groupes: nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11) ; (a) nombre de visites du trou actif en l'absence de drogue et (b) nombre de licks vides sur la chronologie en séances FR2 30min, FR3 30min et FR3 60min ; *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, effet principal des conditions de séance. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.



Les 2 groupes sont équivalents en nombre de visites du trou actif : effet principal groupe non-significatif pour FR2 30min [F(1,21) =0.03, p=0.86], FR3 30min [F(1,21)=0.67, p=0.42], FR3 60min [F(1,21)=0.24, p=0.63].

De même, on remarque une augmentation du pourcentage de discrimination au fur et à mesure de l'acquisition et du changement des conditions de séance : effet principal séance pour FR3 30min [F(7,147) =5.46, p<0.001], FR3 60min [F(6,126) =3.32, p=0.004] (fig 1.2.2b). Les deux groupes discriminent de façon équivalente, effet groupe et interaction p>0.05, n.s.

L'analyse du nombre de distributions au fur et à mesure des séances d'AAO montre un effet principal séance pour FR2 30min [F(6,126) =11.74, p<0.001], FR3 30min [F(7,147) =5.90, p<0.001] et FR3 60min [F(6,126) =6.15, p<0.001]. Nos deux groupes sont équivalents en nombre de distributions pour les conditions de séances en FR2 30min [F(1,21) =0.85, p=0.37]. Quand les conditions de séances changent, le groupe recevant la vanille seule montre un nombre de distributions plus important comparé au groupe recevant la nicotine arôme vanille: FR3 30min, 15.93 vs. 12.52 [F(1,21)=5.7, p=0.03], FR3 60min, 22.96 vs.18.64 [F(1,21)=4.50, p=0.046] (fig 1.2.2c).

Enfin, l'analyse statistiques sur l'activité ambulatoire montre une évolution de celle-ci au fur et à mesure des séances (p<0.001) et de l'augmentation du temps de séance de 30 à 60min. Nos deux groupes sont équivalents, indépendamment des conditions de séance : FR2 30min [F(1,21) =0.02, p=0.88], FR3 30min [F(1,21)=0.29, p=0.60], FR3 60min [F(1,21)=0.36, p=0.56] (fig1.2.2d). Une interaction significative groupe x conditions de séance a été observée pour FR2 30min [F(6,126) =3.38, p=0.004]. Pas d'interaction groupe x conditions de séance observée en FR3, p>0.05 n.s.

iii. Analyse de la réponse persévérative

L'éclairage de la lumière du plafonnier de la cage signale la fin de la séance d'AAO ; et annonce donc l'absence de drogue. La réponse persévérative, reflétant la recherche de drogue malgré son absence (Deroche-Gamonet et al., 2004), est évaluée par des paramètres tels que le nombre de visites du trou actif et le nombre de *licks* vides.

L'augmentation du travail demandé pour l'AAO est sans effet sur le nombre de réponses persévératives sur le trou actif et sur le nombre de *licks* vides au fur et à mesure des séances (interaction groupe x conditions de séance, p>0.05 n.s., fig 1.2.3a,b).

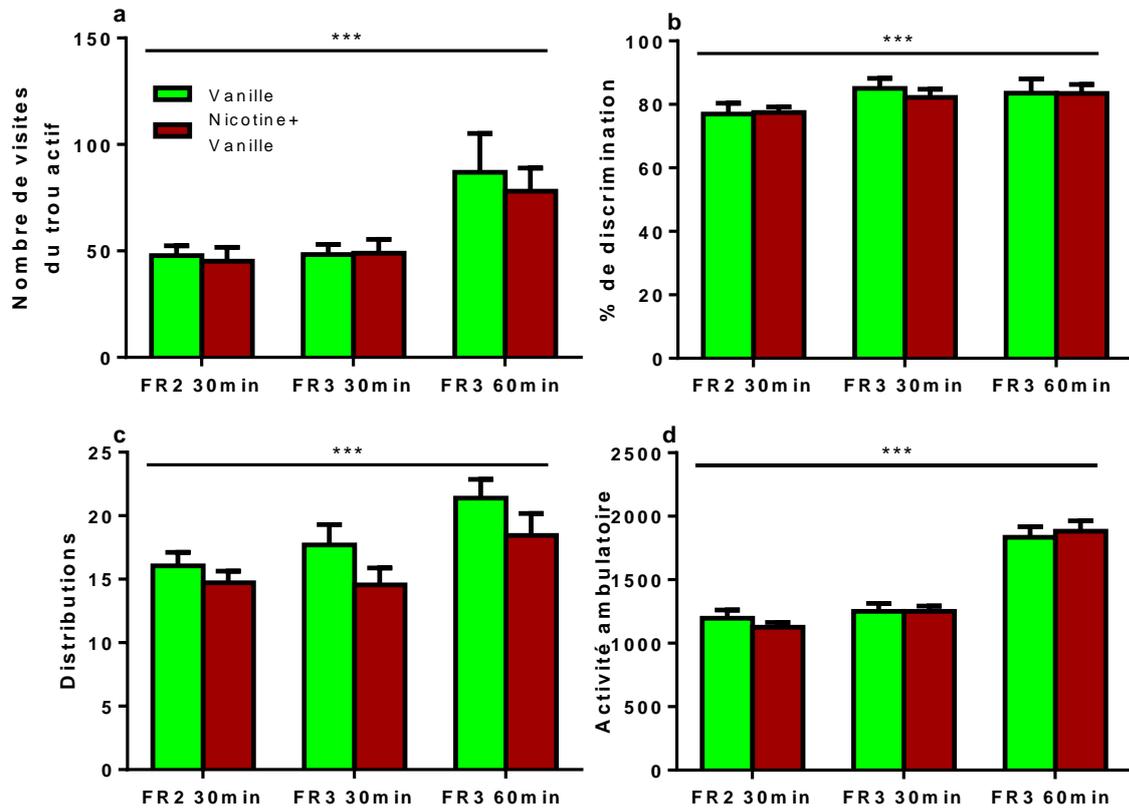


Fig 1.2.4 : Stabilisation en FR2 et FR3 de l'AAO de nicotine 40 µg/mL arôme vanille1% ; (a) nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) pourcentage de discrimination, (c) nombre de distributions et (d) activité ambulatoire chez les souris assignées aux groupes: nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11) ***p<0.001, effet principal « conditions de séance ». Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

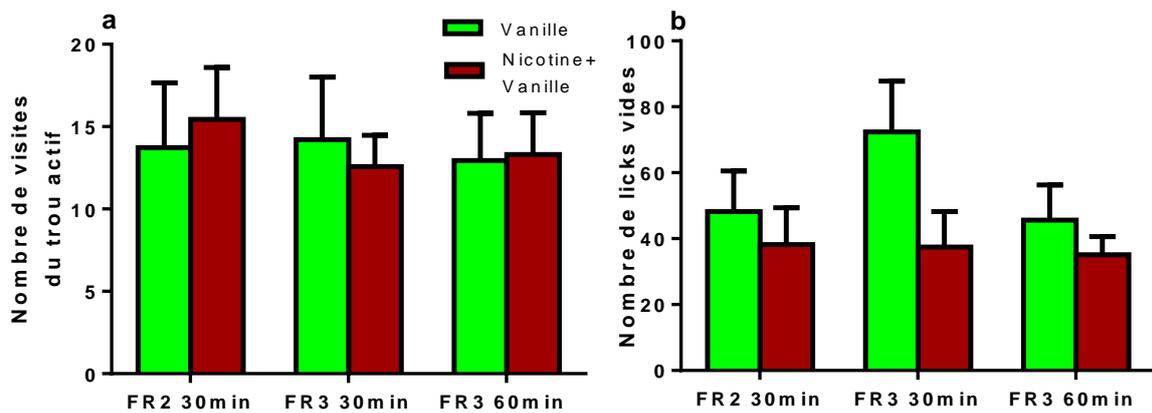
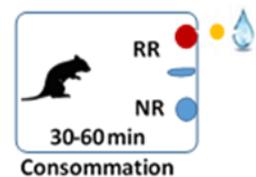
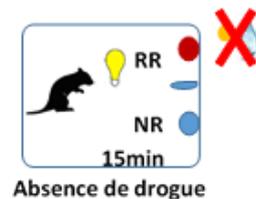


Fig 1.2.5 : Stabilisation en FR2 et FR3 de l'AAO de nicotine 40 µg/mL arôme vanille1% ; (a) nombre de visites du trou actif et (b) nombre de licks vides en l'absence de drogue signalée chez les souris assignées aux groupes: nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11). Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.



b. Rôle de l'additif sur la stabilisation de la prise orale de nicotine

i. Analyse de la réponse durant la séance

Le changement des conditions de séance modifie de façon similaire le nombre de visites du trou actif [$F(2,42)=13.6$, $p<0.001$] (fig 1.2.4a), le % de discrimination [$F(2,42)=11.71$, $p<0.001$] (fig 1.2.4b), le nombre de distributions [$F(2,42)=12.56$, $p<0.001$] (fig 1.2.4c) et l'activité locomotrice ambulatoire [$F(2,42)=117$, $p<0.001$] (fig 1.2.4d) chez les 2 groupes (effet groupe, $p>0.05$, n.s). Il n'y a pas d'interaction groupes x conditions de séances, $p>0.05$ n.s.

ii. Analyse de la réponse persévérative

L'augmentation du travail demandé pour l'AAO et le changement des conditions de séance sont sans conséquence sur le nombre de réponses persévératives sur le trou actif [$F(2,42)=0.35$, $p=0.7$] (fig 1.2.5a) et le nombre de *licks* vides en l'absence de drogue [$F(2,42)=1.51$, $p=0.23$] (fig 1.2.5b) pour les 2 groupes (effet principal groupe $p>0.05$, n.s).

3. Valeur incitative de la nicotine arôme vanille : courbe dose-réponse dans un protocole PR

Les résultats du test de motivation en ratio progressif (PR) ont été comparé par ANOVA mesures répétées avec un facteur indépendant groupe et un facteur dépendant dose. Les résultats sont représentés dans la figure 6 de l'article (page 138).

Ces résultats montrent que l'augmentation des concentrations de nicotine résulte en une diminution de la motivation. En effet, l'analyse sur le nombre total de visites du trou actif montre un effet « dose » significatif [$F(2,42)=4.13$, $p=0.02$] et une interaction dose x groupe significative [$F(2,42)=3.13$, $p=0.05$]. L'ANOVA one-way sur les réponses de chaque groupe montre un effet dose significatif pour le groupe nicotine arôme vanille [$F(2,22)=6.59$, $p=0.006$]. Ainsi, l'analyse post-hoc montre une diminution significative du nombre de réponses actives aux doses de 80 et 120 μ g de nicotine comparé à 40 μ g ($p<0.01$).

La valeur incitative de la solution d'arôme seul reste stable séance après séance de PR [$F(2,20)=2.1$, $p=0.15$].

L'ANOVA sur le point de rupture motivationnel montre un effet « dose » significatif [$F(2,42)=5.6$, $p=0.007$] sans effet principal groupe ni interaction dose x groupe, $p>0.05$, n.s.

L'analyse statistique de la durée moyenne d'une session PR montre une interaction dose x groupe significative [$F(2,42)=7.21$, $p=0.002$]. Un effet dose sur la durée pour le groupe nicotine arôme vanille est démontré (durées à 80 et 120 significativement inférieur à 40 μ g/mL, $p\leq 0.01$). Aussi, l'analyse indique qu'à la dose de 40 μ g/mL, le groupe nicotine arôme vanille atteint le point de rupture plus lentement que le groupe arôme seul (nicotine 4228 ± 504 vs. arôme 2891 ± 679 sec).

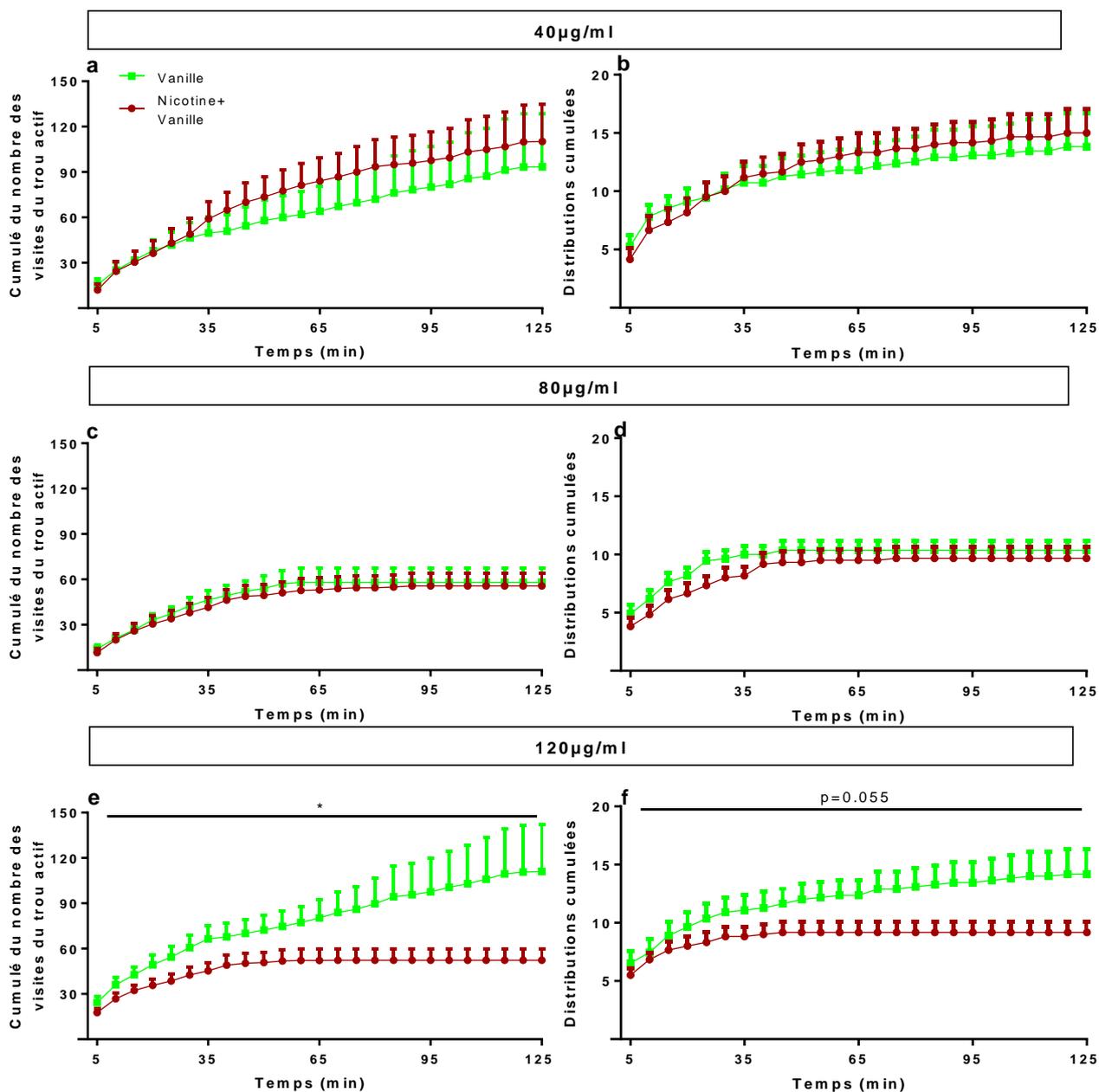


Fig 1.2.6 : Modulation des propriétés incitatives de la nicotine (40, 80 et 120 µg/mL) par la vanille ; nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11); représentations du nombre cumulé de visites du trou actif (a, c et e) et du nombre cumulé de distributions (b, d et f) durant la séance de PR2 à doses croissantes de nicotine; Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

La figure 1.2.6 présente la cinétique en nombre cumulatif sur 120 min du nombre de visites du trou actif et des distributions au cours des séances de PR aux doses respectives de 40, 80 et 120 µg/mL. L'analyse par ANOVA mesures répétées a été faite avec un facteur dépendant temps et un facteur indépendant groupe.

Les groupes présentent des réponses équivalentes en cinétique cumulée du nombre de visites du trou actif et du nombre de distribution durant tout le temps du PR aux doses de 40 et 80 µg/mL : effet principal temps, $p < 0.001$. Aucun effet groupe ou interaction groupe x temps n'a été observé, $p > 0.05$, n.s. (fig 1.2.6 a, b, c et d)

L'augmentation de la dose de nicotine à 120 µg/mL dans ce test engendre une réduction significative de la réponse opérante du groupe nicotine arôme vanille comparé au groupe arôme seul: effet principal groupe pour le nombre cumulé des visites du trou actif [$F(1,21) = 4.40$, $p < 0.05$] et le nombre cumulé des distributions [$F(1,21) = 4.12$, $p = 0.05$]. On observe aussi une interaction temps x groupe significative pour les deux paramètres : nombre cumulé des visites du trou actif [$F(24,504) = 2.52$, $p < 0.001$] et le nombre cumulé des distributions [$F(24,504) = 3.09$, $p < 0.001$] (fig 1.2.6 e, f).

4. Réinstallation de recherche de nicotine arôme vanille induit par la drogue ou par les stimuli associés à la prise de drogue

a. Étude de la recherche de nicotine après entraînement à 40 µg/mL de nicotine aromatisée

i. Rechute induite par la présentation du stimulus lumineux associé à la récompense

Une analyse par ANOVA à mesures répétées a montré un effet principal significatif du temps sur le nombre de visites du trou actif [$F(6,120) = 4.84$, $p < 0.001$] mais n'a montré ni d'effet groupe [$F(1,20) = 0.39$, $p = 0.54$] ni d'interaction temps x groupe [$F(6,120) = 0.41$, $p = 0.87$]. Les tests post hoc LSD sur l'effet temps montrent, chez les deux groupes, une augmentation significative du nombre de visites du trou actif pour tous les temps à partir de la présentation du stimulus lumineux ($p \leq 0.05$) (fig 1.2.7 a). L'absence de drogue signalée provoque la même disparition rapide du comportement de recherche chez les 2 groupes (tests post hoc n.s.)

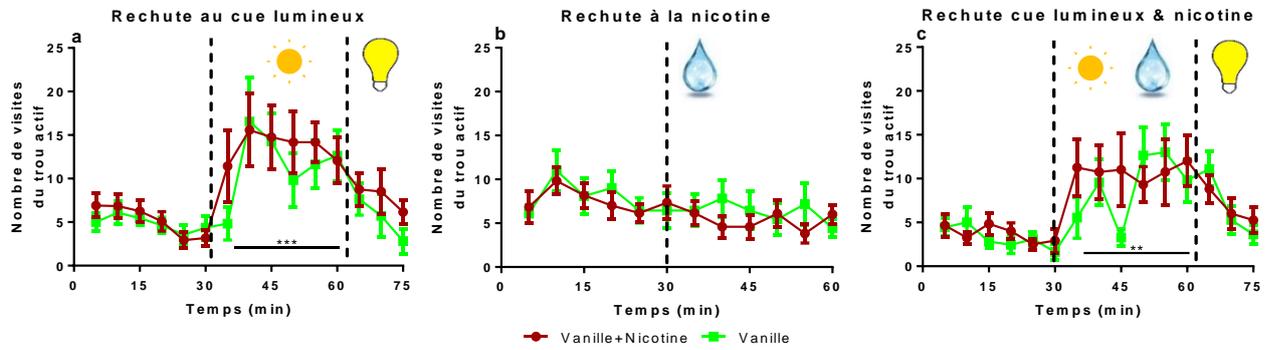


Fig 1.2.7 : Réinstallation du comportement d’AAO de nicotine à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par la présentation du signal lumineux préalablement associé à la drogue (a) à la présentation de la drogue (b) et à la présentation de l’association du signal lumineux et de la drogue (c); nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11) ; représentation du (a) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute au signal lumineux, (b) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute à la drogue (c) nombre de visites du trou actif suite à la présentation de l’association du signal lumineux et de la drogue $**p<0.01$, $***p<0.001$ effet principal du temps sur les visites du trou actif (30-60min) ; Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

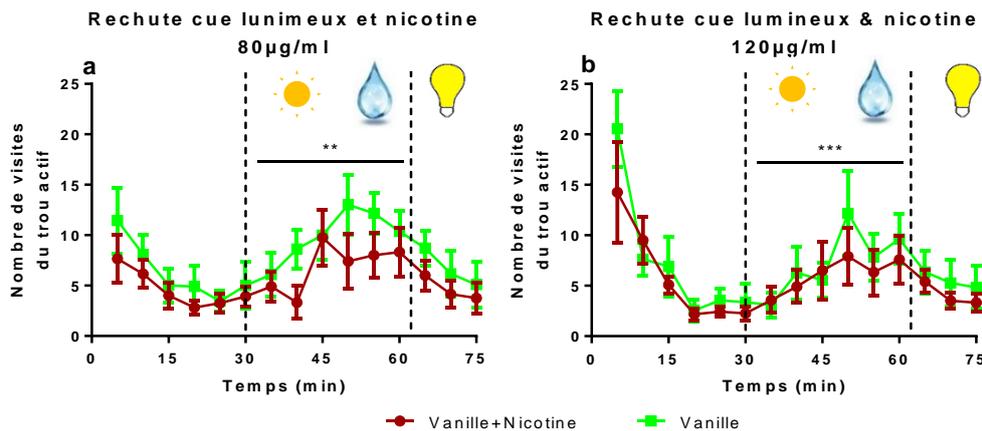


Fig 1.2.8 : Réinstallation du comportement d’AAO de nicotine à 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et à 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par la présentation de la combinaison du signal lumineux préalablement associé à la drogue et de la drogue; nicotine+vanille 1% (n=12) et vanille 1% (n=11) ; représentation du (a) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute à 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nicotine, (b) nombre de visites du trou actif pour la séance de rechute à 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nicotine ; $**p<0.01$, $***p<0.001$ effet principal du temps sur les visites du trou actif (30-60 min) ; Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

ii. Rechute induite par la présentation de la récompense

De façon surprenante, les 2 groupes n'ont pas montré de réinstallation du comportement après présentation d'une récompense liquide gratuite. L'ANOVA ne montre ni d'effet groupe [$F(1,21)=0.18$, $p=0.68$], ni d'effet temps [$F(6,126)=0.62$, $p=0.72$] ni d'interaction temps x groupe [$F(6,126)=1.84$, $p=0.10$] (fig 1.2.7b).

iii. Rechute induite par la présentation de la récompense associée au stimulus lumineux

Enfin, les 2 groupes ont rechuté à la présentation de la récompense liquide associée au stimulus lumineux. Ainsi, un effet principal significatif temps a été observé [$F(6,126)=3.82$, $p=0.002$], sans effet principal groupe [$F(1,21)=0.57$, $p=0.46$] ni interaction temps x groupe [$F(6,126)=1.35$, $p=0.24$]. Une analyse post hoc LSD sur l'effet temps montre une augmentation significative de la valeur du nombre des visites du trou actif pour tous les temps à partir de la présentation des stimuli associés ($p \leq 0.05$) (fig 1.2.7c). L'absence de drogue signalée provoque la même disparition rapide du comportement de recherche chez les 2 groupes (tests post hoc n.s.)

b. Étude du comportement de recherche de nicotine après entraînement à lumineux à 80 et à 120 µg/mL de nicotine aromatisée

Les 2 groupes ont rechuté à la présentation de la récompense liquide associée au stimulus lumineux et ceci à 80 et 120 µg/mL de nicotine arôme vanille. Ainsi, l'analyse par ANOVA mesures répétées montre un effet principal significatif temps pour les deux doses respectivement [80 µg/mL $F(6,126)=3.60$, $p=0.003$] (fig 1.2.8a) et [120 µg/mL $F(6,126)=5.27$, $p<0.001$] (fig 1.2.8b), sans effet principal groupe ni interaction temps x groupe. L'analyse post hoc par le test LSD sur l'effet temps montre une augmentation significative du nombre de visites du trou actif à partir de $t=45$ minutes soit 10-15 minutes après la présentation du signal lumineux et de la récompense liquide gratuite aux deux doses ($p<0.05$). L'absence de drogue signalée provoque la même disparition rapide du comportement de recherche chez les 2 groupes (tests post hoc n.s.).

5. Effets pharmacologiques de la nicotine

a. Courbe de dose réponse : le changement de la concentration de nicotine est détecté mais les souris ne se titrent pas complètement

L'effet-dose de la nicotine a été évalué pour les 4 différentes concentrations suivantes : 0, 20, 40 et 80 µg/mL, associée à l'arôme de vanille à 1% (fig.4 de l'article, page 135).

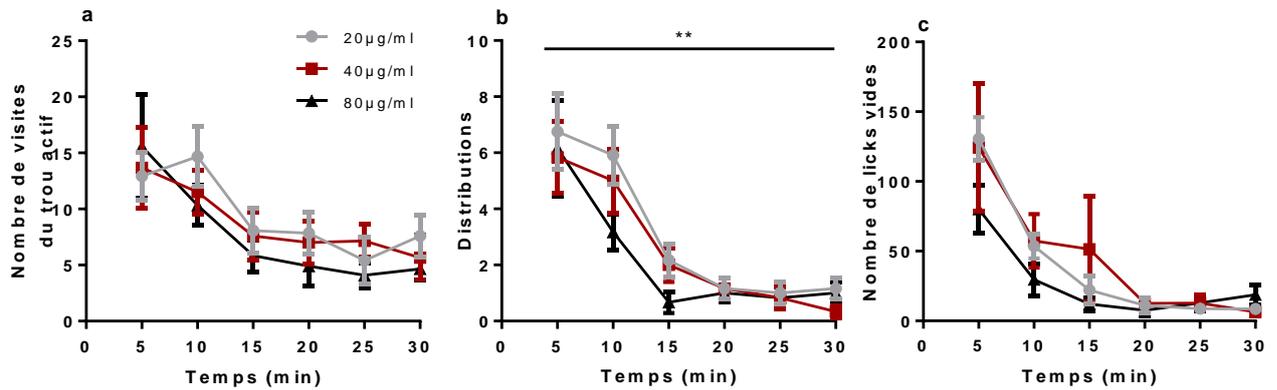


Fig 1.2.9 : Cinétiques de la courbe d'effet-dose de la nicotine en FR 3 à 20, 40 et 80 µg/mL ; nicotine+vanille 1% (n=12) ; (a) nombre de visites du trou actif, (b) nombre de distributions et (c) nombre de licks vides au fur et à mesure de la séance; **p<0.01 effet principal dose. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

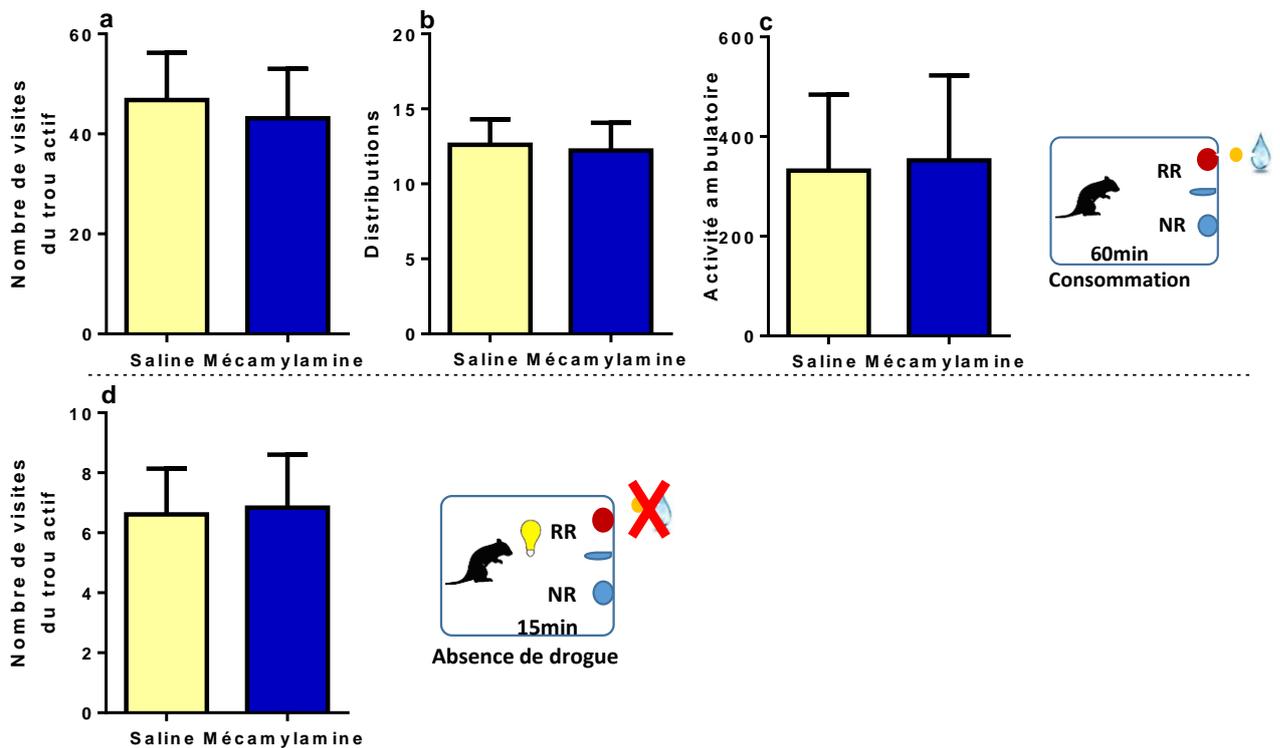


Fig 1.2.10: Effet de l'injection périphérique sous cutanée de mécamylamine 3 mg/Kg/5mL sur l'AAO de nicotine ; nicotine+vanille 1% (n=12); (a) nombre de visites du trou actif en présence de drogue, (b) nombre de distributions, (c) activité locomotrice ambulatoire et (d) nombre de visites du trou actif en l'absence de drogue signalée, sur des conditions de séance FR3 60 min ; Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM

Les analyses par ANOVA mesures répétées ont montré que les souris diminuent significativement leur nombre de visites du trou actif suite à l'augmentation de la concentration de la nicotine [effet dose $[F(3,33)=7.06, p<0.001]$]. Il y a également diminution du nombre de distributions [effet dose $[F(3,33)=15.43, p<0.001]$]. Une analyse post hoc par le test LSD a montré que les réponses à toutes les doses étaient différentes de la réponse à l'absence de nicotine ($p<0.05$). Cette réduction de la réponse opérante n'a pas résulté en une titration des souris puisque l'analyse montre une augmentation de la prise de nicotine proportionnelle à l'augmentation de la dose (effet dose $[F(2,22)=28.87, p<0.001]$) ; test post-hoc LSD, $p<0.05$). Les prises à 20, 40 et 80 $\mu\text{g/mL}$ sont respectivement de 9.1 ± 0.9 , 15.2 ± 1.96 et 25.7 ± 3.32 μg de nicotine par session.

L'étude de la cinétique des paramètres de la réponse opérante lors des séances d'effet dose a été faite par ANOVA mesures répétées.

Cette analyse montre un effet significatif du temps $[F(5,55)=8.88, p<0.001]$ sur le nombre de visites du trou actif dont la cinétique est équivalente pour les 3 différentes doses de nicotine $[F(2,22)=0.49, p=0.62]$. On n'observe pas d'interaction dose x temps, $p>0.05$, n.s (fig 1.2.9a).

De même, l'analyse du nombre de distributions montre un effet significatif du temps $[F(5,55)=14.88, p<0.001]$ et de l'augmentation de la dose de nicotine (20, 40 et 80 $\mu\text{g/mL}$) sur la cinétique $[F(2,22)=8.46, p=0.002]$. On n'observe pas d'interaction dose x temps, $p>0.05$, n.s (fig 1.2.9b).

On observe un effet significatif du temps sur le nombre des *licks* vides $[F(5,55)=16.63, p<0.001]$ mais la cinétique est équivalente pour les 3 doses $[F(2,22)=1.14, p=0.34]$. On n'observe pas d'interaction dose x temps, $p>0.05$, n.s (fig 1.2.9c).

b. Le blocage pharmacologique des récepteurs nicotiniques par la mécamylamine n'altère pas l'AAO de nicotine arôme vanille

Le comportement d'AA de nicotine arôme vanille est équivalent après injection contrôle de solution saline ou de mécamylamine à 3 mg/Kg. En effet, l'analyse des variables comportementales par ANOVA mesure répétées ne montre pas d'effet du test sur: le nombre de visites du trou actif en présence de la drogue $[F(1,11)=0.78, p=0.40]$ (fig 1.2.10a), le nombre de distributions $[F(1,11)=0.11, p=0.75]$ (fig 1.2.10b) et l'activité locomotrice ambulatoire $[F(1,11)=0.59, p=0.42]$ (fig 1.2.10c).

De même, l'injection de mécamylamine ne change par la réponse persévérative sur le trou actif en l'absence de drogue signalée, $[F(1,11)=0.02, p=0.89]$ (fig 1.2.10d).

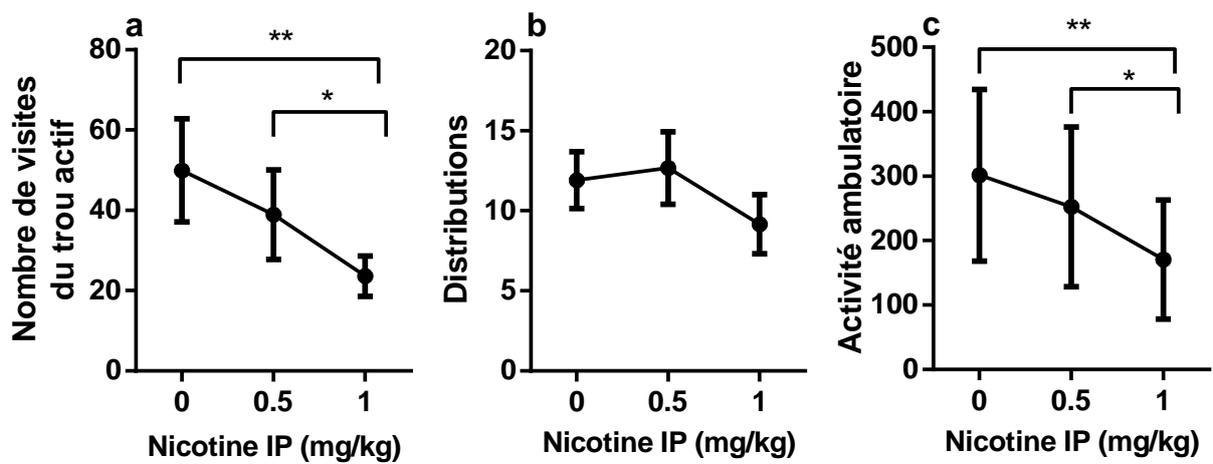


Fig 1.2.11: Effet de l'injection périphérique IP de nicotine à 0.5 et 1 mg/Kg/5mL sur l'auto-administration orale de nicotine ; nicotine+vanille 1% (n=12); (a) nombre de visites du trou actif, (b) nombre de distributions et (c) activité de va et viens sur des conditions de séance FR3 60min ; *p<0.05, **p<0.01 analyses post hoc effet dose. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

c. Le prétraitement par la nicotine n'augmente pas les propriétés incitatives de la solution nicotine arôme vanille

L'étude des paramètres de la réponse opérante en doses réponse lors des séances précédées d'injection IP de nicotine a différentes doses (0, 0.5 et 1 mg/Kg) a été faite par ANOVA mesures répétées.

Cette analyse montre une diminution significative du nombre de visites du trou actif, proportionnellement à l'augmentation de la dose de nicotine injectée [$F(2, 22)=6.66, p=0.005$]. Plus spécifiquement, la plus forte dose de 1 mg/Kg entraîne une diminution significative de la réponse (23.62 ± 5.04) par rapport à l'injection de saline (49.96 ± 12.83) ($p=0.001$) et de nicotine à 0.5 mg/Kg (38.92 ± 11.14) ($p=0.046$) (fig 1.2.11a).

Le nombre de distribution est équivalent pour les séances suivant les injections aux 3 doses [$F(2,22)=2.39, p=0.11$] (fig 1.2.11b).

Enfin, l'injection de nicotine a un effet dépresseur significatif sur l'activité ambulatoire des souris : effet dose [$F(2, 22)=5.53, p=0.011$]. La plus forte dose de 1 mg/Kg entraîne une diminution significative de l'activité locomotrice (170.63 ± 92.30) par rapport à l'injection de saline (301.71 ± 133.09) ($p=0.003$) et de nicotine à 0.5 mg/Kg (252.50 ± 123.63) ($p \leq 0.05$) (fig 1.2.11c).

Conclusions

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons évalué le comportement de consommation spontanée de nicotine chez des souris. Comme attendu, la nicotine est aversive et diminue la prise hydrique. Suite à des tests de préférence en la présence d'arômes, la vanille 1% a été choisie comme diluant de la nicotine à 60 $\mu\text{g/mL}$, permettant ainsi une meilleure consommation spontanée du mélange nicotine+arôme, avec une préférence équivalente avec la solution arôme seul.

Les arômes pouvant agir comme stimuli conditionnés contingents avec la nicotine (Wang et al., 2014), nous avons en deuxième partie, modélisé l'auto-administration orale de nicotine en présence d'arômes. Les résultats montrent que la nicotine +arôme permet une réponse opérante qui varie en fonction des conditions expérimentales : effort à fournir, en cas d'omission du signal lumineux, avec nicotine \pm vanille, en fonction de la dose de nicotine. Il est important de noter que les animaux qui ont acquis l'AAO en présence de nicotine, baissent leur réponse en cas de son omission. Ils détectent alors son absence, suggérant un travail spécifiquement dirigé pour la nicotine.

Le test de la rechute après extinction montre une réinstallation du comportement de recherche de drogue des 2 groupes à la présentation du signal visuel associé à la récompense mais non à la présentation d'une récompense gratuite seule. Ces données confirment l'importance des stimuli visuels dans ce modèle de réponse à la nicotine orale (Markou et al., 2018). Une réinstallation similaire à la présentation des stimuli préalablement associés à la nicotine est observée en IV (LeSage et al., 2004).

Dans l'ensemble de cette expérience, la difficulté réside dans le fait que les souris recevant la vanille seule se comportent dans les tests de la même façon que le groupe nicotine : elles s'auto-administrent et travaillent pour la vanille. Dans l'hypothèse que l'imprégnation en nicotine était trop faible et ne conduisait pas à des effets spécifiques centraux, nous avons examiné la motivation et la réinstallation du comportement de recherche de nicotine chez des animaux ré-entraînés avec des doses plus fortes (de 80 et 120 $\mu\text{g/mL}$). A notre surprise, les souris tolèrent ces concentrations en oral et s'engagent dans un conditionnement opérant dont le blocage par la mécamylamine (antagoniste des nAChRs) fut sans effet particulier chez les souris travaillant pour la nicotine malgré son efficacité dans d'autres études (Alsharari et al., 2014). De même, le prétraitement par la nicotine n'a pas augmenté les propriétés incitatives de la solution nicotine arôme vanille mais a eu un effet dépresseur sur la locomotion, répertorié dans d'autres études chez des souris naïves à la nicotine (Marks et al., 1989). Nous avons alors questionné la présence pharmacologique de la nicotine après prise orale vu l'absence de renforcement. De façon intéressante, notre modèle a produit des taux de cotinine sérique pharmacologiquement valides, similaire à ceux observés suite

à des injections périphériques de nicotine (Siu and Tyndale, 2007) et comparable à des taux obtenus précédemment en prise orale (Hauser et al., 2012b) mais inférieurs à une consommation sans choix sur une bouteille (100 µg/mL nicotine+2% saccharine ; 509.64 ± 36.45 ng/mL) (Mesa-Gresa et al., 2013).

Cette étude permet de souligner le rôle des saveurs dans le comportement consommatoire de nicotine mais ne permet pas d'obtenir des modifications du comportement de type addiction.

Chapitre 3

**Étude de l'effet des additifs aromatiques sur la
palatabilité de la nicotine et l'encodage neuronal
de sa valeur affective**

Introduction

La valeur hédonique (*liking*) est une composante centrale de la récompense, associée à la valeur motivationnelle (*wanting*). Chez les rongeurs, les études sur la nicotine ont souvent pour but d'enquêter sur les effets pharmacologiques centraux qui sous-tendent les propriétés incitatives de la nicotine, mais on sait peu de choses sur l'expérience sensorielle de la consommation de nicotine, y compris les influences gustatives et olfactives.

Pourtant, les signaux oraux représentent un déterminant important de l'ingestion et de la consommation des aliments (Grill, 1985 ; Scott, 1992), le goût étant le gardien du milieu interne (Garcia et al., 1974). Or la nicotine passe, pour toutes les formes du tabagisme, à travers la cavité buccale, le goût et le système sensoriel occupent un rôle crucial dans la décision de consommation des produits du tabac. L'expérience orale sensorielle de la cigarette a un impact considérable sur le comportement du tabagisme chez l'humain (Ahijevych and Garrett, 2010; Mangold et al., 2008), tout comme les additifs de type flaveur contribuant à l'utilisation et à la dépendance aux produits du tabac (Feirman et al., 2016). Des études montrent que ces saveurs sont attractives et qu'un nombre significatif de personnes qui consomment initialement des produits non aromatisés, passent à la consommation de produits aromatisés (Oliver et al., 2013). De même, les agents conférant une qualité sucrée peuvent augmenter le potentiel d'abus des produits alternatifs au tabac (Miao et al., 2016).

Il est donc nécessaire d'élucider les constituants sensoriels des solutions de nicotine chez les rongeurs pour une meilleure compréhension de la dépendance au tabac, incluant l'investigation des effets des arômes sur la réponse neuronale et le potentiel addictif de la nicotine.

Étude clinique de la palatabilité

Chez l'humain, les réactions faciales gustatives et olfactives sont enregistrées en vidéo et analysées à l'aide du système de codage à action faciale (FACS) (Rosenstein and Oster, 1988; Steiner et al., 2001; Weiland et al., 2010) ou électromyographie faciale (Armstrong et al., 2017; Vrana, 1993), chez les nouveau-nés, enfants et adultes. Des réactions aversives à la quinine et l'acide citrique incluent les *gapes*, *chin rubs*, *nose wrinkling*, *low mouth corners*, des réactions répulsives et de dégoût. Un goût palatable, tel celui du saccharose, induit un plaisir sensoriel et des réactions appétitives telle que les *smiles*, *face relaxation et lip lick* (Berridge, 2000). Ces réactivités sont souvent augmentées avec l'augmentation de la concentration du stimulus palatable présenté (Steiner, 1979; Weiland et al., 2010). Des études montrent aussi l'impact de l'expérience, surtout en jeune âge, sur les réactions affectives comportementales et l'installation de préférences de goût (Beauchamp and Moran, 1984; Forestell and Mennella, 2017; Liem and Mennella, 2002).

La perception de la palatabilité chez l'humain est influencée par des facteurs internes comme la satiété (Booth et al., 1982) et le renforcement préalable de la palatabilité du stimulus par son association à des goûts sucrés (Zellner et al., 1985). Ces mêmes facteurs influencent la réactivité orofaciale chez le rats : la satiété (Flynn and Grill, 1983), la balance sodique (Berridge et al., 1984) et l'aversion gustative conditionnée (Berridge et al., 1981).

Étude préclinique de la palatabilité

Des mesures objectives des réponses hédoniques aux stimuli gustatifs ont été mises également analysés chez l'animal. Ainsi, le test de réactivité gustative est une méthode employée depuis plus d'une 50aine d'années afin de décortiquer les réponses et les mécanismes impliqués dans les réactions aux stimuli oraux. En effet, l'évaluation se faisait par la mesure du nombre de *licks* après infusion orale des différentes solutions (eau, saccharine, quinine,...) et l'altération de ces comportements par les lésions du septum, de l'amygdale ou de la transmission nerveuse (ex : chorda tympani) (Kemble et al., 1972; Wilcove, 1973). De même, l'effet de la restriction alimentaire et de la faim sur cette réactivité a été pris en compte (Booth, 1972).

Les premiers tests de réactivité gustative, tels qu'on les connaît aujourd'hui, ont été décrit à la fin des années 70 par Grill et Norgren, (Grill and Norgren, 1978) puis affinés par Berridge et Grill (Berridge and Grill, 1983) pour étudier les mimiques orofaciales en réponse à des injections intra-orales chez les rats. Cette technique permet de mesurer objectivement la palatabilité à travers des réponses stéréotypées (Berridge, 2000; Flynn and Grill, 1988; Grill and Norgren, 1978).

La réactivité gustative permet l'étude des goûts avant la possibilité d'effets post-ingestifs puisque les réponses neuronales dans le cortex piriforme postérieur mesurées par électrophysiologie chez le rat, se produisent quelques secondes après l'injection de solutions en intraoral ou le dépôt des substances sur la langue (Maier et al., 2012). Dans ces tests, un stimulus palatable, tel qu'une solution de saccharose, a révélé des réponses de type ingestives alors qu'une solution non palatable de quinine a déclenché des réponses de rejet actif. Ces dernières réponses reflètent un comportement de rejet du goût de la cavité orale (Berridge and Grill, 1983; Grill and Norgren, 1978).

Ces tests ne reflètent pas uniquement une expérience gustative mais aussi une communication de la valeur affective des stimuli (Berridge, 2000, 2019). Ce langage est important dans les comportements d'approche et d'évitement aidant à la survie par l'acceptation de signaux appétitifs et rejet des stimuli toxiques. L'étude de la réactivité gustative constitue alors une mesure objective de la perception émotionnelle des drogues et des aliments, et permet d'analyser les mécanismes qui sous-tendent le comportement.

Réactivité gustative et nicotine

La perception des saveurs ou des associations de « goûts » dans les produits du tabac peuvent être investiguées chez l'humain par des questionnaires (questionnaire d'évaluation de la cigarette modifié (Rose et al., 1999) évaluant la satisfaction du consommateur et l'impact de plusieurs facteurs comme le plaisir lié au goût, la récompense, l'aversion, les sensations au niveau de la gorge, la réduction du « craving » (St Helen et al., 2017). Chez l'animal, nous ne pouvons pas utiliser ce type de méthodes d'évaluation de la satisfaction ou de la description subjective de l'expérience sensorielle des produits du tabac. Nous nous tournons alors vers des moyens objectifs mesurables, standardisés, permettant le recueil d'une image claire du renforcement et de l'expérience hédonique de l'animal. Ainsi, par exemple, dès 1989, Flynn et al démontrent que la prise orale chronique volontaire de nicotine (pendant 16 jours) augmente sa palatabilité (0-5 µg/mL) et la préférence des solutions qui la contiennent chez les rats (Flynn et al., 1989). Dans ces tests de réactivité orofaciale, la nicotine est souvent considérée comme stimulus amer et elle est mise dans la même catégorie que la quinine (Brining et al., 1991). Malgré son profil aversif, cette substance est une des drogues les plus consommées. Dans les produits du tabac et surtout les e-cig depuis maintenant une quinzaine d'années, la nicotine est associée à des stimuli du goût permettant sa consommation. De même, une modification subjectivement choisie de l'expérience sensorielle orale et de l'irritation ressentie au niveau des voies respiratoires supérieures repose sur les taux de chacun des PG/VG dans e-liquides, les concentrations de nicotine et le choix des saveurs ou associations de saveurs. La nicotine, d'une part, produit les sensations au niveau de la gorge et d'autre part, les saveurs (surtout celles sucrées) donnent de l'attractivité à ces produits (Goldenson et al., 2016a). Malgré la réglementation de l'utilisation des arômes « caractérisants » dans les cigarettes conventionnelles, on remarque l'absence de réglementation pour les nouveaux produits de vapotage. Ceci permet l'exposition à des produits non testés pour leur potentiel de renforcement quand associés à la nicotine.

Suite à ces mélanges, l'expérience sensorielle du tabac est plus plaisante. Nous suggérons qu'elle déclenche un état émotionnel plus positif et qu'elle est différemment codée au niveau du système sensoriel. Cette modification augmenterait l'attractivité des produits, encourageant ainsi le renouvellement de l'expérience sensorielle à valence positive augmentée.

Après une revue exhaustive de la littérature, nous nous posons pour la première fois la question de l'effet des additifs aromatiques sur la palatabilité de la nicotine orale par les tests de réactivité gustative où les deux stimuli sont simultanément associés. Nos expériences fourniront alors une valeur ajoutée dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la consommation des produits du tabac, notamment les nouveaux produits de vapotage.

Dans l'hypothèse où la voie orogustative joue un rôle majeur dans la dépendance à la cigarette, il est alors nécessaire de modéliser la palatabilité suivant l'injection intraorale de nicotine pour accéder ensuite aux mécanismes neurobiologiques.

D'où nos objectifs qui sont:

- d'étudier l'effet d'un additif de type arôme sur la palatabilité de la nicotine chez la souris
- d'étudier la réactivité neuronale des circuits neuronaux impliqués lors d'une prise orale et ponctuelle de nicotine couplée à un arôme

Notre hypothèse est que les additifs améliorent la perception orale de la nicotine en diminuant les effets aversifs de cette drogue, et qu'ils modifient l'intégration neuronale de la nicotine dans différentes régions du cerveau impliquées dans le traitement affectif des stimuli.

Dans la première partie de ce chapitre, nous étudierons la palatabilité de solutions de référence et de solutions de nicotine couplée ou non à un additif aromatique ou palatable. Nous comparerons la palatabilité d'une administration intraorale de solution de nicotine avec ou sans arôme de vanille grâce à un test de réactivité hédonique chez la souris.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude de la palatabilité et de l'encodage neuronal de la valeur affective des solutions de nicotine avec ou sans arôme. Ces effets centraux seront mesurés par le marquage immunohistochimique de la protéine c-Fos dans plusieurs régions cérébrales.

Partie 1

Modification de la perception de la nicotine orale par l'ajout de facteurs d'odeur et de goût : Mise au point d'un test de la palatabilité chez la souris par étude de la réactivité orofaciale.

Matériels et Méthodes

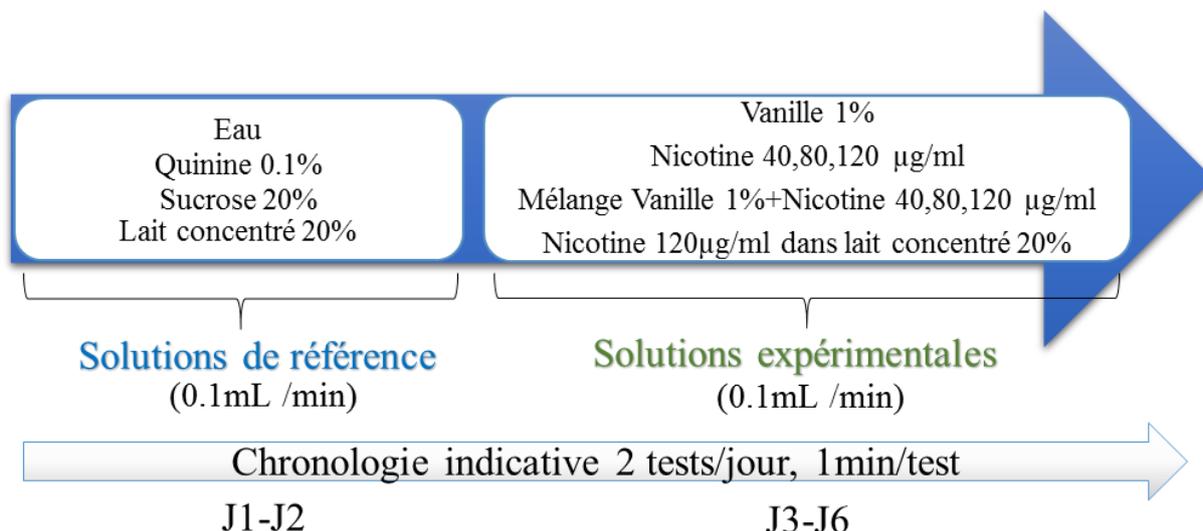


Fig3.a : Protocole expérimental : Etude de la réactivité orofaciale suivant l'injection intrabuccale des solutions de référence neutre (eau), positive (lait concentré et sucrose) et négative (quinine) puis des solutions expérimentales débutant par la vanille 1% et enchainant sur des solutions à doses croissantes de nicotine (40, 80,120 µg/mL) seule ou aromatisée.

Dans cette expérience, toutes les souris, (n=21) suivent tous tests dans le même ordre. L'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum* durant toute la période de l'expérience.

Dans le but de valider la mesure de la réactivité orofaciale dans nos conditions expérimentales, nous avons examiné la réactivité à plusieurs solutions standards (voir design expérimental fig3.a) :

i) les solutions de référence pour les réponses affectives plutôt hédoniques, c'est-à-dire plaisantes : Sucrose 20% ou lait concentré sucré 20% ; ii) la quinine 0,1% comme solution de référence aversive, c'est-à-dire déplaisante et enfin, iii) l'eau pour déterminer la réponse à une solution neutre.

Ensuite, la réactivité orofaciale déclenchée par la solution de vanille 1% puis de nicotine à concentrations croissantes (40, 80 et 120 µg/mL) a été évaluée (n=21). Enfin, l'association de la plus forte concentration de nicotine dans notre expérience (120 µg/mL avec le lait concentré sucré 20% (hautement palatable) a été testée (n=10).

Analyses statistiques

Les scores de réactivité hédonique et de réactivité aversive sont comparés entre eux par une ANOVA mesures répétées avec un facteur réactions à deux niveaux: hédoniques et aversives et un facteur test.

Les analyses des réactions hédoniques d'une part et des réactions aversives de l'autre sont faites par des ANOVA mesures répétées avec deux facteurs dépendants : un facteur vanille à deux niveaux (absence pour les solutions de nicotine et présence pour les solutions de nicotine+vanille) et un facteur concentrations à 4 niveaux (0, 40, 80 et 120 µg/mL de nicotine).

Au cas où une interaction entre les facteurs existe une analyse post hoc par le test LSD est faite. Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0.05$ pour tous les tests.

Partie 2

Effet de l'additif aromatique sur la palatabilité et le codage neuronal de la valeur affective de la nicotine orale chez la souris

Matériels et Méthodes

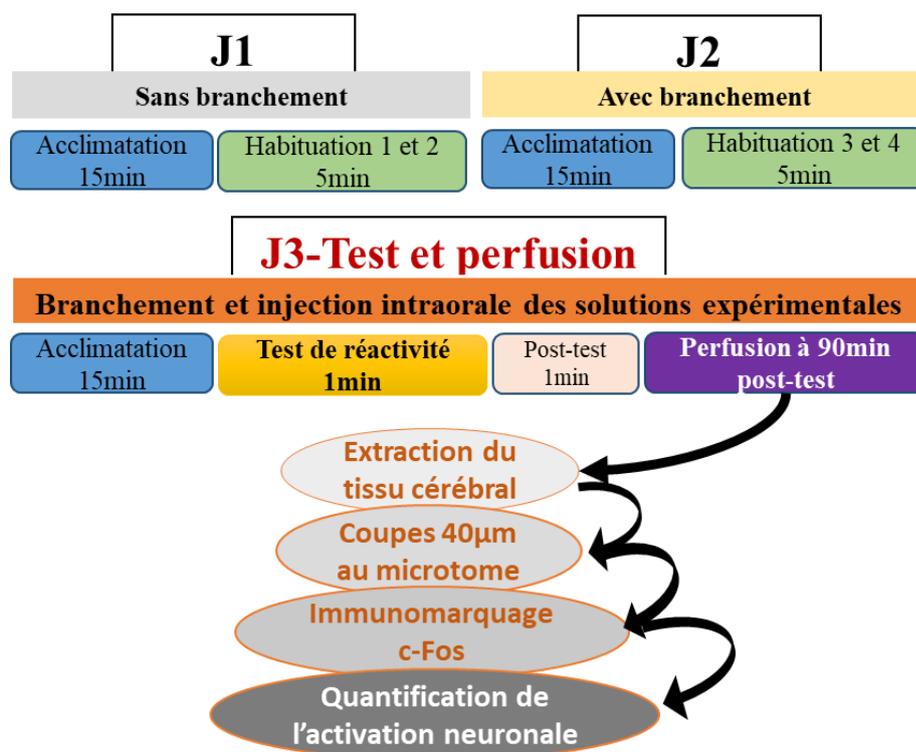


Fig 3.b : Protocole expérimental : Etude de la réactivité orofaciale et du codage neuronal suivant l'injection intrabuccale (1min/test) de solutions chez 37 souris. 4 habituations au dispositif expérimental sont faites sur 2 jours (2/jour) avant les tests. Les animaux sont ensuite divisés en 4 groupes et chaque souris passe un seul test: eau (n=9), vanille 1% (n=8), nicotine 120 µg/mL (n=10) et nicotine 120 µg/mL+vanille 1% (n=10). L'extraction du tissu cérébral est effectuée 90min après le test comportemental. Des coupes de 40µm sont faites pour permettre l'immunomarquage c-Fos et la quantification de l'activité neuronale.

Dans cette expérience, la palatabilité et le codage neuronal de la valeur affective des solutions sont étudiés chez 37 souris. Ces animaux sont répartis en quatre groupes (un test=une solution/souris): eau (n=9), vanille 1% (n=8), nicotine 120 µg/mL (n=10) et nicotine 120 µg/mL +vanille 1% (n=10). L'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum* durant toute la période de l'expérience.

Les tests sont précédés de 2 jours d'acclimatation à la salle (15 min) et d'habituation (5 min) au dispositif expérimental (cylindre) (voir design expérimental fig3.b). Durant le deuxième jour, les souris sont branchées à un cathéter vide afin de mimer les conditions du test.

Le jour du test, une acclimatation de 15min précède le transfert de l'animal dans le cylindre et l'injection intraorale de la solution (1 min à un débit de 0.1 mL/min). L'animal est gardé 1min post-infusion dans le cylindre, puis transféré en salle d'acclimatation. 90minutes après le test de réactivité orofaciale, temps nécessaire à l'expression de la protéine c-Fos, les animaux sont anesthésiés et perfusés afin d'extraire le cerveau. Les cerveaux sont ensuite réduits en coupes de 40 µm à l'aide d'un microtome. L'activité neuronale dans plusieurs régions cérébrales impliquées dans le codage de la valeur affective est évaluée après immunomarquage de la protéine c-Fos. La quantification est faite à l'aide d'outils de visualisation des coupes et de comptage semi-automatique au sein des régions pré délimitées.

Analyses statistiques

Les analyses des réactions hédoniques d'une part et des réactions aversives de l'autre sont faites par ANOVA factorielle : un facteur vanille à deux niveaux et un facteur nicotine à 2 niveaux. De même pour l'analyse de l'activité neuronale dans les régions du cortex gustatif, habenula, BLA et PVT.

L'analyse du marquage dans le Nac est faite par ANOVA mesures répétées comportant deux facteurs indépendants (facteur vanille et facteur nicotine) et un facteur dépendant (antéro-postériorité, II.1 ou core/shell II.2).

Au cas où une interaction entre les facteurs existe une analyse post hoc par le test LSD est faite.

Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0.05$ pour tous les tests.

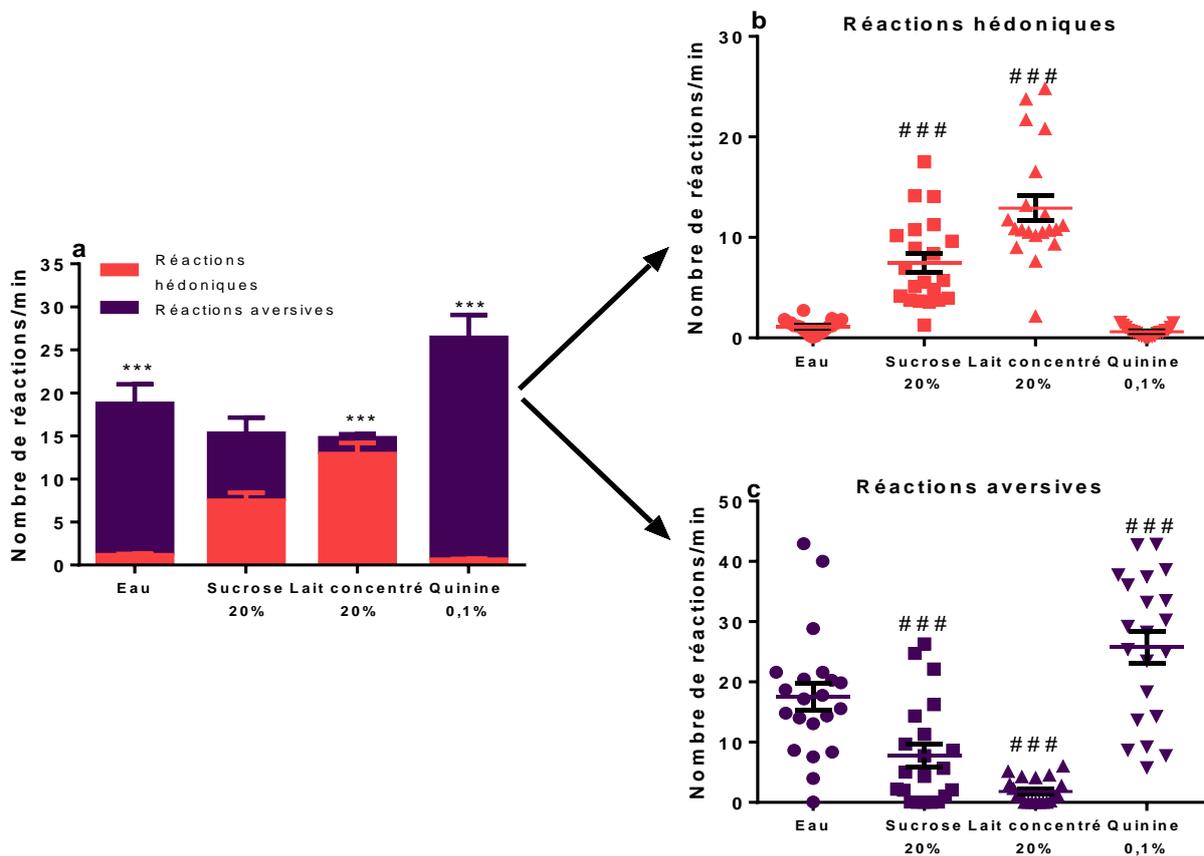


Fig 3.1: Réactivité orofaciale suivant l'injection intraorale de solutions de référence : (a) Moyenne du nombre de réactions hédoniques et aversives pour les 4 solutions de référence, (b) Valeurs individuelles du nombre de réactions hédoniques et (c) aversives provoquées par les solutions de référence. Eau, sucrose 20%, quinine 0.1% et lait concentré 20% (n=20-21). Analyse post hoc LSD (a) *** $p < 0.001$, différence entre les réactions hédoniques et aversives pour la même solution, (b,c) ### $p < 0.001$ différence significative par rapport à l'eau. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

Résultats expérimentaux

Partie 1

Modification de la palatabilité de la nicotine orale par l'ajout d'un additif aromatique : étude de la réactivité orofaciale chez la souris.

I. Validation du modèle pour la mesure de la palatabilité chez la souris : Étude de la palatabilité des solutions de référence

L'injection intrabuccale des solutions dites « de référence » provoque deux types de réactions prédéfinies : hédoniques et aversives pour toutes les solutions avec des prédominances dépendantes du type de solution (plaisantes/déplaisantes). Les scores de réactivité aversive ou hédonique ont été comparés par ANOVA mesures répétées.

Les solutions de référence produisent des réactivités orofaciales différentes dépendantes de la qualité de la solution injectée, effet principal significatif du test [F(3,57)=10.86, p<0.001] (fig 3.1a). De plus, il existe un écart significatif entre les scores des réactions hédoniques et ceux des réactions aversives, [effet réaction F(1,19)=39.82, p<0.001] et une interaction réactions x test significative [F(3,57)=54.67, p<0.001]. L'analyse post hoc LSD montre que toutes les solutions ont des réactions à dominance plutôt hédonique ou plutôt aversive sauf le sucre 20% qui déclenche une réactivité mixte, équitablement divisée entre positives et négatives.

D'une part, l'ANOVA mesures répétées sur les réactions hédoniques montre un effet principal test [F(3,57)=55.59, p<0.001] (fig 3.1b). L'analyse post-hoc montre que les solutions de lait concentré et sucre sont significativement différentes de l'eau. Les solutions palatables produisent plus de réactions positives/ingestives (réactions/min) que l'eau et la quinine 0.1%: sucre 20% (7.48±0.93) et lait concentré sucré 20% (12.92±1.28) contre eau (1.14±0.14) et quinine (0.62±0.10), (post hoc LSD, p<0.001). Dans nos conditions, le lait concentré sucré 20% est une solution hautement palatable, à valeur hédonique supérieure au sucre 20% (post hoc LSD, p<0.001). En revanche, l'eau et la quinine 0.1% ont des scores de réactions ingestives minimales et équivalents. Un effet plancher empêche certainement la différence entre ces deux solutions (1.14±0.14 pour l'eau vs. 0.62±0.10 réactions/min pour la quinine, p=0.65).

D'autre part, l'ANOVA mesures répétées sur les réactions aversives montre que toutes les solutions ont des propriétés aversives différentes [effet principal test F(3,57)=34.95, p<0.001] (fig 3.1c). De plus, la quinine est la solution la plus aversive (post hoc LSD, quinine, 25.79±2.63 vs. eau, 17.60±2.26, p≤0.001).

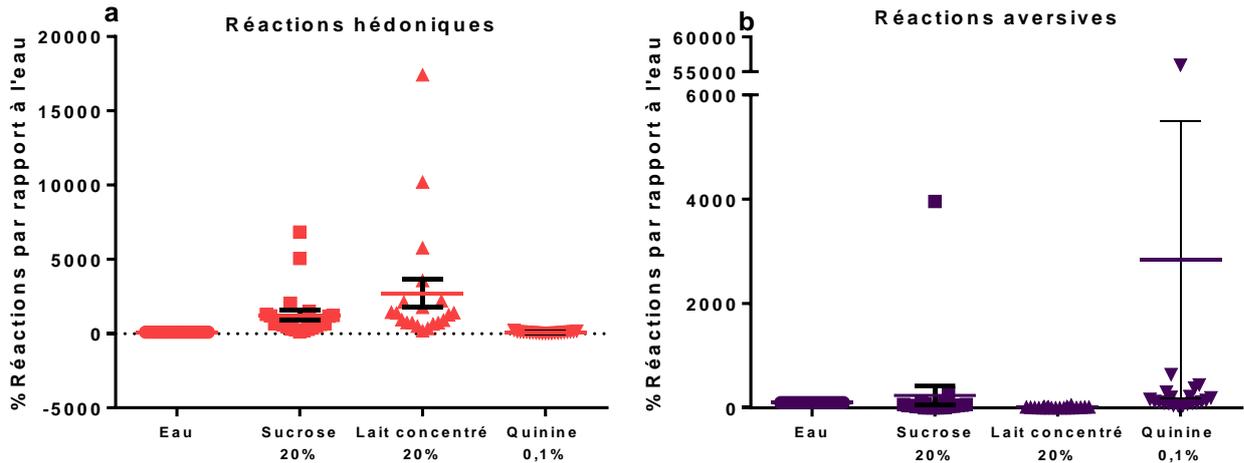


Fig 3.2 : Réactivité orofaciale suivant l'injection intrabuccale de solutions de références, expression des réactions en pourcentages de réactions à l'eau : (a) Valeurs individuelles du nombre de réactions hédoniques et (b) aversives pour les 4 solutions de référence ; Eau, sucrose et quinine (n=21), lait concentré (n=20). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

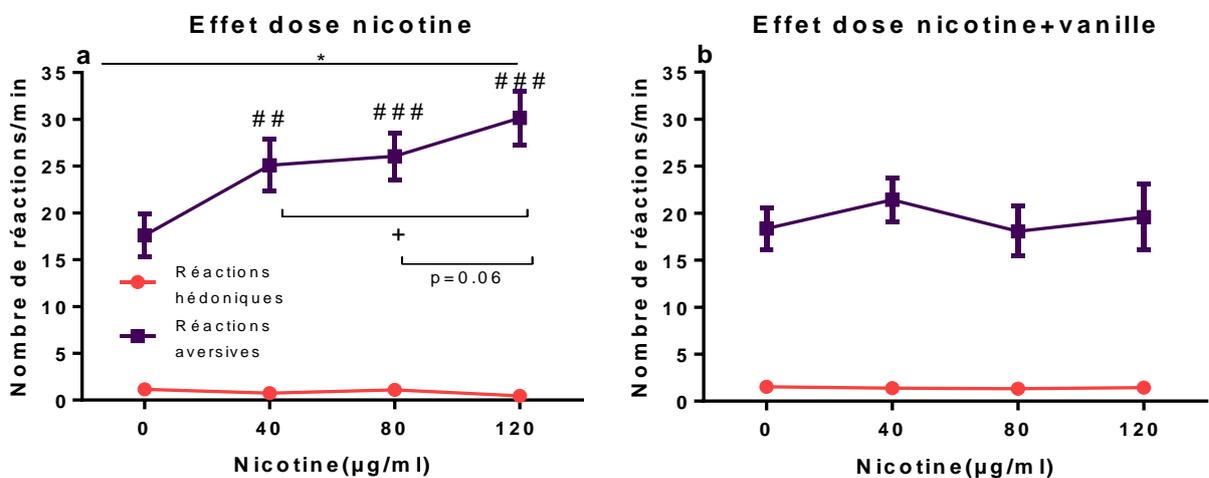


Fig 3.3: Courbe de dose réponse du nombre de réactions par minute suivant l'injection intrabuccale de solutions à différentes concentrations de nicotine (a) et de nicotine+vanille 1% (b) ; (n=21). ** $p < 0.01$, effet principal concentration ### $p < 0.001$ analyse post hoc LSD, différence par rapport à l'eau et + $p < 0.05$ différence par rapport à une autre concentration de nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

Le sucrose 20% produit un score moyen de réactions aversives plus important que celui des réactions aversives au lait concentré sucré 20% (post hoc LSD, 7.79 ± 1.85 vs. 1.83 ± 0.45 réactions/min, $p=0.03$) et inférieur aux réactions à l'eau (post hoc LSD, 7.79 ± 1.85 vs. 17.60 ± 2.26 réactions/min, $p<0.001$).

Pour indication, nous avons également exprimé les réactions orofaciales de chaque solution en pourcentage de réactions par rapport à l'eau, solution neutre considérée comme ligne de base (fig 3.2). Ce type de représentation ne reflète pas suffisamment la qualité de la réaction et ne sera pas adopté par la suite.

II. Étude de l'effet de l'arôme vanille 1% sur la palatabilité de la nicotine

Dans cette expérience, nous avons effectué des tests répétés de palatabilité de la nicotine seule ou associée à l'arôme vanille 1% chez les mêmes souris. Les scores d'aversion et de réactivité hédonique ont donc été comparés entre eux par une ANOVA mesures répétées.

L'injection intrabuccale de solutions de nicotine à doses croissantes (0, 40, 80 et 120 $\mu\text{g/mL}$) augmente les scores de réactions aversives de façon dose-dépendante sans qu'il y ait d'altération des scores de réactions hédoniques pour tous les tests [effet principal réaction $F(1,20)=156.70$, $p<0.001$, effet concentration $F(3,60)=5.97$, $p=0.001$ et interaction réactions x concentrations $F(3,60)=6.39$, $p<0.001$], (fig 3.3a).

Les réactions hédoniques sont faibles en nombre et équivalentes pour les différentes concentrations de nicotine (nicotine 0 (1.14 ± 0.14) \equiv 40 (0.73 ± 0.12) \equiv 80 (1.10 ± 0.28) \equiv 120 (0.45 ± 0.1 réactions/min), $p>0.05$, n.s.

L'injection intrabuccale d'une solution de nicotine augmente significativement et de façon dose-dépendante le score de réactions aversives : nicotine 0 : 17.60 ± 2.26 différente de 40 (25.11 ± 2.81), 80 (26.05 ± 2.52) et 120 $\mu\text{g/mL}$ (30.15 ± 2.88 réactions/min) (post hoc LSD, $p<0.05$).

Pour la réactivité orofaciale suivant l'injection de solutions de nicotine à différentes concentrations associées à la vanille 1%, les résultats montrent un effet principal réaction [$F(1,20)=63.98$, $p<0.001$], sans effet concentration [$F(3,60)=0.69$, $p=0.56$] ni interaction réactions x test [$F(3,60)=0.55$, $p=0.65$] (fig 3.3b).

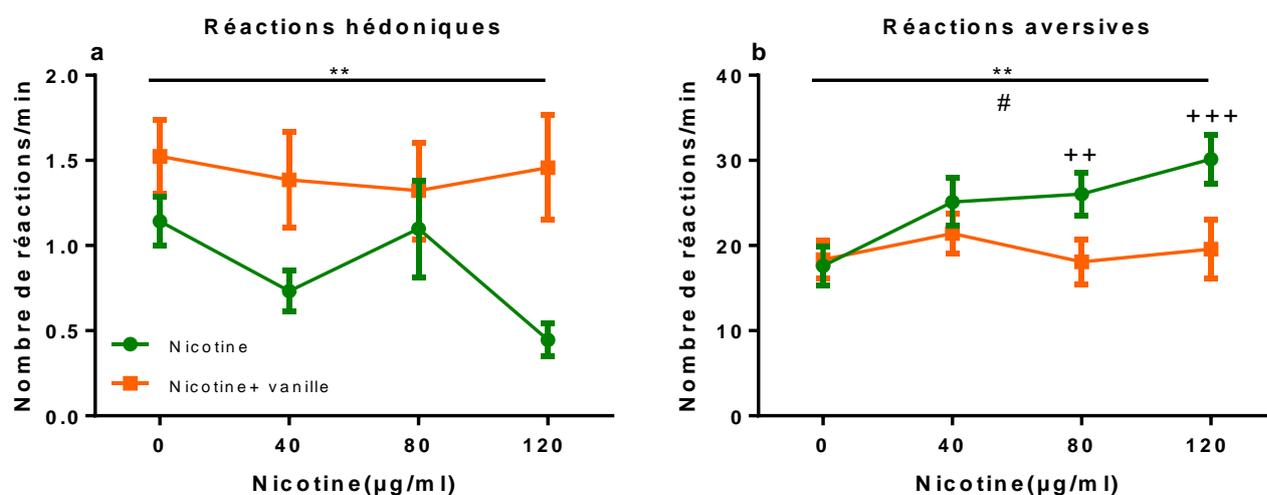


Fig 3.4 : Courbe de dose réponse du nombre de réactions hédoniques (a) et aversives (b) par minute suivant l'injection intrabuccale de solutions à différentes concentrations de nicotine et de nicotine+vanille 1%; (n=21). **p<0.01, effet principal vanille, # p<0.05 effet principal concentration, ++p<0.01 et +++p<0.001 analyse post hoc LSD, différence entre les solutions de nicotine et les solutions de nicotine arôme vanille à la même concentration. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

Lors de l'analyse spécifique des réactions hédoniques, les résultats montrent que l'ajout de la vanille à la solution de nicotine augmente significativement le nombre de réactions hédoniques [effet vanille, $F(1,20)=11.84$, $p=0.002$] (fig 3.4a). En revanche, il n'y a pas d'effet principal nicotine [effet concentration, $F(3,60)=1.40$, $p=0.25$, n.s.]. Enfin, on observe une tendance vers la significativité pour l'interaction vanille x concentrations [$F(3,60)=2.53$, $p=0.065$].

La vanille diminue significativement le nombre de réactions aversives pour toutes les doses de nicotine [effet principal vanille, $F(1,20)=8.38$, $p=0.009$] (fig 3.4b). L'augmentation de la concentration de nicotine augmente le nombre de réactions aversives pour les 2 solutions (avec ou sans vanille) [$F(3,60)=3.63$, $p=0.018$]. Enfin, l'ANOVA répétée montre une interaction vanille x concentrations significative [$F(3,60)=3.62$, $p=0.018$] (fig 3.4b).

L'analyse post hoc montre plusieurs résultats importants :

i) une fois encore, l'eau (Nic 0) et la vanille 1% sont équivalentes en nombre de réactions aversives (eau, 17.60 ± 2.26 vs. vanille, 18.36 ± 2.26 réactions/min, $p=0.77$) ; ii) l'ajout de la nicotine à doses croissantes augmente le nombre de réactions aversives ($p < 0.01$) ; iii) l'ajout de vanille à la nicotine bloque l'augmentation dose-dépendante des réactions aversives (tous les points nicotine+vanille équivalents, $p > 0.05$, n.s). De façon importante, la vanille 1% diminue significativement les réactions aversives pour les solutions de nicotine : nicotine 80 μ g, 26.05 ± 2.52 vs. nicotine arôme vanille 18.74 ± 2.65 et nicotine 120 μ g, 30.15 ± 2.88 vs. nicotine arôme vanille 19.58 ± 3.46 réactions/min (quelle que soit la concentration, post hoc $p < 0.01$).

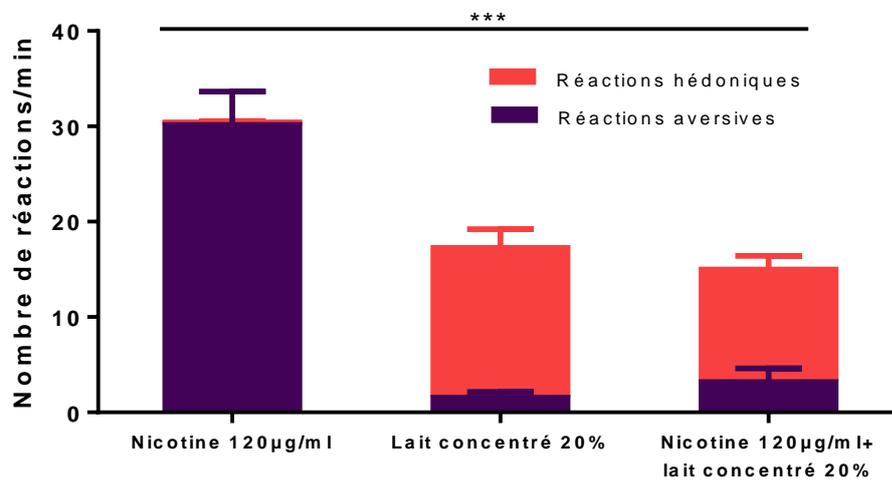


Fig 3.5: Amélioration de la palatabilité de la nicotine par une solution hautement palatable : Représentation du nombre de réactions hédoniques et aversives par minute, suivant l'injection intrabuccale chez les mêmes souris (n=10), de solutions de nicotine à 120 µg/mL, lait concentré sucré 20% et nicotine 120 µg/mL+lait concentré sucré 20%. ***p<0.001, effet principal test ; Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

III. Étude de l'effet de l'association de la nicotine à une solution hautement palatable, le lait concentré sucré

L'analyse statistique de la palatabilité est faite par ANOVA mesures répétées sur 3 tests : nicotine 120 µg/mL dans l'eau, lait concentré sucré 20% et nicotine 120 µg/mL+ lait concentré 20%(n=10).

Les tests déclenchent des réactions orofaciales significativement différentes : effet principal du test [F(2,18)=15.98, p<0.001], effet réactions [F(1,9)=1.41, p=0.27]. On observe une interaction réactions x test significative [F(2,18)=88.63, p<0.001] (fig 3.5).

En effet, l'analyse post hoc par le test LSD montre, d'un côté, que la nicotine à 120 µg/mL est plus aversive que les deux autres solutions de lait concentré et nicotine+ lait concentré. Elle produit significativement moins de réactions hédoniques (p<0.001) et plus de réactions aversives (p<0.001).

D'un autre côté, le lait concentré 20% augmente significativement la palatabilité de la nicotine 120 µg/mL par diminution de son aversion et augmentation de son ingestion. La palatabilité du lait concentré reste par contre intacte après l'ajout de la nicotine. Ainsi, les deux solutions de lait concentré et de lait concentré+ nicotine déclenchent respectivement un nombre significativement équivalent de réactions hédoniques (15.69±1.97 vs. 11.81±1.45 réactions/min, p=0.14) et aversives (1.55± 0.59 vs. 3.18±1.43 réactions/min, p=0.53).

Cette expérience montre un masquage puissant et complet du goût de la nicotine par le lait concentré qui « inverse » la balance des réactions hédoniques et aversives de la nicotine.

IV. Analyse qualitative des réactions orofaciales aux différentes solutions

L'analyse qualitative des réactions, c'est-à-dire de chaque item constituant de la réponse hédonique ou de la réponse aversive, est faite par ANOVA mesures répétées sur les solutions de référence en premier lieu puis sur les solutions expérimentales.

1. Solutions de référence

L'analyse des événements pour les solutions de référence, montre un effet principal significatif du test sur toutes les réactivités (fig 3.6).

Ainsi, les réactions hédoniques sont majoritairement présentes pour l'injection de sucrose et lait concentré. De plus, ces 2 solutions montrent une composition équivalente de toutes les réactions, mis à part les *tongue protrusions*, dont la fréquence est supérieure suivant l'administration de lait concentré (lait concentré 6.44±8.26 vs. sucrose 1.29±2.47 réactions/min, p<0.001) et les *head shakes* plus nombreux après le sucrose (lait concentré 0.25±0.44 vs. sucrose 1.24±1.97 réactions/min, p=0.03).

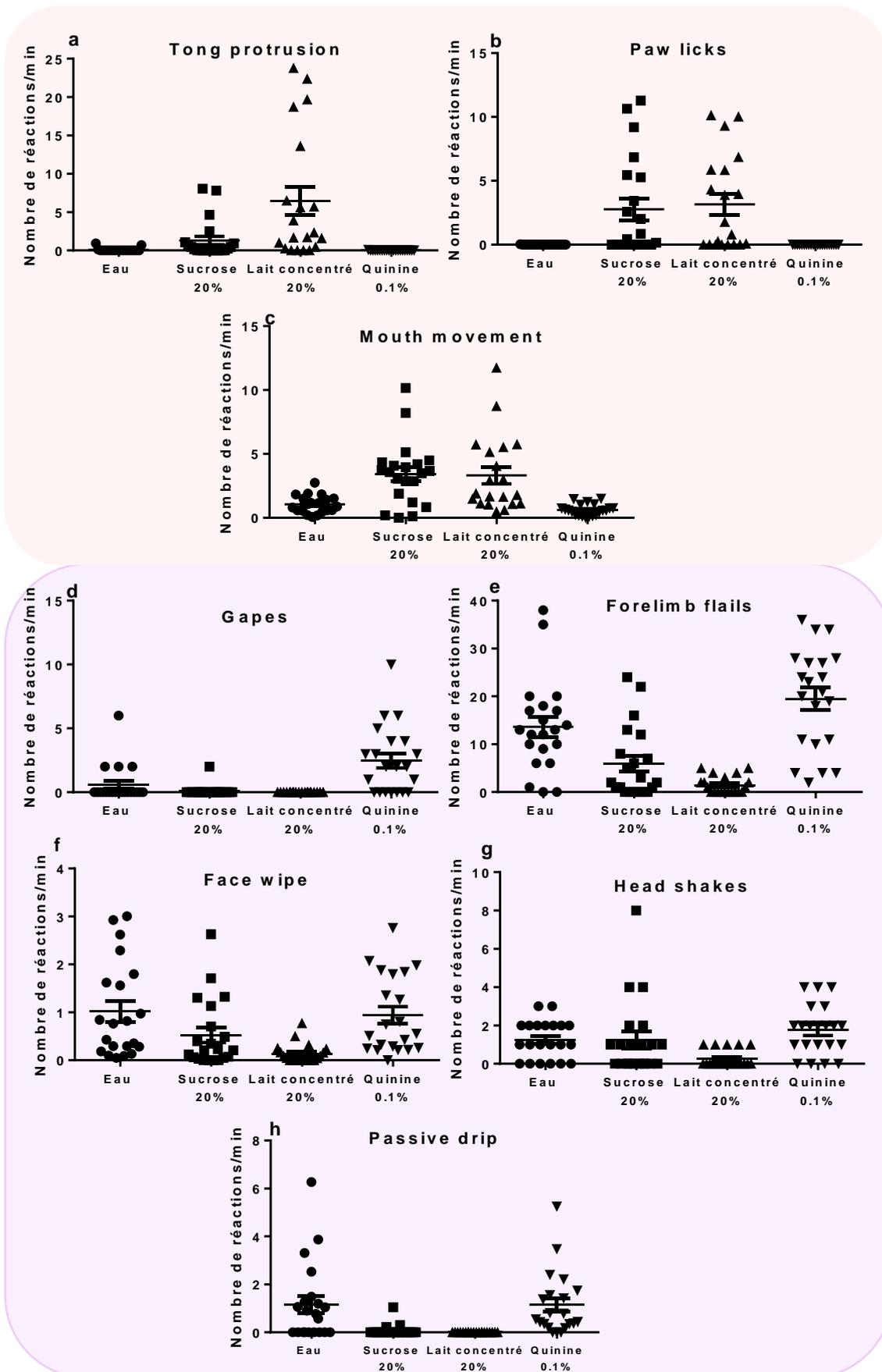


Fig 3.6 : Réactivités orofaciales par évènement suivant l'injection des solutions de référence ; nombre de réactions par minute des réactions hédoniques : (a) protrusions de la langue, (b) léchage des pattes avant, (c) mouvements de la bouche, et réactions aversives (d) gapes, (e) forelimb flails, (f) face wipe, (g) secouement de la tête et (h) écoulement passif de liquide; n=20-21. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

De même, l'augmentation des réactions aversives après la quinine dépend essentiellement du nombre significativement plus élevé des *gapes* ($p < 0.001$) et *forelimb flails* ($p < 0.05$) lorsque comparé à l'eau. Les deux solutions sont équivalentes pour toutes les autres variables comportementales ($p > 0.05$, n.s).

Le lait concentré et la quinine ont des profils de réactivité orofaciale opposés, étant significativement différents pour toutes les variables : le lait concentré ayant des scores plus élevés pour les réactions positives et la quinine pour les réactions négatives.

2. Solutions expérimentales

L'analyse des événements pour les solutions expérimentales, montre un effet principal significatif du test sur toutes les réactivités ($p < 0.05$) sauf pour le *face wipe* ($p > 0.05$, n.s) (fig 3.7).

Ainsi, l'injection de nicotine+lait concentré montre les plus hauts scores de *tongue protrusions* et de *paw licks* ($p < 0.001$), réactions ingestives actives, par rapport à toutes les autres solutions de nicotine arôme vanille ou de vanille qui sont équivalentes entre elles. Cette même solution déclenche le plus faible score de *forelimb flails*, indicateur de rejet actif, comparée à toutes les autres solutions. L'analyse montre que la nicotine à plus forte dose (120 $\mu\text{g/ml}$) provoque le nombre de *gapes* le plus élevé par rapport à toutes les autres solutions expérimentales. Enfin, la diminution des réactions aversives aux solutions de nicotine seule par rapport aux solutions de nicotine arôme vanille est due à une augmentation des mouvements de la bouche et à une diminution du nombre de *gapes* et de *forelimb flails*. Cette analyse qualitative montre qu'une différence de palatabilité globale entre les solutions provient de changements multiples au niveau des variables de la réponse orofaciale.

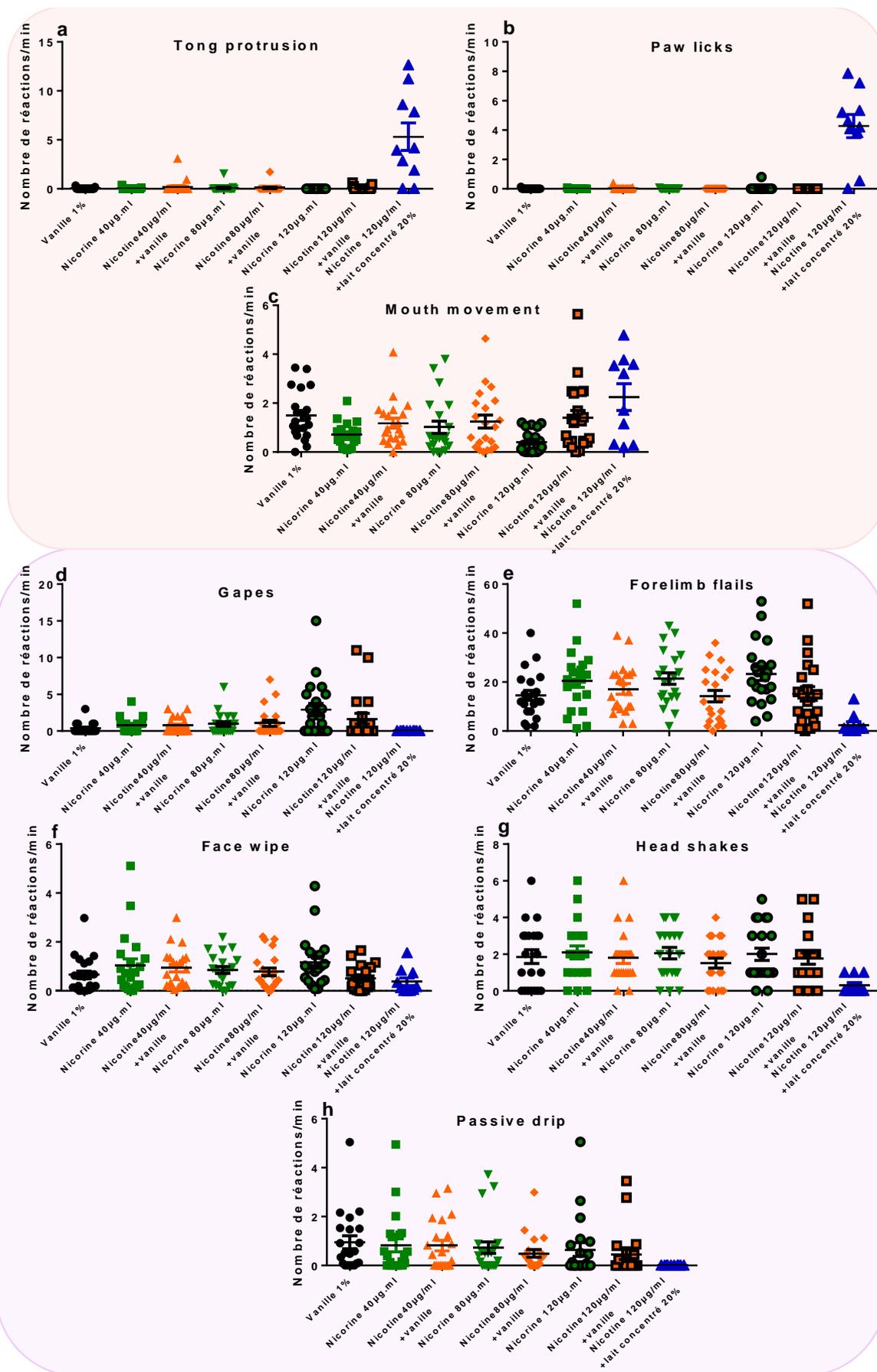


Fig 3.7 : Réactivités orofaciales par évènement suivant l'injection des solutions expérimentales; nombre de réactions par minute des réactions hédoniques : (a) *tongue protrusions*, (b) *paw licks*, (c) *mouth movements*, et réactions aversives (d) *gapes*, (e) *forelimb flails*, (f) *face wipe*, (g) *head shakes* et (h) *passive drips*; n=21 sauf nicotine dans lait concentré n=10. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

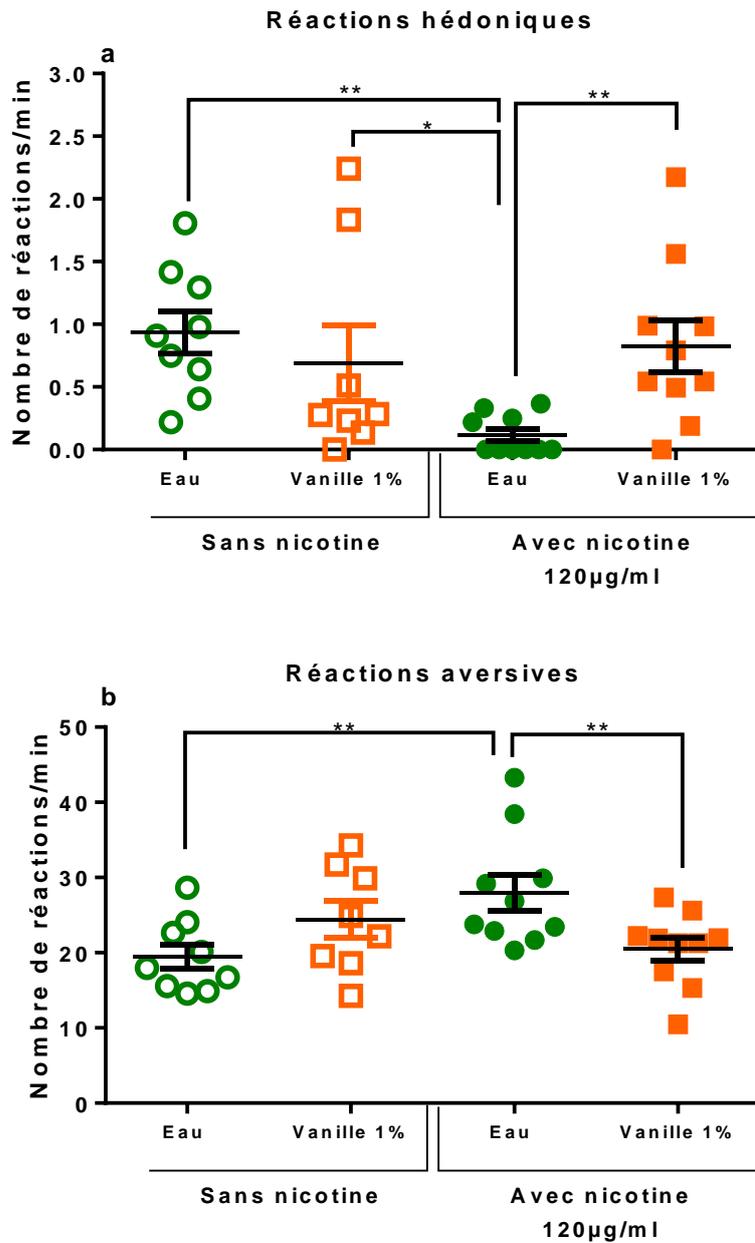


Fig 3.8 : Réactivité orofaciale à l'injection intrabuccale de nicotine et l'effet de l'ajout d'un additif aromatique ; (a) Valeurs individuelles des nombre de réactions hédoniques et (b) aversives déclenchées par les solutions test. Eau (n=9), vanille 1% (n=8), nicotine 120 µg/mL (n=10) et nicotine 120 µg/mL+vanille1% (n=10). *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001, analyse post hoc LSD. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM.

Partie 2

Effet de l'additif aromatique sur le codage neuronal de la valeur affective de la nicotine orale chez la souris

I. Étude comportementale de la palatabilité

1. Étude quantitative :

Tant les réactions hédoniques d'une part que les réactions aversives de l'autre sont analysées par ANOVA factorielle.

L'analyse des réactions hédoniques montre que le nombre de ces réactions diffère en fonction des solutions injectées (interaction nicotine x vanille significative [F(1,33)=6.23, p=0.018]; effet nicotine [F(1,33)=3.17, p=0.08], effet vanille n.s) (fig 3.8a). Comme attendu, l'ajout de la vanille augmente significativement le nombre de réactions positives (*post-hoc* LSD, p=0.01, nicotine arôme vanille 0.83±0.20 vs. nicotine 0.12±0.05 réactions/min), augmentant ainsi la palatabilité de la nicotine et la rendant équivalente aux solutions contrôles d'eau (0.94±0.17) et de vanille (0.69±0.30).

L'analyse des réactions aversives montre une différence du nombre de ces réactions en fonction des solutions (interaction nicotine x vanille significative [F(1,33)=9.27, p=0.005 ; effet nicotine [F(1,33)=1.25, p=0.27] ou vanille [F(1,33)=0.38, p=0.54] (fig 3.8b). L'analyse *post-hoc* LSD montre une augmentation significative du nombre de réactions négatives déclenché par la solution de nicotine (27.97±2.39) comparé à l'eau (19.47±1.61), p=0.005. En revanche, l'ajout de vanille à la solution de nicotine (20.49±1.55 réactions/min) diminue significativement le score de réactions aversives (*post-hoc* vs. nicotine seule, p=0.01).

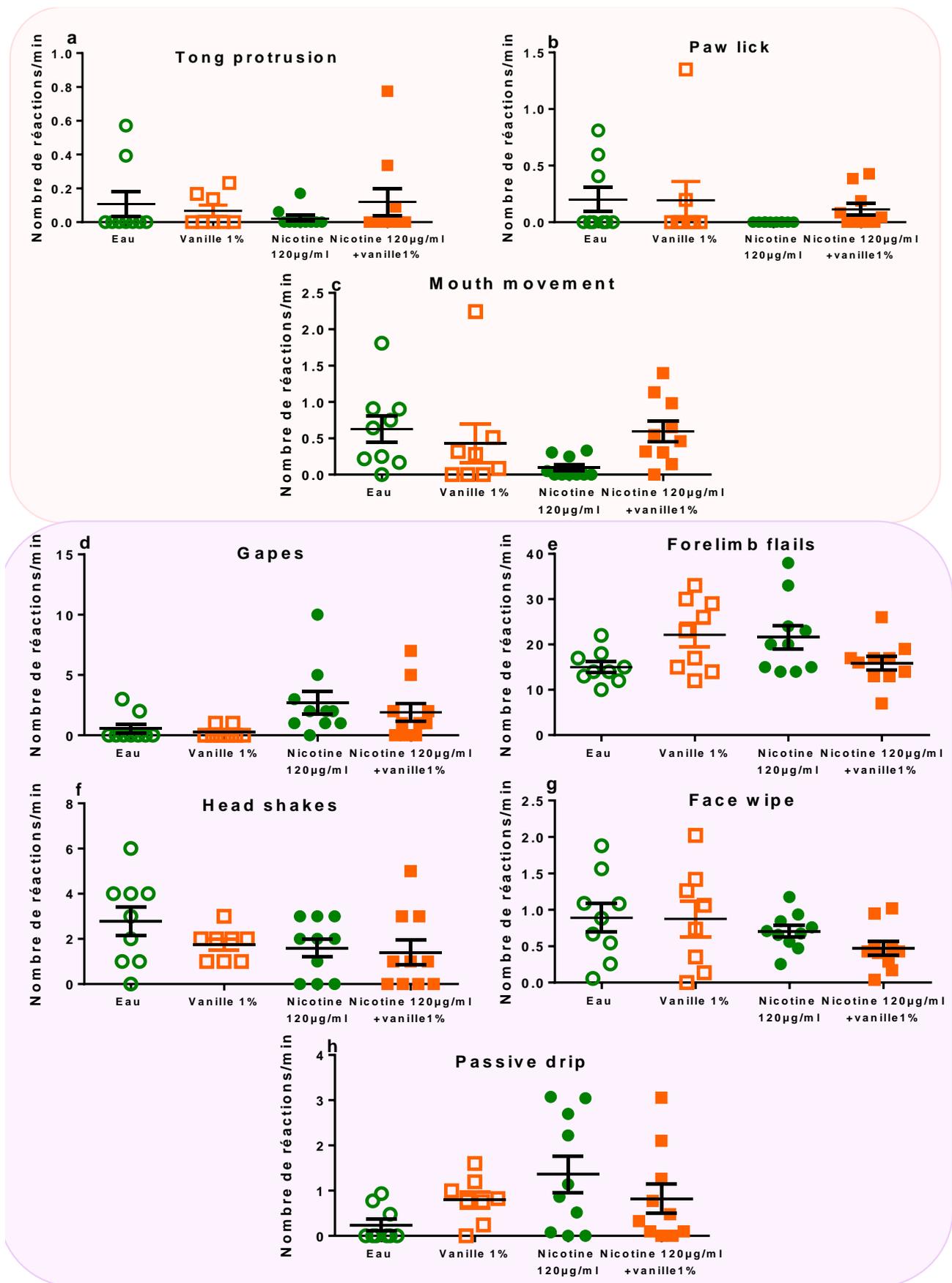


Fig 3.9 : Réactivités orofaciales par évènement suivant l'injection des solutions expérimentales ; nombre de réactions par minute des (a) *tongue protrusions*, (b) *paw licks*, (c) *mouth movements*, (d) *gapes*, (e) *forelimb flails*, (f) *passive drips*, (g) *head shakes* et (h) *face wipe*; n=8-10 souris par test. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec représentation des données individuelles

2. Étude qualitative

La figure 3.9 consiste en une représentation qualitative de la réactivité orofaciale.

L'analyse qualitative détaillée de chaque évènement contribuant à la palatabilité globale montre que les scores des variables comportementales comptant pour les réactions positives sont quasiment nuls pour la solution de nicotine (effet plancher). Ceci est valable pour les réactions hédoniques (*tongue protrusions et paw licks*) (fig 3.9 a, b) et pour les réactions ingestives (*mouth movements*) (fig 3.9c). Les solutions d'eau, de vanille et de nicotine arôme vanille, produisent des nombres équivalents de réactions positives.

Concernant les réactions aversives, on remarque que les *gapes* ne sont visibles qu'en la présence de nicotine dans la solution (fig 3.9d). Aussi, les *forelimb flails* constituent le type de réaction contribuant le plus au score des réactions négatives, allant jusqu'à 40 réactions/min (fig 3.9e). En général, on observe une grande hétérogénéité des activités de rejet actif par les *forelimb flails*. En revanche, toutes les solutions déclenchent des scores équivalents de *head shakes* et *face wipe* (fig 3.9 f,g). Enfin, les solutions de vanille, nicotine et nicotine arôme vanille engendrent un rejet passif (*passive drip*) plus important que l'eau (fig 3.9 h).

Ces tests de palatabilité répliquent nos résultats de la partie 1 de ce chapitre et confirment la modification de la palatabilité des solutions de nicotine vers une amélioration de la perception orale pour les solutions contenant un additif du type aromatique. Ces résultats permettent alors l'étude du codage neuronal de la valeur affective.

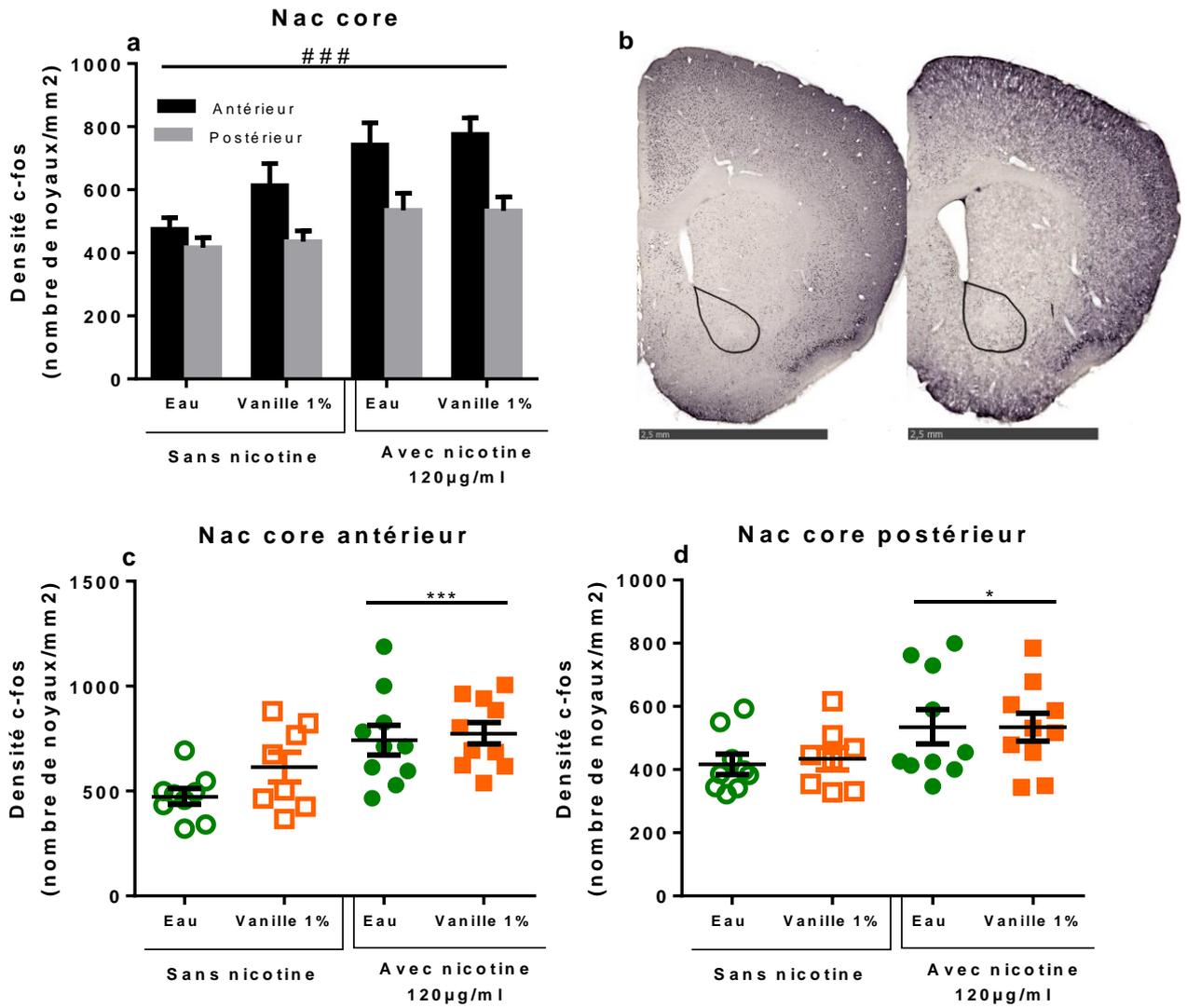


Fig 3.10 : Marquage neuronal par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² dans les régions du (a) Nac core total, (b) avec exemple de coupes du Nac avec délimitation du core antérieur et postérieur, (c) densité dans le Nac core antérieur et (d) Nac core postérieur; n=8-10 souris /test ; *p<0.05 et ***p<0.001 effet principal nicotine ; ### p<0.001 effet principal de l'antéro-postériorité. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

II. Étude du codage neuronal de la valeur affective des solutions

Nous avons étudié le codage neuronal de l'information par la quantification du marquage de la protéine c-Fos dans plusieurs régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information gustative et dans le traitement de la valeur affective: le noyau accumbens (Nac), le cortex gustatif (GC), le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA), l'habenula (Hb) et le noyau paraventriculaire du thalamus (PVT).

1. *La nicotine augmente l'activation neuronale dans le Nac : l'effet est plus important dans la partie antérieure*

Pour la quantification, nous avons divisé le Nac en 2 parties- antérieure et postérieure- avec ensuite la sous-division de chaque partie en core et shell, sachant que le Nac antérieur serait plus particulièrement impliqué dans le traitement des réponses hédoniques alors que le Nac postérieur le serait plus dans les réactions aversives (Berridge, 2019).

Ainsi, la comparaison du marquage neuronal a été faite par ANOVA mesures répétées à deux facteurs indépendants (vanille et nicotine) et un facteur dépendant antéro-postériorité.

a. *Nac core*

L'analyse montre que le Nac core antérieur est significativement plus marqué que le Nac core postérieur, que la solution testée contienne ou non de la nicotine (658.17 ± 34.47 vs. 484.03 ± 22.64 noyaux/mm² ; effet antéro-postériorité [F(1,33)=48.19, $p < 0.001$], (fig 3.10a). Les résultats montrent également un effet nicotine [F(1,33)=12.56, $p = 0.001$] et une interaction nicotine x antéro-postériorité significative [F(1,33)=4.69, $p = 0.038$], suggérant que la présence de la nicotine est responsable d'une densité de marquage plus élevée. En revanche, il n'y a pas d'effet principal vanille et l'interaction globale antéro-postériorité x nicotine x vanille n'est pas significative, ($p > 0.05$, n.s).

Ces effets au niveau du Nac core découlent d'une augmentation par la présence de nicotine, du marquage au niveau du Nac core antérieur [effet nicotine, F(1,33)=13.28, $p < 0.001$] (fig 3.10c) et du Nac core postérieur [effet nicotine, F(1,33)=6.18, $p = 0.018$] (fig 3.10d). Cet effet n'est pas altéré par la présence de l'arôme, (effet vanille et interaction nicotine x vanille, $p > 0.05$, n.s).

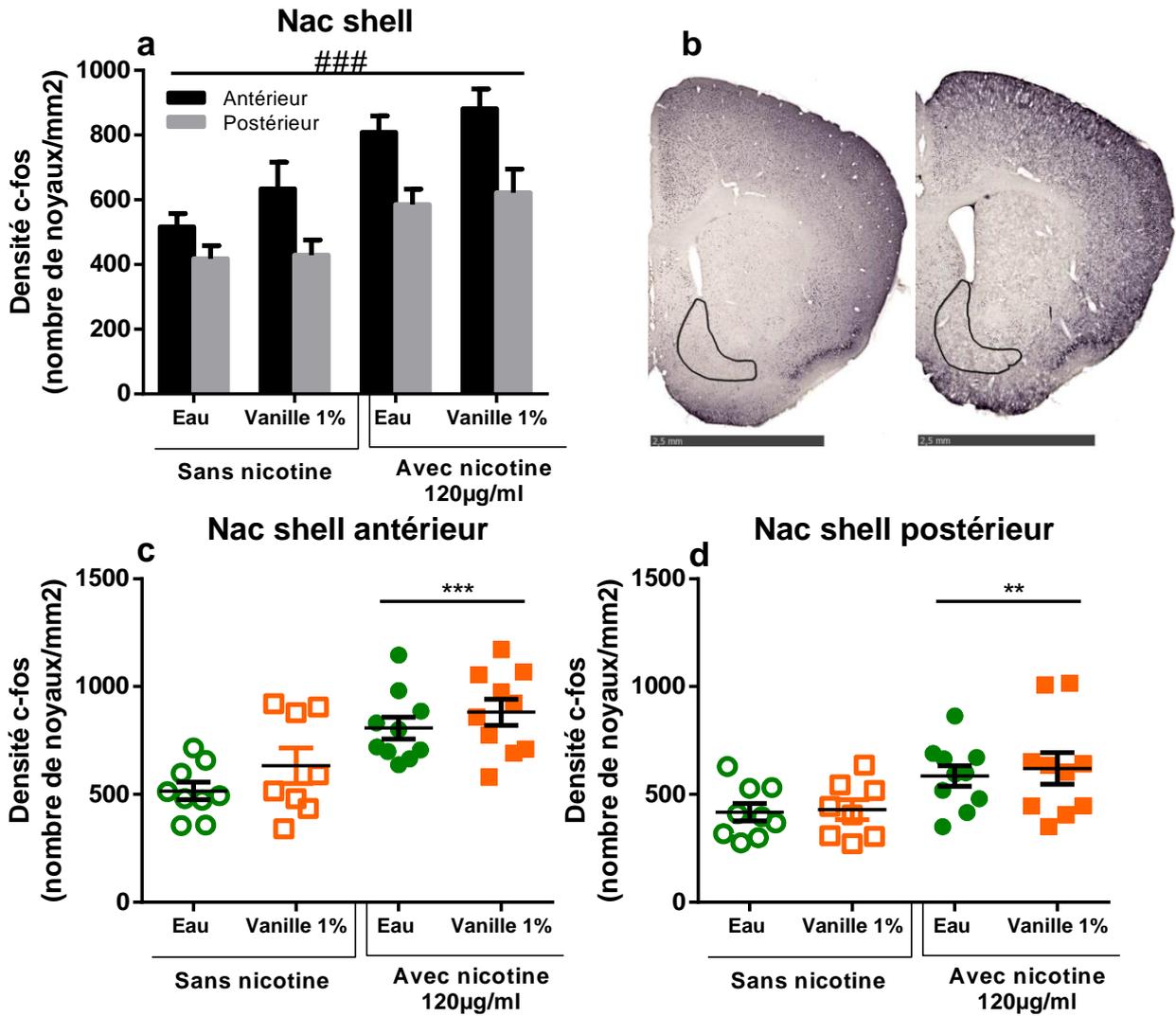


Fig 3.11 : Marquage neuronal par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² dans les régions du (a) Nac shell total, (b) avec exemple de coupes du Nac avec délimitation du shell antérieur et postérieur, (c) densité dans le Nac shell antérieur et (d) Nac shell postérieur; ; n=8-10 souris /test ; **p<0.01 et ***p<0.001 effet principal nicotine ; ###p<0.001 effet principal de l'antéro-postériorité. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

b. Nac shell

L'analyse montre que le Nac shell antérieur est significativement plus marqué que le Nac shell postérieur, que la solution testée contienne ou non de la nicotine (719.09 ± 37.09 vs. 520.44 ± 30.39 noyaux/mm²; effet antéro-postériorité [$F(1,33)=51.51$, $p<0.001$], (fig 3.11a). Les résultats montrent également un effet nicotine [$F(1,33)=19.98$, $p<0.001$] suggérant que la présence de la nicotine est responsable d'une densité de marquage plus élevée. En revanche, il n'y a pas d'effet principal vanille ni interactions significatives, ($p>0.05$, n.s).

Ces effets au niveau du Nac shell proviennent d'une augmentation par la présence de nicotine, du marquage au niveau du Nac shell antérieur [effet nicotine, $F(1,33)=20.78$, $p<0.001$] (fig 3.11c) et du Nac shell postérieur [effet nicotine, $F(1,33)=10.59$, $p=0.003$] (fig 3.10d). Cet effet n'est pas altéré par la présence de l'arôme, (effet vanille et interaction nicotine x vanille, $p>0.05$, n.s).

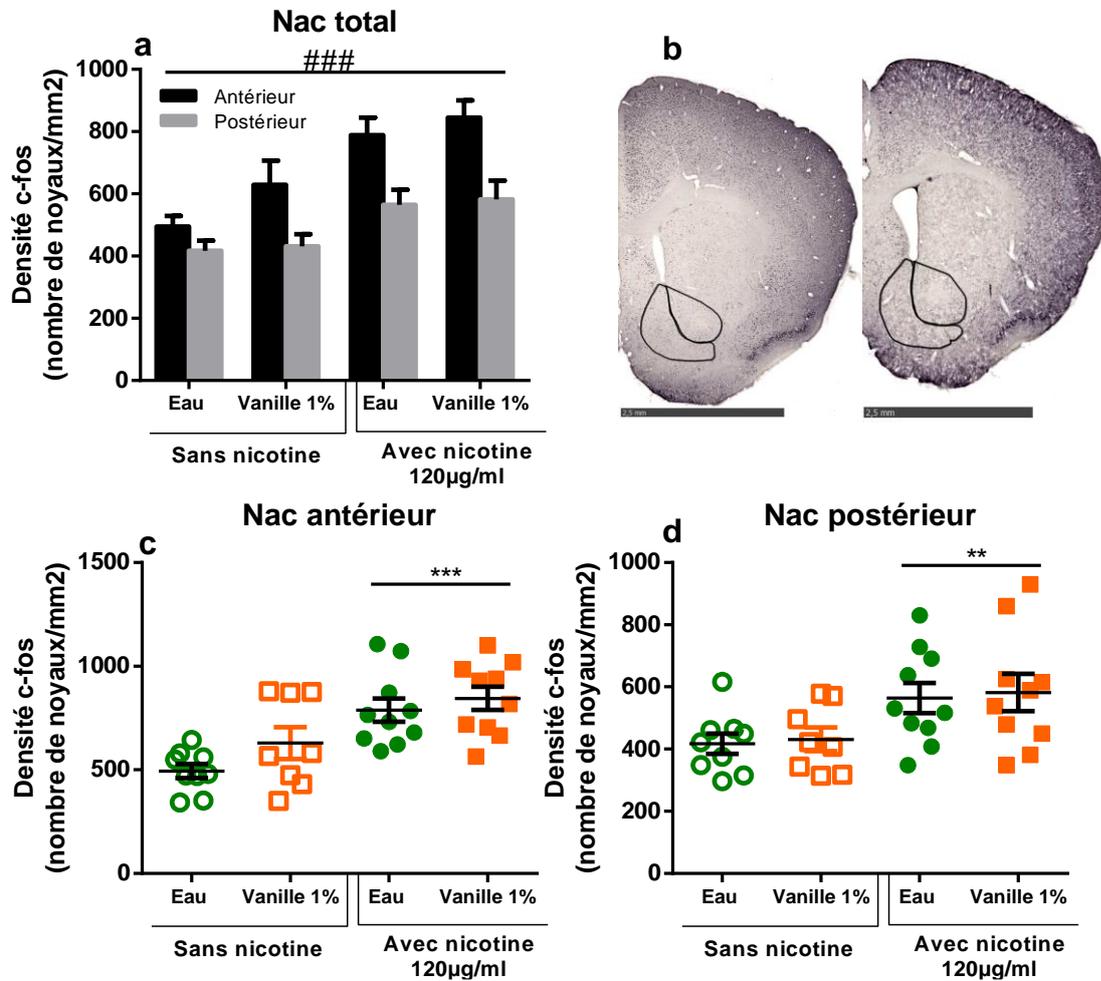


Fig 3.12 : Marquage neuronal par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² dans les régions du (a) Nac total, (b) avec exemple de coupes du Nac avec délimitation du core et du shell antérieur et postérieur, (c) densité dans le Nac antérieur et (d) Nac postérieur; ; n=8-10 souris /test ; *p<0.01 et ***p<0.001 effet principal nicotine ; ###p<0.001 effet principal de l'antéro-postériorité. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

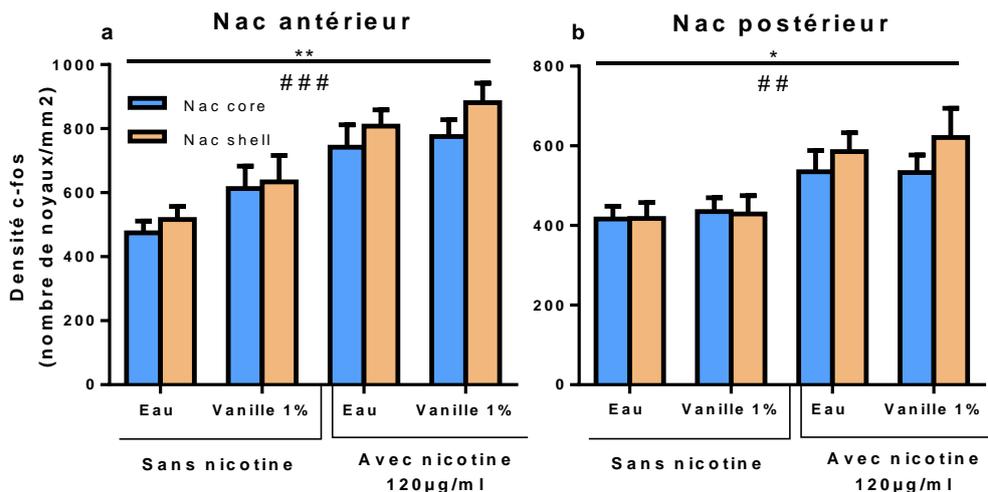


Fig 3.13 : Marquage neuronal par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² dans les sous régions core et shell du (a) Nac antérieur et (b) Nac postérieur; n=8-10 souris/test ; *p<0.05 et **p<0.01, effet principal de la sous-région et ###p<0.001 et ### p<0.001 effet principal de la nicotine sur la densité du marquage. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM.

c. *Nac total*

L'analyse montre que le Nac antérieur (core+shell) est significativement plus marqué que le Nac postérieur, que la solution testée contienne ou non de la nicotine (697.79 ± 35.58 vs. 504.55 ± 25.97 noyaux/mm²; effet antéro-postériorité [$F(1,33)=58.91$, $p<0.001$], (fig 3.12a). Les résultats montrent également un effet nicotine [$F(1,33)=19.98$, $p<0.001$] et une interaction nicotine x antéro-postériorité [$F(1,33)=4.51$, $p=0.04$] suggérant que la présence de la nicotine est responsable d'une densité de marquage plus élevée. En revanche, il n'y a pas d'effet principal vanille ni interactions significatives, ($p>0.05$, n.s).

Ces effets sont présents au niveau des deux parties antérieure [effet nicotine, $F(1,33)=20.01$, $p<0.001$] (fig 3.12c) et postérieure [effet nicotine, $F(1,33)=9.74$, $p=0.004$] (fig 3.12d) respectivement, montrant une augmentation de la densité du marquage par la nicotine indépendamment de la région accumbale. La présence de la vanille n'altère pas l'activation neuronale, effet vanille et interaction nicotine x vanille, $p>0.05$, n.s.

2. *La nicotine augmente l'activation neuronale dans la partie shell du Nac par rapport au core*

La comparaison du marquage du core par rapport au shell a été faite par ANOVA mesures répétées avec un facteur dépendant (à 2 niveaux, core/shell) et deux facteurs indépendants vanille et nicotine.

L'analyse montre que le Nac shell est significativement plus marqué que le Nac core. Cet effet est validé au niveau du Nac antérieur [effet core/shell, $F(1,33)=11.48$, $p=0.002$] (fig 3.13a) et du Nac postérieur [effet core/shell, $F(1,33)=4.02$, $p=0.05$] (fig 3.13b). En plus, la présence de nicotine est responsable d'une densité de marquage plus élevée dans ces deux parties, effet nicotine ($p<0.01$). En revanche, la présence de l'arôme vanille ne modifie pas le codage de la valeur affective dans le Nac, et on n'observe pas d'interactions core/shell x nicotine x vanille ($p>0.05$, n.s).

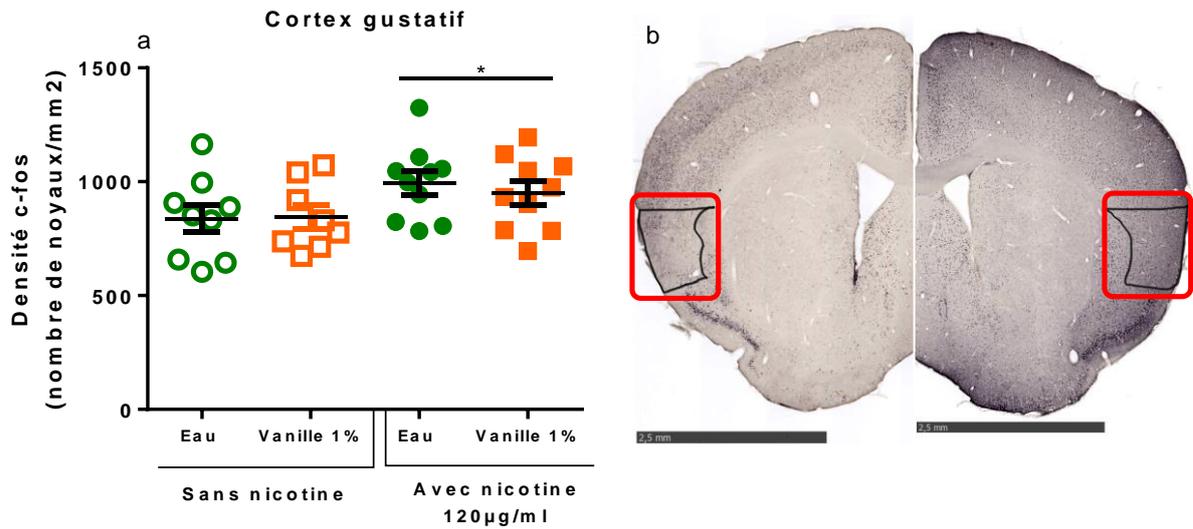


Fig 3.14 : Marquage neuronal du cortex insulaire gustatif par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; (a) Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² et (b) exemple de coupes contenant la partie du cortex gustatif délimitée ; n=8-10 souris/test ; *p<0.05, effet principal nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM avec représentation des données individuelles

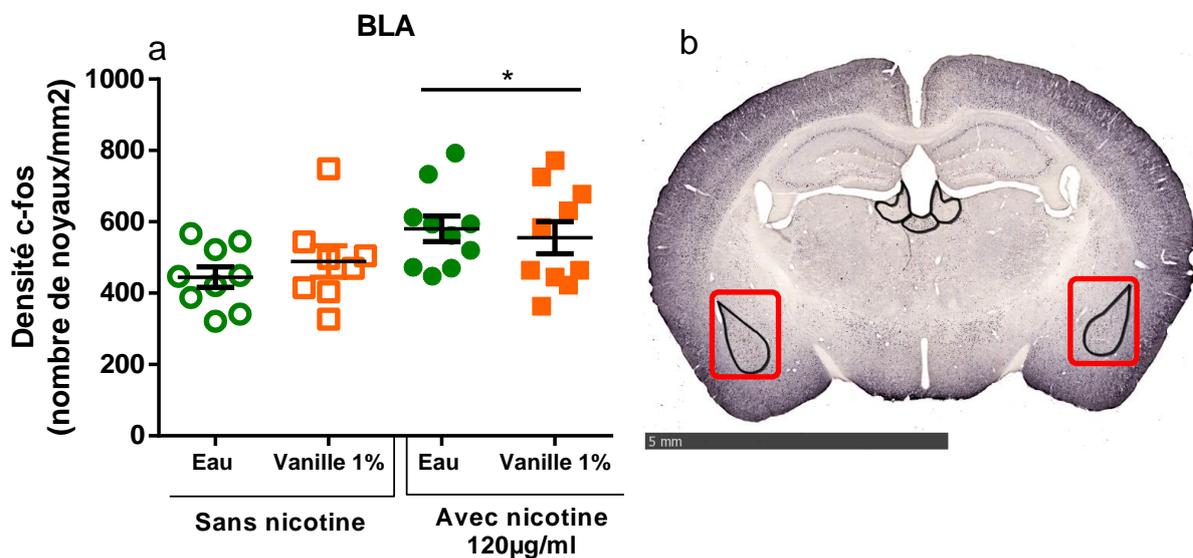


Fig 3.15 : Marquage neuronal de l'amygdale basolatérale par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; (a) Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² et (b) exemple de coupes contenant la partie BLA délimitée ; n=8-10 souris/test ; *p<0.05, effet principal nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM avec représentation des données individuelles

L'analyse de l'activité neuronale, région par région a été faite par comparaison des densités de marquage par une ANOVA factorielle comportant deux facteurs indépendants, vanille et nicotine. Les régions analysées ont été le cortex insulaire contenant la partie gustative (GC) (fig 3.14), le noyau de l'amygdale basolatérale (BLA) (fig 3.15), l'habenula (Hb) (fig 3.16) et le noyau paraventriculaire du thalamus (PVT) (fig 3.16).

3. La nicotine augmente l'activation neuronale dans le cortex gustatif

L'analyse montre que la nicotine augmente significativement la densité du marquage dans le GC, effet nicotine [$F(1,33)=5.68$, $p=0.02$] ; (nicotine zéro (eau et vanille), 841.78 ± 39.37 vs. nicotine 120 $\mu\text{g/mL}$ (nicotine seule et nicotine arôme vanille), 971.89 ± 35.76 noyaux/ mm^2) (fig 3.14a). En revanche, il n'y a pas de modification du marquage à l'ajout de l'arôme vanille (effet principal vanille [$F(1,33)=0.10$, $p=0.75$] ; interaction nicotine x vanille [$F(1,33)=0.21$, $p=0.65$]).

4. La nicotine augmente l'activation neuronale dans l'amygdale basolatérale

L'analyse montre que la nicotine augmente significativement la densité du marquage dans la BLA, effet nicotine [$F(1,33)=6.61$, $p=0.015$] ; (nicotine zéro, 465.59 ± 25.65 vs. nicotine 120 $\mu\text{g/mL}$, 567.78 ± 28.04 noyaux/ mm^2) (fig 3.15a). En revanche, il n'y a pas de modification du marquage à l'ajout de l'arôme vanille (effet principal vanille [$F(1,33)=0.06$, $p=0.81$] ; interaction nicotine x vanille [$F(1,33)=0.76$, $p=0.39$]).

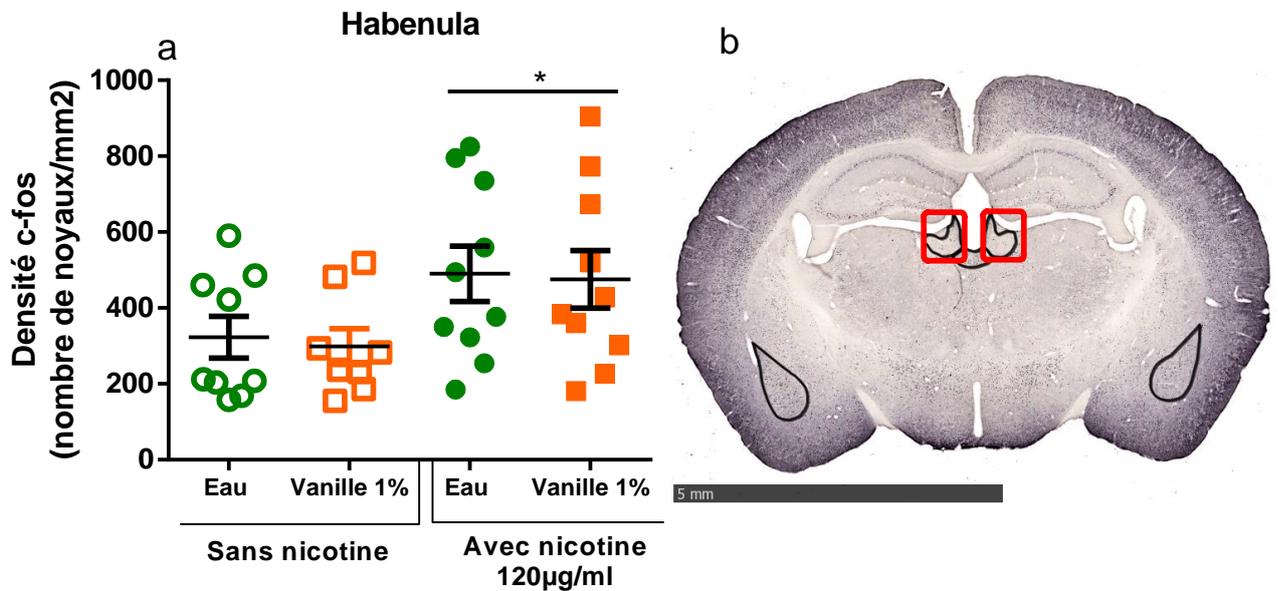


Fig 3.16 : Marquage neuronal de l'habenula par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; (a) Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² et (b) exemple de coupes contenant la partie habenula délimitée ; n=8-10 souris/test ; *p<0.05, effet principal nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM avec représentation des données individuelles

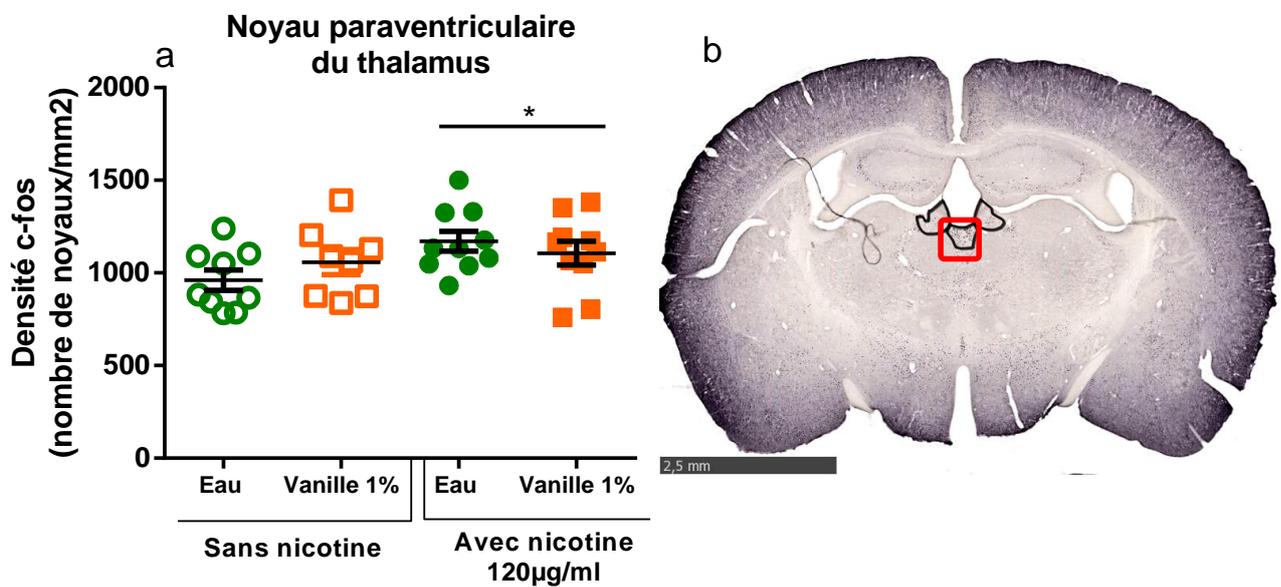


Fig 3.17 : Marquage neuronal du noyau thalamique paraventriculaire par la protéine c-Fos 90min suivant l'injection intrabuccale des solutions tests; (a) Représentation des densités en nombre de noyaux/mm² et (b) exemple de coupes contenant la partie PVT délimitée ; n=8-10 souris/test ; *p<0.05, effet principal nicotine. Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM avec représentation des données individuelles

5. *La nicotine augmente l'activation neuronale dans l'habenula*

L'analyse montre que la nicotine augmente significativement la densité du marquage dans l'Hb, effet nicotine [F(1,33)=6.70, p=0.014] ; (nicotine zéro, 311.52± 35.54 vs. nicotine 120 µg/mL, 482.74± 51.21 noyaux/mm²) (fig 3.16a). En revanche, il n'y a pas de modification du marquage à l'ajout de l'arôme vanille (effet principal vanille [F(1,33)=0.09, p=0.77] ; interaction nicotine x vanille [F(1,33)=0.006, p=0.94]).

6. *La nicotine augmente l'activation neuronale dans le noyau thalamique paraventriculaire*

L'analyse montre que la nicotine augmente significativement la densité du marquage dans le PVT, effet nicotine [F(1,33)=4.60, p=0.039] ; (nicotine zéro, 1006.55±43.27 vs. nicotine 120 µg/mL, 1138.43± 41.25 noyaux/mm²) (fig 3.17a). En revanche, il n'y a pas de modification du marquage à l'ajout de l'arôme vanille (effet principal vanille [F(1,33)=0.08, p=0.78] ; interaction nicotine x vanille [F(1,33)=1.80, p=0.19]).

Tous les résultats de cette partie montrent que la nicotine augmente l'activité neuronale dans les régions impliquées dans le codage de la valeur affective (Nac et BLA) mais aussi dans des régions codant le goût (GC) et la modulation de l'aversion (Hb et PVT). L'ajout de l'arôme de vanille ne modifie pas ce codage central dans les régions prises en compte par cette étude, malgré une amélioration par cet arôme de la palatabilité de la nicotine, mesurée de façon reproductible au cours des différents tests de réactivité orofaciale.

Discussion

L'objectif de notre étude comportementale et neurobiologique était d'évaluer le rôle des additifs sur la palatabilité de la nicotine et son intégration neuronale dans plusieurs structures cérébrales impliquées dans l'encodage de la valeur affective associée à un stimulus. Notre hypothèse était que les additifs aromatiques, comme la vanille, améliorent la palatabilité de la nicotine, en réduisant les effets aversifs de la drogue. Nous avons également postulé que ces molécules modifiaient l'encodage neuronal de la valeur affective associée à la nicotine.

Principaux résultats

Étude comportementale

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons validé notre modèle d'étude de la palatabilité par le test de réactivité gustative chez la souris.

Solutions de référence

L'injection intrabuccale de la solution de référence amère (quinine 0.1%) est déplaisante (Berridge, 2000) alors que l'injection d'une solution hautement palatable (lait concentré sucré 20%) est plaisante et agréable.

L'eau, tant présentée comme stimulus contrôle neutre, provoque un profil de réactions plutôt déplaisantes, moins aversif que la quinine tout de même. Ce profil peut être dû au fait que les souris ne sont pas en restriction hydrique, elles ne font alors pas des réactions ingestives ou positives. Ce rejet de l'eau a aussi été retrouvé dans d'autres études où les réactions à l'eau et à la quinine étaient même indistinctes chez les souris DBA/2 (Cagniard and Murphy, 2009). Chez l'humain, l'eau provoque une stimulation neuronale corticale, pouvant refléter un codage gustatif, trijumeau ou thermique (Zald and Pardo, 2000). De même, chez les rongeurs et les primates non-humains, les études électrophysiologiques montrent que la stimulation de la langue avec l'eau active des cellules tout au long du circuit du goût, notamment au niveau du cortex gustatif insulaire-operculaire (Scott et al., 1986; Smith-Swintosky et al., 1991).

Le sucrose, considéré comme référence positive provoquant des réactions hédoniques dans d'autres études chez les rongeurs (Brining et al., 1991; Grill and Norgren, 1978), a montré des réactions mixtes et équivalentes dans notre étude. Nos résultats pour le sucrose 20% sont en accord avec des expériences préalables réalisées au laboratoire (données non-publiées) à différentes concentrations de sucrose (5, 10, 20 et 30%) et qui ont, en effet, montré des réactions mixtes avec des composantes aversives mais jamais exclusivement ou majoritairement hédoniques chez la souris. Ainsi, des goûts simultanément perçus comme palatables et non-palatables peuvent déclencher les deux *patterns* de réactions en alternance (Berridge and Grill, 1983).

Après avoir montré que le test de réactivité gustative est opérationnel, c'est-à-dire qu'une solution palatable engendre bien une réaction hédonique et une solution amère une réaction aversive, nous avons pu analyser le profil des réactions affectives aux solutions tests.

Solutions expérimentales

Nous avons ensuite testé différentes concentrations de nicotine associée ou non à la vanille. Nos données montrent que la présentation de la nicotine seule engendre des réactions aversives concentration-dépendantes, sans effet sur les réactions hédoniques. En revanche, il n'y a pas d'effet de la concentration de la nicotine dans les solutions aromatisées à la vanille. Cet arôme « ramène » les solutions à la même palatabilité comparable à celle de la vanille seule.

Dans cette étude, nous avons montré une diminution du nombre des réactions aversives et une augmentation du nombre des réactions hédoniques lors de l'injection intraorale du mélange nicotine+vanille par rapport à la nicotine seule. Cet effet est très important et il valide le fait que l'ajout d'arômes dans les produits du tabac réduit l'aversion de la nicotine et contribue à un comportement ingestif plus élevé. Ces effets d'amélioration de goût dans le but d'une ingestion plus facilitée ont par exemple été investigués dans le cadre du masquage du goût amer des médicaments chez les enfants (Mennella et al., 2013).

Après étude de la modulation de la réactivité orofaciale à la nicotine par des additifs aromatiques de type odeur et étant donné que le sucre est souvent présent dans les produits du tabac, l'effet de l'association de la nicotine avec une solution de référence palatable sucré/gras (lait concentré 20%) a été évalué et montre un masquage complet de l'aversion de la nicotine et une inversion des scores de palatabilité pour rejoindre les scores du lait concentré seul.

Étude de la réactivité neuronale

La nicotine augmente l'activation neuronale dans toutes les régions quantifiées ; en revanche les effets neuronaux sont indépendants de la présence ou de l'absence de l'arôme malgré l'effet clair de celui-ci sur la palatabilité de la nicotine.

Ainsi, la valence de la nicotine intraorale est codée dans le Nac qui répond à toutes sortes de stimuli (positifs ou négatifs); cette substance agit aussi en tant que stimulus aversif sur le système du goût et de convergence des informations sensorielles (GC, BLA, PVT et Hb).

Ainsi, au sein du Nac, la nicotine augmente l'activation neuronale de façon plus importante dans la partie antérieure comparée à la partie postérieure, et dans la partie shell comparée au core du Nac. La nicotine augmente également l'activité neuronale dans le GC, le BLA, l'Hb et le PVT. Cependant il n'y a pas non plus d'activation différentielle en fonction des solutions de nicotine seule ou de nicotine arôme vanille, malgré une amélioration par cet arôme de la palatabilité de la nicotine.

Discussion

Nos résultats comportementaux valident notre hypothèse selon laquelle l'ajout de l'additif vanille à la nicotine entraîne une diminution de l'aversion pour celle-ci. Cependant, nos résultats ne semblent pas en accord avec notre hypothèse neurobiologique du changement du codage affectif de la nicotine par l'arôme puisque le marquage est équivalent pour les deux groupes nicotine et nicotine+arôme, dans toutes les régions quantifiées.

Le noyau accumbens

L'effet de la nicotine est observé au niveau du Nac, structure divisée en parties core et shell. Ces 2 sous-régions exercent des fonctions complémentaires en codage affectif. Par exemple, il a été montré, par microdialyse, que les injections aiguës passives de drogues augmentaient les niveaux de dopamine de façon préférentielle dans le Nac shell comparé au core (Lecca et al., 2006; Pontieri et al., 1995; Pontieri et al., 1996). De son côté, l'activation neuronale dans le Nac core a aussi été récemment impliquée dans le traitement de la palatabilité des saveurs (Grau-Perales et al., 2019) et notamment dans l'aversion (Rangel-Gomez et al., 2019).

Ceci est concordant avec nos résultats qui montrent une densité de marquage plus élevée dans le Nac shell par rapport au core suite à l'injection passive, intraorale des solutions contenant la nicotine. De même l'effet nicotine est aussi retrouvé au niveau du Nac core par l'augmentation de l'activation par rapport aux solutions contrôles, suggérant une augmentation de la perception aversive.

De même, les régions rostrale et caudale du Nac shell semblent être des modules affectifs différents générant des motivations de valences opposées dans le sens où des réactions appétitives ou défensives sont produites par des micro-injections des mêmes drogues, en fonction du placement le long du gradient rostro-caudal (Berridge, 2019). Ainsi, la partie antérieure du Nac shell aurait un rôle intégrateur des informations plutôt hédoniques « *hotspot* » alors que la partie caudale encoderait les stimulations aversives « *coldspot* » (Berridge, 2019; Castro et al., 2016). En effet, il a été montré que l'activation de la partie caudale du Nac shell transforme la perception hédonique du sucrose en perception très aversive « *disliking* » (Castro et al., 2016). De même, l'étude c-Fos après consommation de sucrose montre une augmentation du marquage neuronal dans le shell du Nac (pas le core), l'amygdale, l'ATV (Norgren et al., 2006; Park and Carr, 1998; Zhao et al., 2011) et le système gustatif (Anseloni et al., 2005).

Dans notre étude, le Nac shell antérieur augmente son activation à la présence de nicotine et le même effet est retrouvé dans le Nac shell postérieur. Ceci suggère un équilibre des effets positifs d'une part et négatifs de l'autre par rapport à l'encodage de la valeur affective de la nicotine.

Malgré l'existence de données sur l'implication du Nac shell antérieur dans le codage de la valeur hédonique d'un stimulus, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité de cette région lors de la combinaison nicotine+vanille. L'augmentation par la nicotine de l'activité du Nac shell postérieur, confirme les données de la littérature faisant état des propriétés aversives de la nicotine (Sellings et al., 2008).

Le cortex insulaire gustatif

De même, le GC a montré une réactivité neuronale augmentée dépendante de la présence de nicotine dans les solutions. On se demande alors si cet effet observé relève d'une action pharmacologique au niveau des nAChRs du GC ou de l'action via la stimulation des R au goût amer ? En effet, il a été montré qu'une stimulation gustative par de nouveaux signaux augmente l'expression de c-Fos dans le cortex insulaire (Koh et al., 2003). Plus spécifiquement, l'expérience d'un nouveau goût provoque la libération d'Ach au niveau du GC. Ces études suggèrent que l'Ach est un signal de la nouveauté gustative (Jeewajee et al., 2008; Miranda et al., 2000; Nunez-Jaramillo et al., 2008; Ranganath and Rainer, 2003), et constitue un élément essentiel de l'aversion gustative conditionnée (CTA) (Bermudez-Rattoni et al., 2004).

Des études montrent que les neurones du GC ne répondent pas simplement en modulant leur activité à la stimulation gustative intraorale mais leur activité est différente selon les différents goûts (Katz et al., 2002; Maier and Katz, 2013; Samuelson et al., 2012, 2013). Dans notre étude, l'ajout de la vanille n'a pas changé l'activation dans le GC malgré le changement de la palatabilité. Ceci suggère que la différence est due à des sous-ensembles au sein du GC et non pas à une activité globale de cette région lors de la stimulation gustative. Chez la souris, des études contradictoires existent sur l'organisation spatiale des neurones répondant à des stimuli différents dans le GC. Ainsi, des études montrent une absence d'organisation (Fletcher et al., 2017) et d'autres montrent des *hotspots* neuronaux répondant aux différents goûts : sucré, amer, salé et umami (Chen et al., 2011b).

La palatabilité de la vanille-*taste-like odor*- est équivalente à celle de l'eau dans notre étude, sauf que son ajout à la nicotine a augmenté la palatabilité de cette dernière. Le codage du GC équivalent à la nicotine lors de l'association pourrait s'expliquer par le fait que l'activation de la région insulaire gustative par l'odeur rétronasale présentée oralement à partir d'une solution aqueuse pourrait être simplement due à l'activation gustative provoquée par l'eau, qui à elle seule est capable d'activer le cortex gustatif primaire (de Araujo et al., 2003a). Une autre possibilité serait alors que la différence de codage lors du changement de la palatabilité viendrait de l'activation ou de l'inhibition d'autres régions telles que l'OFC, le cortex piriforme, le bulbe olfactif, le pallidum ventral, le cortex prélimbique, la partie gustative du thalamus (VPMpc) et PbN, non quantifiées dans cette présente étude.

De façon intéressante, le GC et la BLA sont réciproquement connectés anatomiquement (Reep and Winans, 1982a, b).

L'amygdale basolatérale

L'amygdale est une structure importante pour l'attribution des valeurs de l'expérience sensorielle, incluant l'identité du stimulus, la palatabilité et la valeur récompensante. Ainsi, les neurones de l'amygdale s'activent en réponse à l'administration des goûts (Grossman et al., 2008; Nishijo et al., 2000) et les lésions de la BLA perturbent les comportements liés au goût (Ganaraja and Jeganathan, 2000; Touzani et al., 1997). De même, la BLA a été étudiée pour la convergence d'entrées sensorielles gustatives et olfactives (Desgranges et al., 2010), le reflet de la palatabilité et la valeur appétitive de la récompense (Fontanini and Katz, 2009; Kim et al., 2017), le conditionnement gustatif (Kim et al., 2010) et l'évitement (Inui et al., 2019).

Les informations gustatives sont reflétées dans la BLA, à partir de 60ms suivant la stimulation gustative par injections intraorales (Fontanini et al., 2009), ce qui donne un temps large pour l'expression du codage de cette structure dans nos tests (60 s). Des données électrophysiologiques montrent que les neurones de la BLA répondent à des stimuli de valence positive et négative (Belova et al., 2007; Beyeler, 2016; Paton et al., 2006; Schoenbaum et al., 1999; Shabel and Janak, 2009). Ainsi, il existe des sous-ensembles distincts de neurones codant pour une valence positive ou négative (Janak and Tye, 2015). Sauf que, la disposition anatomique de ces populations reste moins précise (Beyeler et al., 2018). Les neurones BLA codant pour la valence positive et négative sont mélangés dans toute la BLA.

Récemment, il a été montré que l'activité des neurones de projection de l'insula sur la BLA sont nécessaires et suffisantes pour la représentation de la valeur gustative (Kayyal et al., 2019). Wang et collègues ont montré que les neurones du cortex répondant aux stimuli sucrés et amers projettent dans des zones topographiquement distinctes de l'amygdale, avec une forte ségrégation des projections neuronales véhiculant des signaux gustatifs appétitifs vs. aversifs. En manipulant les entrées gustatives spécifiques de l'amygdale, il est possible d'imposer une valence positive ou négative sur un stimulus hydrique neutre (eau), et même d'inverser la valeur hédonique d'un goût sucré ou amer (Wang et al., 2018a). L'inhibition des neurones dans l'amygdale ne permet plus la présentation d'un comportement reflétant la valence associée à la stimulation directe du cortex gustatif ou à la libération de substances chimiques sucrées et amères.

Des marqueurs plus spécifiques peuvent aider à comprendre les mécanismes de codage au sein de cette structure. Ainsi, une plus grande proportion de neurones Rspo2 exprime le c-Fos après une expérience naturellement aversive, et une plus grande proportion de neurones Ppp1r1b le fait après une expérience positive récompensante (Kim et al., 2017). De façon intéressante, l'amygdale chez

l'humain est activée à la fois par les stimuli gustatifs et olfactifs et ceci a été décrit pour la première fois par Araujo et collègues (de Araujo et al., 2003b).

Dans notre étude, l'activation de cette région est altérée par la nicotine mais on n'observe pas de changement suite à l'association de nos 2 stimuli gustatif (nicotine) et olfactif (vanille). Au niveau du BLA, le fait d'avoir deux populations neuronales distinctes (Fontanini et al., 2009) pourrait expliquer le manque de dissection des effets de la nicotine et de la vanille.

L'habenula

De façon très intéressante, la nicotine augmente l'activation neuronale au sein de l'habenula. Ce résultat est concordant avec les études montrant le rôle de l'Hb dans la signalisation des propriétés aversives de la nicotine (Morel et al., 2014), le contrôle de sa consommation (Fowler et al., 2011). En effet, l'Hb latérale reçoit des informations convergentes à partir du système limbique frontal ; elle est considérée comme un site d'intégration des informations sensorimotrices et affectives (Sutherland, 1982). L'aversion à la nicotine semble être régulée par l'activité des sous unités $\beta 4$ et $\alpha 5$ du nAChR au niveau de l'Hb médiale (Frahm et al., 2011).

Le thalamus paraventriculaire

Le PVT est une région thalamique importante et les entrées nerveuses thalamiques du PVT signalent l'état interne (Do-Monte et al., 2017; Haight et al., 2017; Livneh et al., 2017). En effet, les neurones du PVT sont recrutés par des événements appétitifs/aversifs et par leurs signaux prédictifs (Zhu et al., 2018).

De façon intéressante, l'activation optogénétique de la projection PVT-Nac a augmenté le comportement de prise alimentaire chez la souris (Cheng et al., 2018). En effet, des études montrent la présence de neurones qui répondent au glucose au niveau du PVT et qui contrôlent la motivation positive dans la recherche des récompenses sucrées (Labouebe et al., 2016). De plus, l'orexine dans le PVT postérieur transmet les signaux reliés à la faim au niveau du core du Nac (Meffre et al., 2019).

Des études montrent que les neurones de projections sur le PVT sont activés (augmentation de l'expression de c-Fos) par la nicotine aigue IP (Pasumarthi and Fadel, 2008).

Dans notre étude, la nicotine intraorale augmente l'expression de c-Fos au niveau du PVT suggérant des entrées sensorielles du type aversif, non diminuées par l'ajout de la vanille à la nicotine. Le recrutement détaillé des neurones de cette région aidera à la dissection des effets observés.

Limites de notre modèle

Les méthodes utilisées dans cette étude ne nous permettent pas de disséquer davantage les circuits neuronaux et de détailler l'implication de différents systèmes de neurotransmetteurs, des types de neurones et des récepteurs spécifiques au sein de chaque région. Puisque nous ne prenons pas en compte les sous populations de neurones, le marquage équivalent des structures ne semble pas contradictoire à la différence observée dans le comportement. La quantification de marqueurs plus spécifiques permettant de dissocier l'expression des valeurs affectives sensorielles serait nécessaire afin de pouvoir cibler, *a posteriori*, ces neurones ou populations, essayant de modifier ainsi le comportement.

Notre étude montre néanmoins un effet important de la nicotine en tant qu'agent pharmacologique et stimulus oral aversif, puissant modulateur de l'activité cérébrale après exposition aigue brève. On ne connaît pas encore le détail de l'activité des neurones pour pouvoir discerner entre deux cas : i) différents types de neurones qui mènent à des actions ou comportements différents, ou ii) mêmes neurones ayant des comportements différents selon les contextes et les stimuli. En effet, au sein d'une même structure, différentes populations neuronales peuvent soutenir différentes fonctions (Pour revue, voir Pignatelli et Beyeler, 2019). Par exemple, les études par activation optogénétique montrent que les projections de la BLA vers la CeA, mPFC et l'hippocampe, peuvent déclencher des réactions défensives (Burgos-Robles et al., 2017; Felix-Ortiz et al., 2013; Namburi et al., 2015), alors que, l'activation des projections BLA-Nac soutient le renforcement et la valeur affective positive. Les projections BLA-Nac jouent un rôle critique dans la médiation de la valence positive et du comportement appétitif (Beyeler et al., 2016; Britt et al., 2012; Namburi et al., 2015; Ramirez et al., 2015; Stuber et al., 2011).

Intégrations générant les sorties sensorielles

L'additif vanille utilisé dans cette étude est très peu sucré et par conséquent considéré comme un odorant plutôt qu'un goût. L'arôme de vanille en solution aqueuse agirait donc plutôt sur le système de l'olfaction rétronasale, impliqué dans le transport de molécules odorantes de la cavité orale jusqu'à la cavité nasale tapissée de Rs olfactifs lui permettant de rejoindre le système olfactif puis des systèmes de convergence des informations gustatives et olfactives (Fig 1).

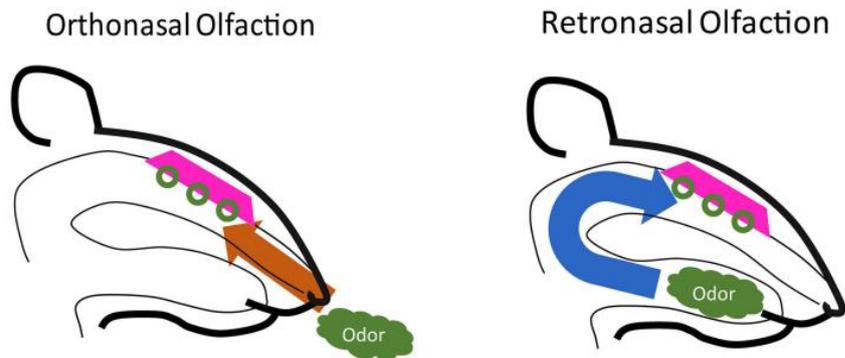


Fig 1 : Les odeurs entrent dans la cavité nasale par les narines externes (olfaction orthonasale) ou à travers les narines internes à l'arrière de la gorge, quand les aliments/solutions sont consommés (olfaction rétronasale) Adapté de (Blankenship et al., 2019) Blankenship et al., 2019

En revanche, la nicotine agirait au niveau gustatif. Cependant les systèmes olfactif et gustatif ne semblent pas complètement distincts puisque certaines régions cérébrales peuvent être activées à la fois par les stimuli gustatifs et olfactifs tels que l'OFC, l'insula et l'amygdale (de Araujo et al., 2003b).

Une région centre, l'OFC est par exemple impliquée dans la représentation des propriétés affectives des renforçateurs primaires et secondaires, notamment la stimulation tactile agréable, la récompense monétaire et les odeurs agréables (de Araujo et al., 2003b; O'Doherty et al., 2001a; Rolls et al., 2003c). Au niveau de l'OFC, des neurones répondent aux représentations de la texture et de la viscosité (Rolls et al., 2003c) et non seulement aux stimuli gustatifs et olfactifs.

De façon intéressante, la nicotine active les fibres gustatives au niveau du NTS (Lemon and Smith, 2005; Scott and Mark, 1987; Simons et al., 2006) et les neurones du GC (Katz et al., 2001; Soares et al., 2007). Certains neurones gustatifs du NST et du PbN sont alimentés par des afférences viscérales et olfactives (Bereiter et al., 1981; Hermann and Rogers, 1985; Van Buskirk and Erickson, 1977).

Des expériences d'autostimulation intracrânienne ont montré qu'une partie du PbN (la partie latérale) est impliquée dans le renforcement et les propriétés récompensantes, même si en général, cette partie reflète plus l'aversion (de Araujo, 2009). En effet, des études par Flynn (Flynn et al., 1991) montrent une augmentation de la consommation de quinine, d'acide et de sucrose chez les rats avec des lésions du PbN. De même, l'augmentation de l'expression de c-Fos dans le NTS a été corrélée à la CTA au sucrose chez les rats.

Ainsi, la liste des régions d'intérêt s'élargit, rendant plus possible la dissection des processus menant à l'augmentation de la palatabilité par l'ajout d'additifs à la nicotine.

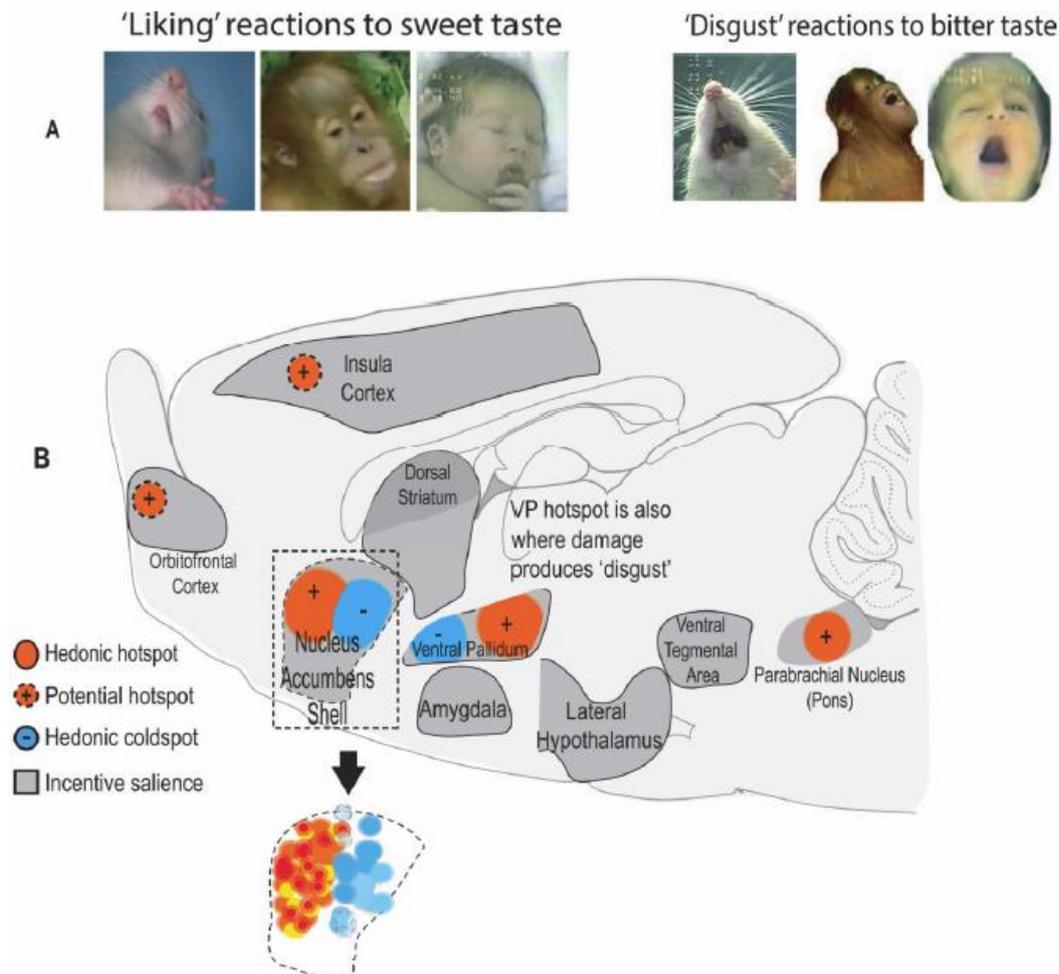


Fig 3 : Hotspots et coldspots hédoniques du cerveau (A) Réactions orofaciales positives (liking) provoquées par le goût du sucre chez le rat, l'orangutan et le nouveau-né humain. Réactions orofaciales négatives/aversives (dégoût) provoquées par un goût amer. (B) Coupe sagittale montrant les *hotspots* hédoniques du cerveau du rat, comportant le Nac, pallidum ventral, PFC. Adapté et modifié de Berridge et Kringelbach, 2015 (Berridge and Kringelbach, 2015)

Facteurs influençant la palatabilité

Il est vrai que les tests de réactivité gustative fournissent une mesure objective de la palatabilité, sauf que plusieurs facteurs peuvent influencer son expression. Les modèles de réponses appétitives et aversives ont une plasticité pouvant changer selon l'expérience. Ainsi, Suarez et collègues ont montré que les très jeunes rats manifestent plus de réactions ingestives et moins aversives au goût sucré quand il est présenté après injection intraorale de quinine. De même, l'injection de quinine a provoqué plus de réactions aversives quand elle a été délivrée suite à l'accès au sucre (Suarez et al., 2017).

De plus, des études au laboratoire ont montré que la surconsommation de sucre durant la période de l'adolescence était responsable d'un déficit de la réactivité hédonique et de l'activation neuronale par des récompenses sucrées au sein du Nac (Naneix et al., 2016).

En effet, les processus du « *liking* » sous-entendent le plaisir expérimenté par une stimulation sensorielle plaisante. Ceci est centralement dû aux interactions entre le Nac, le pallidum ventral et

les systèmes endogènes (Mahler et al., 2007; Pecina and Berridge, 2005; Smith and Berridge, 2005, 2007).

La vanilline est un odorant non commun chez les rongeurs et révèle malgré ceci un effet d'amélioration de la palatabilité de la nicotine. Or, l'ajout de vanilline dans les cigarettes et liquides d'e-cig peut s'expliquer par une connaissance préalable de l'humain de cette odeur, par les pâtisseries et les aliments palatables ; l'odeur rappelle donc un bon souvenir, sensation plaisante pour ceux qui choisissent la vanille.

En conclusion, dans cette étude, nous nous sommes demandé si un arôme, tel que la vanille, pouvait augmenter la palatabilité de la nicotine. Les résultats montrent que lorsque la nicotine est couplée à l'arôme vanille, les réactions hédoniques deviennent plus importantes et les réactions aversives sont considérablement réduites. En revanche, nous n'avons pas pu démontrer la contribution spécifique de chaque stimulus dans l'intégration neuronale centrale des entrées multisensorielles. Il sera important de continuer la cartographie d'activation neuronale pour continuer éventuellement trouver des réseaux de convergence des informations accordant une valence à l'association nicotine/arôme.

Discussion générale

Discussion générale

Rappel de l'objectif

L'objectif général de ce projet était d'élucider l'implication des stimuli oraux dans la palatabilité et le cycle de dépendance à la nicotine orale, et ainsi, l'interaction bidirectionnelle potentielle entre la drogue et les stimuli oraux. En effet, depuis toujours dans les produits du tabac conventionnel, et avec l'apparition sur le marché de l'e-cig et des nouveaux produits de vapotage depuis maintenant une quinzaine d'années, l'impact des additifs du tabac reste une problématique importante. L'usage de certains additifs (arômes caractérisants) a été déjà régulé dans les cigarettes conventionnelles mais la réglementation n'a pas encore légiféré sur les additifs dans les e-cig et les nouveaux produits du tabac. Il est donc important d'étudier l'impact de ces additifs sur le potentiel addictif de la nicotine délivrée par ces nouveaux modes de consommation.

Plusieurs études ont montré le rôle essentiel des stimuli associés à la nicotine dans la perception et l'auto administration intraveineuse de cette dernière (stimuli visuels (Palmatier et al., 2007) et sucre (Palmatier et al., 2012)). Cependant, peu d'études se sont intéressées au rôle des stimuli oraux dans le processus addictif à la nicotine alors que la voie d'exposition orale est typique de l'exposition tabagique chez l'humain.

Afin d'identifier le rôle des additifs aromatiques et des effets sensoriels dans l'attribution d'une valeur incitative et émotionnelle à la nicotine, quand ils sont associés par voie orale, nous avons essayé de répondre à trois grands objectifs :

1) La nicotine étant un composé irritant, pouvant sensibiliser les thermorécepteurs TRPV1 qui sont impliqués dans les effets orosensoriels et dans l'irritation suite à l'ingestion de la capsaïcine, nous avons étudié le rôle de la mutation TRPV1 dans l'aversion et le renforcement de la nicotine dans un paradigme d'AAO quand la nicotine diluée dans une solution de saccharine pour pouvoir être auto-administrée. Ainsi, nous avons pu tester l'implication de ces Rs sur les différents stades du processus addictif de la nicotine.

2) Il a été montré que les stimuli gustatifs jouent un rôle dans le renforcement du tabagisme, sauf qu'on ne connaît pas encore l'effet de l'administration orale simultanée de la nicotine avec ces additifs. La nicotine est un stimulus aversif quand elle est administrée par voie orale et le non-masquage de son goût constitue une barrière à son étude. Un deuxième volet était alors de choisir un additif permettant la consommation orale volontaire de nicotine, pour pouvoir ensuite modéliser les différents stades du processus addictif et tester l'influence de la présence ou de l'omission d'autres signaux sur l'auto-administration orale de nicotine.

3) Dans le dernier objectif, nous avons investigué le rôle des additifs aromatiques dans la palatabilité de la nicotine en l'évaluant par des tests de réactivité gustative. La mise en place et la validation de ce modèle nous a permis de mesurer la valeur affective de la nicotine associée ou non aux arômes, et d'étudier par la suite le codage neuronal dans plusieurs régions cérébrales clés impliquées dans l'encodage sensoriel lié à la valence positive et négative.

Résumé des résultats

1) Nous avons pu démontrer que l'absence du R TRPV1 promeut l'AAO de nicotine. Cependant mutation semble ne pas avoir d'effet sur les propriétés incitatives de la nicotine, ni sur la rechute à la présentation des signaux préalablement associés à la disponibilité de la drogue. La modification génétique du R TRPV1 rend les effets oraux sensoriels de la nicotine moins aversifs et constitue un facteur de vulnérabilité à la consommation accrue de cette drogue.

2) Nos conditions expérimentales ont permis l'AAO de nicotine en présence d'additif arôme vanille non sucré. Nous avons alors caractérisé l'acquisition, le maintien, la motivation et la rechute. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence le renforcement secondaire de la nicotine sur les signaux oraux comme on pouvait s'y attendre. De façon surprenante, l'arôme vanille génère un comportement d'AAO équivalent au groupe recevant la nicotine pour tous les stades du processus. Ce comportement d'AA des solutions d'arôme seul valide notre hypothèse postulant que les additifs aromatiques peuvent être renforçants par eux-mêmes et avoir des propriétés incitatives. Pour tenter d'amplifier l'effet de la nicotine, nous avons augmenté les doses de celle-ci, ce qui a eu pour effet inverse de diminuer la motivation pour la drogue. Les souris sont donc sensibles à la nicotine et modulent leur travail en fonction. Les challenges par injection de mécamylamine et de nicotine ne montrent pas les effets pharmacologiques et comportementaux attendus sur le blocage ou le *priming*. Enfin, le dosage de la cotinine sanguine montre bien une imprégnation à la nicotine, même si ses effets renforçateurs sont absents.

Dans nos expériences de conditionnement opérant associant la nicotine avec la vanille (chapitre 2) et la saccharine (chapitre 1), on remarque le maintien de l'AAO de nicotine aux doses administrées. Cependant, l'absence de renforcement secondaire nous permet de considérer plusieurs possibilités :

1. un dysfonctionnement de l'apprentissage associatif dû à la faible biodisponibilité de la nicotine orale, sa pharmacocinétique plus lente et l'absence de son effet pendant la tâche ;
2. La non-détection de l'effet pharmacologique de la nicotine en tant que drogue au niveau central (circuit de récompense) mais seulement au niveau oral (stimulus gustatif)

3. La force des effets des stimuli environnementaux par rapport à la nicotine, ce qui rend les valeurs des récompenses du groupe recevant la nicotine équivalentes à celles du groupe contrôle ;

4. La transmission sociale probable de la valeur des récompenses, puisqu'après les sessions, des souris de tous les groupes se retrouvaient ensemble dans les mêmes cages d'hébergement ;

5. Une interaction aversion/récompense équilibrée, sans perte de contrôle.

3) Nous avons mis en place un système opérationnel d'étude de la réactivité gustative chez la souris. Ceci nous a permis de montrer et de répliquer à 2 reprises l'effet des additifs aromatiques et sucrés sur l'augmentation de la palatabilité de la nicotine. Ainsi, l'ajout de vanille et de lait concentré ont respectivement amélioré et inversé les propriétés aversives du goût de la nicotine, ce qui confirme le rôle des additifs dans la composante « *liking* » des produits du tabac. Nous avons ensuite mis en évidence l'effet activateur de la nicotine sur la fonction neuronale mesurée par le marquage de la protéine c-Fos au niveau du Nac, BLA, GC, Hb et PVT. Ceci a montré les effets à la fois renforçants/plaisants et aversifs de la nicotine au niveau de ces structures impliquées dans le codage de la valeur affective (Nac shell et core, BLA), la convergence des entrées sensorielles (BLA et GC) et l'aversion (Hb et PVT). En revanche, aucun effet de l'arôme n'a été observé sur l'activité neuronale dans ces structures, malgré son effet sur le comportement de réactivité gustative.

Dans cette expérience, on observe un effet améliorant de l'arôme sur la réactivité au goût de la nicotine cependant nous n'avons pu mettre en évidence une signature « neuronale » de cet effet. Nous pouvons avancer les hypothèses suivantes pour l'expliquer :

La vanille à elle seule n'est pas vraiment un produit palatable et déclenche une dominance de réactions aversives de rejet. En revanche, elle diminue les réactions aversives de la nicotine. Cela suggère qu'il n'y a pas eu d'inversion de la valeur affective mais une modulation positive, peut être insuffisante pour observer une modification numérique de la réactivité neuronale dans les structures d'intérêt. L'autre explication est que le marquage de la protéine c-Fos n'est pas l'outil le plus approprié pour tracer des activations différentielles au sein d'une structure qui reflèteraient un codage différentiel de la valence affective de la solution.

Effets renforçateurs de la nicotine sur les saveurs et vice versa

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont abordé la question de la relation entre les arômes de tabac et la perception des produits contenant de la nicotine. L'importance de ce sujet augmente de plus en plus avec l'attrait croissant des produits de vapotage, en particulier les e-cig.

- **L'e-cig en clinique**

Les données cliniques appuient fortement nos démonstrations de l'augmentation de la palatabilité et de l'amélioration de la perception affective de la nicotine suite à son association aux saveurs. En effet, les saveurs renforcent l'expérience du vapotage des produits nicotinisés (Audrain-McGovern et al., 2016) ainsi que la perception positive et l'attractivité des nouveaux produits du tabac (Choi et al., 2012). Ainsi, la consommation de ces produits est associée à une diminution de la perception de danger du tabac et une plus faible intention de s'abstenir (Dai and Hao, 2016; Hoffman et al., 2016; Pepper et al., 2016). Il en est de même pour le menthol qui augmente les effets récompensants positifs des e-cig (Krishnan-Sarin et al., 2017) et réduit l'irritation des concentrations élevées de nicotine dans les e-cig (Rosbrook and Green, 2016). Les saveurs peuvent aussi augmenter l'absorption de la nicotine, augmentant ainsi sa biodisponibilité et ses effets (St Helen et al., 2017).

- **Nicotine et saveurs en préclinique**

L'expérimentation animale confirme de même la relation bidirectionnelle entre la nicotine et les saveurs. Ainsi, il a été démontré que l'injection de menthol facilitait la libération de dopamine dans le NAC induite par l'administration systémique de nicotine et augmentait ainsi le renforcement lié à la nicotine (Zhang et al., 2018). Cet effet est reproduit dans les études d'AAIV (Biswas et al., 2016).

De façon plus importante et intéressante, plusieurs études ont évalué l'effet des saveurs, administrées par voie orale ou injectable, sur l'AA de la nicotine. Dans ces investigations, la nicotine est souvent administrée par voie IV (0.2 mL/Kg) et sa disponibilité est rendue contingente à la distribution des solutions aromatisées dans un abreuvoir. Par ces méthodes, la nicotine a pu augmenter les propriétés incitatives des renforçateurs conditionnés gustatifs (Palmatier et al., 2013) et vice versa, ces saveurs ont augmenté l'AAIV de nicotine (Palmatier et al., 2019). Aussi, ces saveurs à valeur appétitive (comme le sucre et la saccharine) aident à la promotion de l'AAIV de nicotine avec des effets augmentant la libération de dopamine au niveau du système de récompense (Wickham et al., 2018). Néanmoins, les saveurs (menthol) qui diminuent l'aversion de la nicotine orale (50-100 µg/mL) dans un paradigme de choix entre deux bouteilles, n'altèrent pas l'AAIV de nicotine.

La limite de ces études réside dans le fait que dans les modèles utilisés, ne sont pas caractérisés pas les effets expérimentés par les humains consommateurs de produits du tabac suite à la combinaison de la nicotine orale et des saveurs orales (Wickham et al., 2018). *Ceci constitue un point fort de nos études et appuie leur haute pertinence.*

Cependant, malgré l'adaptation de notre approche aux conditions de consommation humaine nous n'avons pas démontré ces effets de renforcement de l'AA par notre modèle de prise orale de la nicotine et saveurs combinés oralement. Cela pourrait s'expliquer par la cinétique d'absorption lente à partir de la cavité buccale, empêchant la contingence émotionnelle des effets pharmacologiques, pro attentionnels et sensoriels. Ceci n'explique les résultats qu'en partie puisque l'absence de renforcement a aussi été observé dans des études où la nicotine est administrée par voie injectable (Chen et al., 2011a; Wickham et al., 2018) donc, à biodisponibilité et action pharmacologique plus rapides.

Effets propres des saveurs

Que ce soit en conditionnement ou en choix libre, nos résultats montrent que les solutions aromatisées ou édulcorées sont volontairement consommées. De plus, les souris fournissent un travail pour les obtenir, ce qui suggère leurs propriétés renforçantes et incitatives propres, indépendamment de la nicotine (chapitre 2). Les saveurs ne sont pas seulement présentes pour masquer le goût aversif de la nicotine mais aussi pour exercer leurs effets propres au niveau central. Ainsi, les saveurs des produits de vapotage peuvent être attractives ; par exemple, la saveur pomme verte produit des effets récompensants en up-régulant les nAChRs au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA chez la souris (Avelar et al., 2019). Aussi, chez l'humain des effets des saveurs (*wintergreen flavors*) indépendants de la nicotine ont pu être démontrés centralement par électroencéphalographie. Ces saveurs ont modulé à elles seules l'activité haute fréquence (beta1, beta2 et gamma) alors que la nicotine a modulé l'activité basse fréquence (delta, theta et alpha) (Rangel-Gomez et al., 2019).

Dans une autre étude, la vanille, parmi d'autres saveurs, a augmenté le plaisir suite à la délivrance de mélanges de PG/VG dans la cavité buccale des participants (Rao et al., 2018). En effet, la vanilline et l'éthylvanilline réagissent rapidement avec le solvant PG des e-liquides, générant des acétals, produits chimiques qui activent les Rs irritants TRPA1 et TRPV1 (Erythropel et al., 2019).

Les résultats des effets des saveurs ci-dessus ne sont pas généralisables à toutes les saveurs puisque chacune de ces dernières a des effets propres sur la perception sensorielle (Schwieterman et al., 2014); il serait difficile d'aller cartographier les effets de toutes les propositions de mélanges existants sur le marché. L'interaction complexe des composants (Bartoshuk and Cleveland, 1977;

McBurney and Bartoshuk, 1973) aura des effets comportementaux difficiles à observer et à disséquer en encodage neuronal. Ce qui est de plus en plus validé, c'est la forte attractivité des saveurs et leurs effets sur le comportement de consommation des produits du tabac.

Variabilité de la réponse à la nicotine

La dépendance à la nicotine est complexe et il existe une forte variabilité dans la vulnérabilité à ses effets addictifs. Des études ont montré que la sensibilité réduite au goût amer augmentait le risque de devenir dépendant à la nicotine (Enoch et al., 2001). Des facteurs ethniques et génétiques existent aussi dans la variabilité de la perception du goût (Duffy et al., 2004; Hayes et al., 2008; Williams et al., 2016). De même, Hwang et collègues ont mis en évidence des variations des structures cérébrales chez des sujets sains, pouvant être associées avec le score de l'intensité du goût (Hwang et al., 2019). Ces variabilités individuelles peuvent constituer des facteurs de vulnérabilité à l'addiction et c'est ce que nos résultats semblent suggérer également lors de la mutation génétique du R TRPV1.

Les adolescents sont plus sensibles et impactés par les e-cig et la nicotine

Les adolescents expérimentent de plus en plus l'e-cig et certains médecins recommandent même l'e-cig comme moyen d'arrêter de fumer (Pepper et al., 2015). Ceci est inquiétant vu que la nicotine dans les e-cig peut entraîner une dépendance ou causer des problèmes de développement du cerveau chez les adolescents (Dwyer et al., 2009).

Il a été déjà démontré que l'expérience avec la nicotine à l'adolescence produit des dérégulations centrales (mécanistiques et cognitives) et résulte en des phénotypes dépressifs et anxieux persistants chez les animaux à l'âge adulte (Adriani et al., 2006; Counotte et al., 2009; Jobson et al., 2019; Pushkin et al., 2019), rendant ainsi les adolescents encore plus vulnérables à l'addiction à la nicotine (Adriani et al., 2004; Adriani et al., 2002a). De même, cette tranche de la population est plus vulnérable à la transition de l'expérimentation occasionnelle à l'usage régulier (Hertel and Mermelstein, 2016).

Les études cliniques montrent que les saveurs constituent le facteur le plus important (Kong et al., 2015; Krishnan-Sarin et al., 2015; Laverty et al., 2016; Villanti et al., 2017a), ou au moins un des facteurs importants dans l'initiation à l'usage des produits de vapotage, chez les adolescents (Bold et al., 2016; Huang et al., 2017; Kinouani et al., 2017). En effet, les e-liquides aromatisés, surtout ceux qui sont sucrés, produisent un plus fort attrait pour les e-cig chez les jeunes adultes (Goldenson et al., 2016a) et augmentent la satisfaction et le plaisir par rapport aux cigarettes conventionnelles (Soule et al., 2016a; Soule et al., 2016b). En plus, préférer plus de saveurs d'e-

cig est associé à une plus haute fréquence d'utilisation de l'e-cig chez les adolescents mais pas chez les adultes (Morean et al., 2018).

Pertinence de l'étude de la nicotine et des saveurs en santé publique

Les saveurs utilisées dans les produits du tabac, surtout les e-cig, sont des stimuli familiers avec des propriétés incitatives puisque, chez l'humain, ils ont été déjà conditionnés à un goût sucré, des effets post-ingestifs et des aliments récompensants. Le but majeur de ces additifs est de promouvoir la consommation de la nicotine en agissant sur son profil de palatabilité et des effets orosensoriels. Ainsi, ils peuvent potentiellement être des outils de renforcement secondaire de la nicotine. Dans nos études, la vanille est renforçante, même si préalablement inconnue par les souris. Nous pouvons suggérer que ses effets seront encore plus accentués chez l'humain suite aux expériences plaisantes avec cette saveur dans les pâtisseries. Il en est de même pour le menthol et autres additifs dont la valeur rendue récompensante, produit des changements centraux (Henderson et al., 2017; Henderson et al., 2016; Ton et al., 2015) aidant à l'expérimentation plaisante, à l'usage répété et au maintien de la consommation abusive des produits du tabac. Une étude récente démontre que certains produits de la e-cig JUUL contiennent de fortes doses de nicotine et de hautes concentrations de saveurs, suffisantes pour les rendre attractifs aux jeunes (Omaiye et al., 2019a; Omaiye et al., 2019b). Cet abus du tabac est un problème majeur de santé publique ; les travaux de recherche fourniront des données aidant à la prise de décision vis-à-vis de la réglementation des pratiques d'utilisation des saveurs dans les nouveaux produits du tabac.

Décalage et inefficacité de l'apprentissage associatif

Une explication probable de l'absence de renforcement de l'AAO est que la voie orale provoque un décalage entre la consommation de nicotine et l'effet nicotinique, rendant plus difficile l'association de ces deux événements.

Ainsi, la prédiction reposant sur l'interaction de la récompense avec son environnement (dans notre cas les stimuli oraux et visuels) aide à l'apprentissage des mécanismes de renforcement (Takahashi et al., 2016). La contingence de distribution des stimuli n'exclue pas la non-contingence des effets de la nicotine orale et des stimuli. Ceci peut empêcher la détermination de la valeur de cette drogue, même si on observe une flexibilité (Lesage et al., 2017) quant au changement dans la récompense ou l'omission de signaux de l'environnement préalablement associés à cette valeur de la récompense. La valeur des stimuli est ainsi mise à jour.

Les effets sensoriels sont un facteur majeur dans la dépendance au tabac

L'e-cig ressemble aux produits de remplacement de la nicotine de type inhalateur. Ce type d'appareillage devient, de plus en plus, une alternative aux fumeurs de la cigarette conventionnelle.

Il comble des aspects comportementaux et gestuels de l'acte de fumer, avec un goût plus agréable et des effets sensoriels plaisants (Palazzolo, 2013). La majorité de la nicotine est délivrée au niveau de la cavité orale, avec une très faible quantité qui arrive à l'estomac et aux poumons (Choi et al., 2003; Molander et al., 2001; Molander and Lunell, 2001).

La stimulation par la nicotine des fibres nerveuses sensorielles orales/linguales est importante pour la médiation des effets sensoriels de la nicotine, tels que le goût, l'arôme et la sensation des voies respiratoires, et les perceptions associées sont considérées comme extrêmement importantes pour la satisfaction liée à la consommation des produits du tabac (Palmatier et al., 2006; Rose, 2006; Rose et al., 1985; Westman et al., 1996; Yerger, 2011; Yerger and McCandless, 2011). Pour un consommateur typique, les signaux conditionnés à la prise peuvent inclure le *packaging*, l'irritation de la gorge, le goût et l'odeur des produits du tabac (Geier et al., 2000 ; Pritchard et al., 1996; Rose et al., 1993). Ces stimuli sont renforçants par eux-mêmes et auto-administrés chez l'humain (Rose et al., 2000).

Chez l'humain et chez l'animal, rendre la nicotine palatable est vital pour sa consommation vu l'évitement de son goût quand il n'est pas masqué (Adriani et al., 2002b). Ainsi, Ksir et collègues ont démontré que le sucrose est un ingrédient critique pour la consommation de tabac sous forme de chewing gum par les hamsters (Ksir, 1983). De même, dans les tests de réactivité gustative, la nicotine seule (50-100 µg/mL) engendre, comme dans notre étude (40-80-120 µg/mL), des réactions très aversives. Ceci est compatible avec le fait que la nicotine seule est peu ou pas consommée dans un paradigme de libre choix entre deux bouteilles. Elle est évitée, même à des concentrations de 3-5 µg/mL et encore plus avec des concentrations plus élevées de 48 µg/mL (Flynn et al., 1989; Naquira and Arqueros, 1978).

Valeur émotionnelle

Une question se pose, concernant la valeur affective de chacun des composants de nicotine et de vanille. Nos études montrent des différences suite à l'exposition aigue (tests de réactivité gustative) et chronique (AAO ou consommation volontaire en bouteilles). En effet, la nicotine et la vanille provoquent un *disliking* (réactions très aversives en réactivité gustative) en écart avec le *wanting* incitateur mesuré par la réponse opérante. Ceci suggère le développement d'une tolérance au goût déplaisant au fur et à mesure des expériences répétées et ceci est très possible, vu l'impact de l'expérience sur la perception du goût et l'amélioration de la palatabilité avec la nicotine (Flynn et al., 1989) et d'autres drogues comme la morphine (Zellner et al., 1985).

Les comportements mesurés pour la vanille seule ou couplée à la nicotine sont répliqués tout au long de ce travail. En effet, les solutions de nicotine arôme vanille et de vanille seule sont isopalatables. Ainsi, i) elles ont des préférences équivalentes en consommation simultanée, ii) elles

montrent des réponses opérantes équivalentes et iii) ont des profils de réactivité gustative similaires. Cependant, une différence claire de la valeur émotionnelle par la nicotine est reproduite au niveau neuronal. L'intégration de ses deux stimuli est alors différente au niveau central, suggérant des circuits neuronaux plus ou moins activés par chacun des stimuli dissociés. On n'observe cependant pas une différence lors de la synergie d'action entre drogue et arôme. Nous suggérons que ceci est dû à la différence de codage au niveau des sous-ensembles et à la génération d'un équilibre émotionnel empêchant l'expression de comportements différents.

En effet, plusieurs structures sont à la fois impliquées dans la régulation émotionnelle positive et négative. Ainsi, l'activité au niveau de l'insula augmente durant la perception subjective d'émotions positives et négatives (Bernhardt and Singer, 2012; Caruana et al., 2011; Craig, 2009; Critchley et al., 2005; Critchley et al., 2004). Dans notre cas, l'augmentation de la palatabilité de la nicotine par la vanille augmenterait alors les entrées sensorielles positives (à partir du Nac shell antérieur par exemple) et réduirait des entrées négatives à partir du tronc cérébral ou l'amygdale. En effet, les structures sont divisées en plusieurs régions fonctionnelles, participant à l'intégration sensorielle et à la représentation émotionnelle (Gogolla, 2017). Ainsi, l'insula soutient des connections réciproques avec les systèmes sensoriel, émotionnel, motivationnel et cognitif. Elle reçoit des entrées neuromodulatrices sous la forme d'afférences cholinergiques du noyau basal (BN), des entrées dopaminergiques à partir de l'AVT et des entrées adrénérgiques du locus coeruleus (LC) (fig.4). Ceci suggère que les sorties sensorielles comportementales sont dues à l'intégration de toutes ces informations activatrices et inhibitrices suite à la stimulation émotionnelle par injection de la solution au niveau de la cavité buccale.

Le cortex insulaire relie ainsi l'expérience sensorielle à la valence émotionnelle. Il a été notamment étudié dans la perception des saveurs (Desgranges et al., 2010). Dans nos conditions, l'information sensorielle olfactogustative peut être soutenue dans les sous régions contenant des neurones codant uniquement au goût, uniquement aux odeurs ou aux deux réponses simultanées (Samuelsen and Fontanini, 2017).

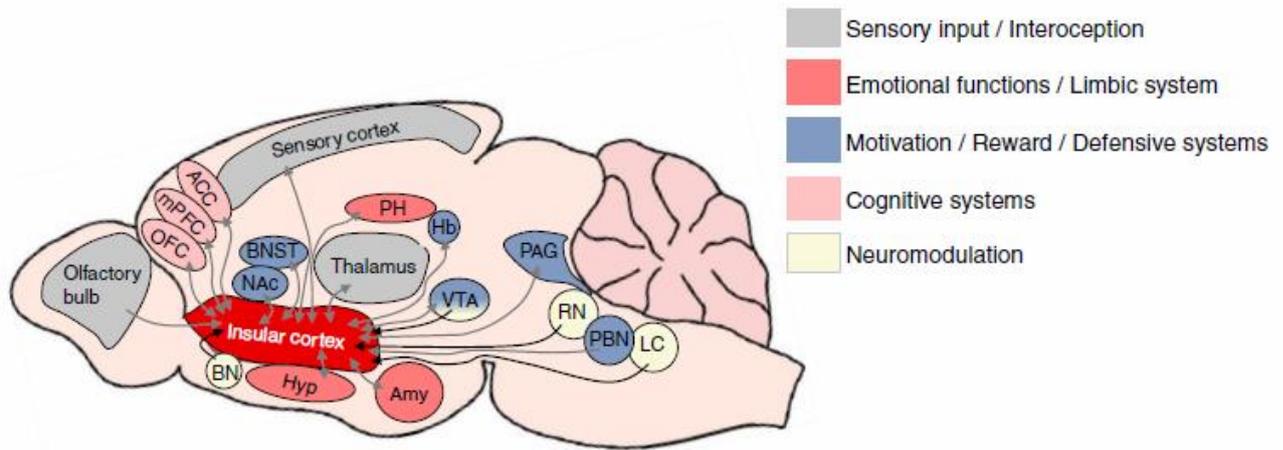


Fig 4: Connectivité du cortex insulaire dans le cerveau rongeur. Adapté de Gogolla N, 2017

De façon intéressante, l'interaction bidirectionnelle avec l'amygdale est importante pour la convergence de l'information multisensorielle. En effet, au niveau de la BLA, structure impliquée dans les circuits de la peur et de la récompense, les projections anatomiques révèlent des fonctions distinctes dans le codage de la valence affective (Beyeler et al., 2018). Ainsi, les études électrophysiologiques ont montré l'implication des neurones de cette région dans la réponse aux stimuli de valeur positive et négative (Shabel and Janak, 2009). Les neurones de la BLA projetant sur le Nac répondent de façon préférentielle aux stimuli à valence émotionnelle positive (Namburi et al., 2015) alors que ceux projetant vers le noyau central de l'amygdale (CeA) sont plutôt impliqués dans le codage affectif aversif (Beyeler et al., 2016). La densité de ces neurones est inégalement distribuée au sein de la BLA, avec des préférences de localisations (Beyeler et al., 2018). L'intégration qu'on mesure dans notre modèle est globale et ne permet pas de disséquer les différences provenant de la modulation des sous-ensembles, ni de démontrer la coexistence ou la monopolisation du signal positif et/ou négatif dans nos structures quantifiées.

Perspectives et conclusions

La neurobiologie du renforcement conditionné par les drogues a été bien étudiée (Cador et al., 1991; Everitt et al., 1991; Kelley and Delfs, 1991); les modèles futurs doivent se concentrer plus sur la neurobiologie du renforcement sensoriel, surtout avec la nicotine, qui reste un composé intrigant entre ses effets pharmacologiques et ses effets sensoriels dans les produits du tabac.

L'attractivité accrue des e-cig en termes de saveurs et parfums disponibles pourrait aider à la réduction du tabagisme chez les fumeurs de cigarettes. Cependant, cette nouvelle manière de consommer les produits contenant de la nicotine pourrait également contribuer à d'autres risques en facilitant l'initiation et en augmentant l'intensité de la consommation des produits du tabac. Nos études appuient le fait que, associée à des saveurs, la nicotine devient plus palatable ce qui pourrait être à l'origine d'un changement motivationnel : le stimulus aversif ne serait plus évité mais au

contraire deviendrait attractif. Les e-cig et les appareils « heat not burnt tobacco » délivrant de la nicotine sont commercialisés en partie dans le but de remplacer la cigarette conventionnelle. Les formulations à bases d'additifs utilisées dans ces produits masquent le goût de la nicotine déposée en aérosol dans la bouche.

En continuité des travaux présentés dans ce travail de thèse, il serait intéressant de s'orienter vers le développement de modèles animaux de la e-cig. En effet, de plus en plus d'études utilisent le paradigme d'exposition passive à la fumée de cigarette (de la Pena et al., 2014; George et al., 2010; Small et al., 2010) afin de modéliser la prise par inhalation chez l'humain. Ces modèles évaluent les effets par administration passive chez les rongeurs et non pas la consommation volontaire ; ainsi, ils montrent que l'exposition passive à la fumée de cigarette, surtout durant la période de l'adolescence chez le rat, augmente la sensibilité aux effets récompensants de la nicotine à l'âge adulte, même après une longue période d'abstinence (de la Pena et al., 2015). Ce mode d'exposition déclenche une dépendance au tabac, avec un syndrome de sevrage précipité par la mécamylamine, taux de nicotine sanguine actifs chez le rongeurs et des altérations physiologiques et comportementales (George et al., 2010; Ponzoni et al., 2015; Small et al., 2010). De même, l'exposition intermittente à la vapeur contenant la nicotine a augmenté le comportement d'auto-administration de nicotine en chambre opérante et a induit une dépendance et une escalade du comportement avec un syndrome de sevrage précipité robuste (Gilpin et al., 2014). Cette exposition passive à la vapeur durant la période d'adolescence a facilité l'auto-administration intraveineuse de nicotine chez les rats à l'âge adulte (Kallupi et al., 2019). Les modèles volontaires d'inhalation ou de vapotage chez les rongeurs sont rares, voire n'existent pas encore pour pouvoir mimer la consommation humaine. Néanmoins, l'exposition à la nicotine par des aérosols e-vapor chez les rats a montré une augmentation de l'activité locomotrice et une baisse de la température corporelle, effets supprimés par un prétraitement à la mécamylamine (Javadi-Paydar et al., 2019). De même, ce type d'exposition a montré des taux de nicotine et de cotinine compatible à l'exposition chez le fumeur, avec l'apparition d'un syndrome de sevrage à l'arrêt de l'exposition (Montanari et al., 2019- bioRxiv). Ainsi, l'exposition a induit des comportements de types addictifs associés également à des anomalies cardiopulmonaires chez les rats (Smith et al., 2019- BioRxiv). Ces données mettent en doute l'innocuité des produits de vapotage et le profil de « *safe devices* » qui est associé à ces nouveaux produits est de plus en plus controversé. Des études in vitro sur des cellules épithéliales de bronches humaines et in vivo chez la brebis, montrent que l'aérosol d'e-cig contenant la nicotine provoque un dysfonctionnement mucociliaire des voies respiratoires, probablement médiés par les Rs TRPA1 (Chung et al., 2019). De même, les vapeurs de l'e-cig produisent un stade inflammatoire dépendant de la nicotine au niveau des macrophages alvéolaires humains in vitro (Scott et al., 2018).

Très récemment dans notre équipe, un système de vapotage dans un paradigme de conditionnement de place préférée chez la souris a été mis en place. L'exploitation de ce dispositif permettra de répondre aux questions concernant la validité d'exposition à la vapeur d'e-cig en présence ou non de saveurs et/ou de nicotine. Ceci est fait dans des perspectives d'analyse des paramètres comportementaux et neurobiologiques de l'addiction.

Par ailleurs, il est connu que l'expérience des pairs semble influencer l'entrée dans les comportements consommatoires de drogue, et plus spécifiquement de produits du tabac. Nous avons donc commencé à investiguer l'effet de la transmission sociale de la valeur émotionnelle par interaction orofaciale entre congénères sur le comportement de réactivité gustative. Notre hypothèse est qu'une expérience positive de la nicotine à travers son association à un mélange fortement palatable transmettrait une valeur positive, qui serait alors exprimée chez la souris receveuse par plus de réactions hédoniques lors de l'expérience de la nicotine seule après interaction sociale. Et inversement, une expérience déplaisante transmettrait une valeur encore plus aversive de la nicotine. Les facteurs sociaux constituent une vulnérabilité à l'addiction à la nicotine (Pina et al., 2018). Des études montrent que l'interaction sociale par contact orofacial chez les rats adolescents a augmenté l'auto-administration intraveineuse de nicotine (Chen et al., 2011a). De plus, chez les rats adolescents, le conditionnement de préférence de place de la nicotine est augmenté par la présence d'un pair, suggérant que cette interaction augmente la valeur affective de l'usage de la drogue (Thiel et al., 2009). Le partage de l'expérience affective avec les drogues semble moduler le comportement vis à vis de celles-ci (Pelloux et al., 2019), surtout lors de l'interaction avec les pairs, durant la période développementale critique de l'adolescence. Jusqu'à présent, aucune étude n'a examiné le rôle de la transmission sociale via le modèle d'étude de la réactivité gustative de la nicotine et des saveurs des e-liquides.

Pour étayer les mécanismes neurobiologiques, il s'agira de mener des études de marquage spécifique des sous-ensembles neuronaux au niveau de la même région serait de nécessité ; Ceci permettra éventuellement de mettre en évidence les différences de valeur affective traduite par l'amélioration de palatabilité et de la perception affective de la nicotine couplée à l'arôme par rapport à la nicotine seule en réactivité gustative. Une fois les mécanismes du codage affinés, des manipulations optogénétiques des structures impliquées dans le codage de la valeur émotionnelles confirmeront la dissection des circuits centraux menant aux comportements.

En conclusion, ce travail de thèse démontre que l'association simultanée de la nicotine et des additifs aromatiques par voie orale permet le développement des stades du processus addictif et leur maintien. De façon très surprenante, ces additifs ont des effets renforçateurs par eux-mêmes, quand ils ne sont pas couplés à la nicotine. De plus, nous avons pu démontrer l'effet de la mutation

TRPV1 dans la promotion de la consommation orale de nicotine par diminution de son aspect aversif oral. Enfin, l'ajout des additifs augmente la palatabilité de la nicotine mais nous n'avons pas pu démontrer à ce jour une altération du codage neuronal de la valeur affective par rapport à la nicotine seule. Néanmoins, l'effet nicotine a été observé au sein des structures cérébrales après une seule injection intraorale ponctuelle, ce qui valide la transmission des effets oraux en effets centraux de la nicotine.

Notre travail est fondé sur un état des lieux quant au développement des nouvelles addictions à la nicotine. Nous avons pu répondre à plusieurs questions mais la question ultime pratique reste : est-ce que les nouveaux produits du tabac aident les fumeurs à arrêter de fumer (Lam and West, 2015; McRobbie et al., 2014) ou est-ce qu'ils attirent de nouveaux utilisateurs de nicotine par leur profil d'objets de mode ?

Bibliographie

- Acs, G., Palkovits, M., and Blumberg, P.M. (1996). Specific binding of [3H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci* 59, 1899-1908.
- Adamczyk, P., Miszkiel, J., McCreary, A.C., Filip, M., Papp, M., and Przegalinski, E. (2012). The effects of cannabinoid CB1, CB2 and vanilloid TRPV1 receptor antagonists on cocaine addictive behavior in rats. *Brain Res* 1444, 45-54.
- Adriani, W., Deroche-Gamonet, V., Le Moal, M., Laviola, G., and Piazza, P.V. (2006). Preexposure during or following adolescence differently affects nicotine-rewarding properties in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 382-390.
- Adriani, W., Granstrem, O., Macri, S., Izykenova, G., Dambinova, S., and Laviola, G. (2004). Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 29, 869-878.
- Adriani, W., Macri, S., Pacifici, R., and Laviola, G. (2002a). Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 27, 212-224.
- Adriani, W., Macri, S., Pacifici, R., and Laviola, G. (2002b). Restricted daily access to water and voluntary nicotine oral consumption in mice: methodological issues and individual differences. *Behav Brain Res* 134, 21-30.
- Adriani, W., Spijker, S., Deroche-Gamonet, V., Laviola, G., Le Moal, M., Smit, A.B., and Piazza, P.V. (2003). Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J Neurosci* 23, 4712-4716.
- Ahijevych, K., and Garrett, B.E. (2004). Menthol pharmacology and its potential impact on cigarette smoking behavior. *Nicotine Tob Res* 6 Suppl 1, S17-28.
- Ahijevych, K., and Garrett, B.E. (2010). The role of menthol in cigarettes as a reinforcer of smoking behavior. *Nicotine Tob Res* 12 Suppl 2, S110-116.
- Ahmed, S.H. (2010). Validation crisis in animal models of drug addiction: beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 172-184.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89, 73-120.
- Alimohammadi, H., and Silver, W.L. (2000). Evidence for nicotinic acetylcholine receptors on nasal trigeminal nerve endings of the rat. *Chem Senses* 25, 61-66.
- Allem, J.P., Dharmapuri, L., Unger, J.B., and Cruz, T.B. (2018). Characterizing JUUL-related posts on Twitter. *Drug Alcohol Depend* 190, 1-5.
- Alsharari, S.D., King, J.R., Nordman, J.C., Muldoon, P.P., Jackson, A., Zhu, A.Z., Tyndale, R.F., Kabbani, N., and Damaj, M.I. (2015). Effects of Menthol on Nicotine Pharmacokinetic, Pharmacology and Dependence in Mice. *PLoS One* 10, e0137070.
- Alsharari, S.D., Siu, E.C., Tyndale, R.F., and Damaj, M.I. (2014). Pharmacokinetic and pharmacodynamics studies of nicotine after oral administration in mice: effects of methoxsalen, a CYP2A5/6 inhibitor. *Nicotine Tob Res* 16, 18-25.
- Ambrose, B.K., Day, H.R., Rostron, B., Conway, K.P., Borek, N., Hyland, A., and Villanti, A.C. (2015). Flavored Tobacco Product Use Among US Youth Aged 12-17 Years, 2013-2014. *JAMA* 314, 1871-1873.
- Anderson, A.K., Christoff, K., Stappen, I., Panitz, D., Ghahremani, D.G., Glover, G., Gabrieli, J.D., and Sobel, N. (2003). Dissociated neural representations of intensity and valence in human olfaction. *Nat Neurosci* 6, 196-202.
- Anseloni, V.C., Ren, K., Dubner, R., and Ennis, M. (2005). A brainstem substrate for analgesia elicited by intraoral sucrose. *Neuroscience* 133, 231-243.
- Anthony, J.C., Warner, L.A., and Kessler, R.C. (1994). Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances and inhalants. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 2, 244-268.
- Antolin-Fontes, B., Ables, J.L., Gorlich, A., and Ibanez-Tallon, I. (2015). The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology* 96, 213-222.
- Arendt Nielsen, T., Nielsen, B.P., Wang, K., Arendt-Nielsen, L., and Boudreau, S.A. (2016). Psychophysical and Vasomotor Responses of the Oral Tissues: A Nicotine Dose-Response and Menthol Interaction Study. *Nicotine Tob Res* 18, 596-603.
- Armitage, A.K., Dollery, C.T., George, C.F., Houseman, T.H., Lewis, P.J., and Turner, D.M. (1975). Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J* 4, 313-316.
- Armstrong, J.E., Laing, D.G., and Jinks, A.L. (2017). Taste-Elicited Activity in Facial Muscle Regions in 5-8-Week-Old Infants. *Chem Senses* 42, 443-453.

Ashoor, A., Nordman, J.C., Veltri, D., Yang, K.H., Al Kury, L., Shuba, Y., Mahgoub, M., Howarth, F.C., Sadek, B., Shehu, A., *et al.* (2013). Menthol binding and inhibition of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 8, e67674.

Audrain-McGovern, J., Strasser, A.A., and Wileyto, E.P. (2016). The impact of flavoring on the rewarding and reinforcing value of e-cigarettes with nicotine among young adult smokers. *Drug Alcohol Depend* 166, 263-267.

Avelar, A.J., Akers, A.T., Baumgard, Z.J., Cooper, S.Y., Casinelli, G.P., and Henderson, B.J. (2019). Why flavored vape products may be attractive: Green apple tobacco flavor elicits reward-related behavior, upregulates nAChRs on VTA dopamine neurons, and alters midbrain dopamine and GABA neuron function. *Neuropharmacology* 158, 107729.

Baliki, M.N., Geha, P.Y., Fields, H.L., and Apkarian, A.V. (2010). Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. *Neuron* 66, 149-160.

Balleine, B.W. (2005). Neural bases of food-seeking: affect, arousal and reward in corticostriatal limbic circuits. *Physiol Behav* 86, 717-730.

Balleine, B.W., Espinet, A., and Gonzalez, F. (2005). Perceptual learning enhances retrospective revaluation of conditioned flavor preferences in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 31, 341-350.

Barrington-Trimis, J.L., Samet, J.M., and McConnell, R. (2014). Flavorings in electronic cigarettes: an unrecognized respiratory health hazard? *JAMA* 312, 2493-2494.

Bartoshuk, L.M. (2000). Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chem Senses* 25, 447-460.

Bartoshuk, L.M., and Cleveland, C.T. (1977). Mixtures of substances with similar tastes. A test of a psychophysical model of taste mixture interactions. *Sens Processes* 1, 177-186.

Bartra, O., McGuire, J.T., and Kable, J.W. (2013). The valuation system: a coordinate-based meta-analysis of BOLD fMRI experiments examining neural correlates of subjective value. *Neuroimage* 76, 412-427.

Bate-Smith, E.C. (1968). Odour qualities: a glossary of usage. *Br J Psychol* 59, 231-252.

Baylis, L.L., Rolls, E.T., and Baylis, G.C. (1995). Afferent connections of the caudolateral orbitofrontal cortex taste area of the primate. *Neuroscience* 64, 801-812.

Beauchamp, G.K., and Moran, M. (1984). Acceptance of sweet and salty tastes in 2-year-old children. *Appetite* 5, 291-305.

Beckers, A.B., Weerts, Z., Helyes, Z., Masclee, A.A.M., and Keszthelyi, D. (2017). Review article: transient receptor potential channels as possible therapeutic targets in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 46, 938-952.

Beckstead, R.M., Morse, J.R., and Norgren, R. (1980). The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *J Comp Neurol* 190, 259-282.

Behar, R.Z., Davis, B., Wang, Y., Bahl, V., Lin, S., and Talbot, P. (2014). Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol In Vitro* 28, 198-208.

Belluzzi, J.D., Lee, A.G., Oliff, H.S., and Leslie, F.M. (2004). Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 174, 389-395.

Belluzzi, J.D., Wang, R., and Leslie, F.M. (2005). Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 705-712.

Belova, M.A., Paton, J.J., Morrison, S.E., and Salzman, C.D. (2007). Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. *Neuron* 55, 970-984.

Benowitz, N.L. (1990). Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence. *Ciba Found Symp* 152, 186-200; discussion 200-189.

Benowitz, N.L. (1996). Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 597-613.

Benowitz, N.L. (1999). The biology of nicotine dependence: from the 1988 Surgeon General's Report to the present and into the future. *Nicotine Tob Res* 1 Suppl 2, S159-163.

Benowitz, N.L. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83, 531-541.

Benowitz, N.L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 57-71.

Benowitz, N.L. (2010). Nicotine addiction. *N Engl J Med* 362, 2295-2303.

Benowitz, N.L., and Fraiman, J.B. (2017). Cardiovascular effects of electronic cigarettes. *Nat Rev Cardiol* 14, 447-456.

Benowitz, N.L., Herrera, B., and Jacob, P., 3rd (2004). Mentholated cigarette smoking inhibits nicotine metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 1208-1215.

Benowitz, N.L., Hukkanen, J., and Jacob, P., 3rd (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*, 29-60.

Benowitz, N.L., and Jacob, P., 3rd (1994). Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther* 56, 483-493.

Benowitz, N.L., Jacob, P., 3rd, Fong, I., and Gupta, S. (1994). Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 268, 296-303.

Benwell, M.E., and Balfour, D.J. (1992). The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol* 105, 849-856.

Bereiter, D.A., Berthoud, H.R., and Jeanrenaud, B. (1981). Chorda tympani and vagus nerve convergence onto caudal brain stem neurons in the rat. *Brain Res Bull* 7, 261-266.

Bergstrom, M., Nordberg, A., Lunell, E., Antoni, G., and Langstrom, B. (1995). Regional deposition of inhaled ¹¹C-nicotine vapor in the human airway as visualized by positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther* 57, 309-317.

Berkelhamer, S.K., Helman, J.M., Gugino, S.F., Leigh, N.J., Lakshminrusimha, S., and Goniewicz, M.L. (2019). In Vitro Consequences of Electronic-Cigarette Flavoring Exposure on the Immature Lung. *Int J Environ Res Public Health* 16.

Bermudez-Rattoni, F., Grijalva, C.V., Kiefer, S.W., and Garcia, J. (1986). Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol Behav* 38, 503-508.

Bermudez-Rattoni, F., Ramirez-Lugo, L., Gutierrez, R., and Miranda, M.I. (2004). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cell Mol Neurobiol* 24, 25-36.

Bermudez-Rattoni, F., Rusiniak, K.W., and Garcia, J. (1983). Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behav Neural Biol* 37, 61-75.

Bernhardt, B.C., and Singer, T. (2012). The neural basis of empathy. *Annu Rev Neurosci* 35, 1-23.

Berridge, K., Grill, H.J., and Norgren, R. (1981). Relation of consummatory responses and preabsorptive insulin release to palatability and learned taste aversions. *J Comp Physiol Psychol* 95, 363-382.

Berridge, K.C. (1996). Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 1-25.

Berridge, K.C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 173-198.

Berridge, K.C. (2009). 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 97, 537-550.

Berridge, K.C. (2019). Affective valence in the brain: modules or modes? *Nat Rev Neurosci* 20, 225-234.

Berridge, K.C., Flynn, F.W., Schulkin, J., and Grill, H.J. (1984). Sodium depletion enhances salt palatability in rats. *Behav Neurosci* 98, 652-660.

Berridge, K.C., and Grill, H.J. (1983). Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behav Neurosci* 97, 563-573.

Berridge, K.C., and Kringelbach, M.L. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron* 86, 646-664.

Berridge, K.C., and Robinson, T.E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28, 309-369.

Berridge, K.C., Robinson, T.E., and Aldridge, J.W. (2009). Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9, 65-73.

Berridge, M.S., Apana, S.M., Nagano, K.K., Berridge, C.E., Leisure, G.P., and Boswell, M.V. (2010). Smoking produces rapid rise of [¹¹C]nicotine in human brain. *Psychopharmacology (Berl)* 209, 383-394.

Berta, B., Kertes, E., Peczely, L., Ollmann, T., Laszlo, K., Galosi, R., Kallai, V., Petyko, Z., Zagoracz, O., Kovacs, A., *et al.* (2019). Ventromedial prefrontal cortex is involved in preference and hedonic evaluation of tastes. *Behav Brain Res* 367, 149-157.

Bertin, S., Aoki-Nonaka, Y., de Jong, P.R., Nohara, L.L., Xu, H., Stanwood, S.R., Srikanth, S., Lee, J., To, K., Abramson, L., *et al.* (2014). The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 15, 1055-1063.

Beyeler, A. (2016). Parsing reward from aversion. *Science* 354, 558.

Beyeler, A., Chang, C.J., Silvestre, M., Leveque, C., Namburi, P., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2018). Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell Rep* 22, 905-918.

Beyeler, A., Namburi, P., Globler, G.F., Simonnet, C., Calhoun, G.G., Conyers, G.F., Luck, R., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2016). Divergent Routing of Positive and Negative Information from the Amygdala during Memory Retrieval. *Neuron* 90, 348-361.

Biondolillo, K., Pearce, A.R., Louder, M.C., and McMickle, A. (2009). Solution concentration influences voluntary consumption of nicotine under multiple bottle conditions. *Pharmacol Biochem Behav* 92, 214-218.

Biswas, L., Harrison, E., Gong, Y., Avusula, R., Lee, J., Zhang, M., Rousselle, T., Lage, J., and Liu, X. (2016). Enhancing effect of menthol on nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 3417-3427.

Blankenship, M.L., Grigorova, M., Katz, D.B., and Maier, J.X. (2019). Retronasal Odor Perception Requires Taste Cortex, but Orthonasal Does Not. *Curr Biol* 29, 62-69 e63.

Blednov, Y.A., and Harris, R.A. (2009). Deletion of vanilloid receptor (TRPV1) in mice alters behavioral effects of ethanol. *Neuropharmacology* 56, 814-820.

- Boffetta, P., Hecht, S., Gray, N., Gupta, P., and Straif, K. (2008). Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 9, 667-675.
- Boffetta, P., and Straif, K. (2009). Use of smokeless tobacco and risk of myocardial infarction and stroke: systematic review with meta-analysis. *BMJ* 339, b3060.
- Bold, K.W., Kong, G., Cavallo, D.A., Camenga, D.R., and Krishnan-Sarin, S. (2016). Reasons for Trying E-cigarettes and Risk of Continued Use. *Pediatrics* 138.
- Bolliger, C.T., van Bijljon, X., and Axelsson, A. (2007). A nicotine mouth spray for smoking cessation: a pilot study of preference, safety and efficacy. *Respiration* 74, 196-201.
- Booth, D.A. (1972). Taste reactivity in starved, ready to eat and recently fed rats. *Physiol Behav* 8, 901-908.
- Booth, D.A., Mather, P., and Fuller, J. (1982). Starch content of ordinary foods associatively conditions human appetite and satiation, indexed by intake and eating pleasantness of starch-paired flavours. *Appetite* 3, 163-184.
- Boucher, Y., Simons, C.T., Faurion, A., Azerad, J., and Carstens, E. (2003). Trigeminal modulation of gustatory neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 973, 265-274.
- Breslau, N. (1995). Psychiatric comorbidity of smoking and nicotine dependence. *Behav Genet* 25, 95-101.
- Breslau, N., Johnson, E.O., Hiripi, E., and Kessler, R. (2001). Nicotine dependence in the United States: prevalence, trends, and smoking persistence. *Arch Gen Psychiatry* 58, 810-816.
- Brining, S.K., Belecky, T.L., and Smith, D.V. (1991). Taste reactivity in the hamster. *Physiol Behav* 49, 1265-1272.
- Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., and Bonci, A. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76, 790-803.
- Brody, A.L., Olmstead, R.E., London, E.D., Farahi, J., Meyer, J.H., Grossman, P., Lee, G.S., Huang, J., Hahn, E.L., and Mandelkern, M.A. (2004). Smoking-induced ventral striatum dopamine release. *Am J Psychiatry* 161, 1211-1218.
- Bromberg-Martin, E.S., and Hikosaka, O. (2011). Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci* 14, 1209-1216.
- Brunzell, D.H., Chang, J.R., Schneider, B., Olausson, P., Taylor, J.R., and Picciotto, M.R. (2006). beta2-Subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are involved in nicotine-induced increases in conditioned reinforcement but not progressive ratio responding for food in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 328-338.
- Burgos-Robles, A., Kimchi, E.Y., Izadmehr, E.M., Porzenheim, M.J., Ramos-Guasp, W.A., Nieh, E.H., Felix-Ortiz, A.C., Namburi, P., Leppla, C.A., Presbrey, K.N., *et al.* (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat Neurosci* 20, 824-835.
- Cador, M., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (1989). Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30, 77-86.
- Cador, M., Taylor, J.R., and Robbins, T.W. (1991). Potentiation of the effects of reward-related stimuli by dopaminergic-dependent mechanisms in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 377-385.
- Caggiula, A.R., Donny, E.C., Chaudhri, N., Perkins, K.A., Evans-Martin, F.F., and Sved, A.F. (2002). Importance of nonpharmacological factors in nicotine self-administration. *Physiol Behav* 77, 683-687.
- Caggiula, A.R., Donny, E.C., Palmatier, M.I., Liu, X., Chaudhri, N., and Sved, A.F. (2009). The role of nicotine in smoking: a dual-reinforcement model. *Nebr Symp Motiv* 55, 91-109.
- Caggiula, A.R., Donny, E.C., White, A.R., Chaudhri, N., Booth, S., Gharib, M.A., Hoffman, A., Perkins, K.A., and Sved, A.F. (2001). Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 515-530.
- Cagniard, B., Balsam, P.D., Brunner, D., and Zhuang, X. (2006). Mice with chronically elevated dopamine exhibit enhanced motivation, but not learning, for a food reward. *Neuropsychopharmacology* 31, 1362-1370.
- Cagniard, B., and Murphy, N.P. (2009). Taste reactivity and its modulation by morphine and methamphetamine in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Physiol Behav* 96, 412-420.
- Caille, S., Guillem, K., Cador, M., Manzoni, O., and Georges, F. (2009). Voluntary nicotine consumption triggers in vivo potentiation of cortical excitatory drives to midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 29, 10410-10415.
- Cain, M.E., Saucier, D.A., and Bardo, M.T. (2005). Novelty seeking and drug use: contribution of an animal model. *Exp Clin Psychopharmacol* 13, 367-375.
- Cain, W.S. (1974). Contribution of the trigeminal nerve to perceived odor magnitude. *Ann N Y Acad Sci* 237, 28-34.
- Caldarone, B.J., King, S.L., and Picciotto, M.R. (2008). Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following chronic nicotine exposure in mice. *Neurosci Lett* 439, 187-191.
- Cannon, C.M., and Palmiter, R.D. (2003). Reward without dopamine. *J Neurosci* 23, 10827-10831.
- Cao, J., Belluzzi, J.D., Loughlin, S.E., Keyler, D.E., Pentel, P.R., and Leslie, F.M. (2007). Acetaldehyde, a major constituent of tobacco smoke, enhances behavioral, endocrine, and neuronal responses to nicotine in adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 2025-2035.

Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Hall, J., and Everitt, B.J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 321-352.

Carmelli, D., Swan, G.E., Robinette, D., and Fabsitz, R. (1992). Genetic influence on smoking--a study of male twins. *N Engl J Med* 327, 829-833.

Carmichael, S.T., Clugnet, M.C., and Price, J.L. (1994). Central olfactory connections in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 346, 403-434.

Carnevale, R., Sciarretta, S., Violi, F., Nocella, C., Loffredo, L., Perri, L., Peruzzi, M., Marullo, A.G., De Falco, E., Chimenti, I., *et al.* (2016). Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function. *Chest* 150, 606-612.

Carpenter, C.M., Wayne, G.F., Pauly, J.L., Koh, H.K., and Connolly, G.N. (2005). New cigarette brands with flavors that appeal to youth: tobacco marketing strategies. *Health Aff (Millwood)* 24, 1601-1610.

Carroll, M.E., Anker, J.J., and Perry, J.L. (2009). Modeling risk factors for nicotine and other drug abuse in the preclinical laboratory. *Drug Alcohol Depend* 104 Suppl 1, S70-78.

Carroll, M.E., Morgan, A.D., Anker, J.J., Perry, J.L., and Dess, N.K. (2008). Selective breeding for differential saccharin intake as an animal model of drug abuse. *Behav Pharmacol* 19, 435-460.

Carstens, E., Kuenzler, N., and Handwerker, H.O. (1998). Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. *J Neurophysiol* 80, 465-492.

Carstens, E., Simons, C.T., Dessirier, J.M., Carstens, M.I., and Jinks, S.L. (2000). Role of neuronal nicotinic-acetylcholine receptors in the activation of neurons in trigeminal subnucleus caudalis by nicotine delivered to the oral mucosa. *Exp Brain Res* 132, 375-383.

Carter, L.P., Stitzer, M.L., Henningfield, J.E., O'Connor, R.J., Cummings, K.M., and Hatsukami, D.K. (2009). Abuse liability assessment of tobacco products including potential reduced exposure products. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 3241-3262.

Caruana, F., Jezzini, A., Sbriscia-Fioretti, B., Rizzolatti, G., and Gallese, V. (2011). Emotional and social behaviors elicited by electrical stimulation of the insula in the macaque monkey. *Curr Biol* 21, 195-199.

Caruso, M.J., Reiss, D.E., Caulfield, J.I., Thomas, J.L., Baker, A.N., Cavigelli, S.A., and Kamens, H.M. (2018). Adolescent chronic variable social stress influences exploratory behavior and nicotine responses in male, but not female, BALB/cJ mice. *Brain Res Bull* 138, 37-49.

Castro, D.C., and Berridge, K.C. (2014). Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. *Physiol Behav* 136, 22-30.

Castro, D.C., Terry, R.A., and Berridge, K.C. (2016). Orexin in Rostral Hotspot of Nucleus Accumbens Enhances Sucrose 'Liking' and Intake but Scopolamine in Caudal Shell Shifts 'Liking' Toward 'Disgust' and 'Fear'. *Neuropsychopharmacology* 41, 2101-2111.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Chambers, R.A., and Potenza, M.N. (2003). Neurodevelopment, impulsivity, and adolescent gambling. *J Gambl Stud* 19, 53-84.

Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288-294.

Changeux, J.P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 11, 389-401.

Changeux, J.P., Bertrand, D., Corringier, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M., and Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 198-216.

Chaudhri, N., Caggiula, A.R., Donny, E.C., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., Palmatier, M.I., Liu, X., and Sved, A.F. (2006a). Operant responding for conditioned and unconditioned reinforcers in rats is differentially enhanced by the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 189, 27-36.

Chaudhri, N., Caggiula, A.R., Donny, E.C., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., Palmatier, M.I., Liu, X., and Sved, A.F. (2007). Self-administered and noncontingent nicotine enhance reinforced operant responding in rats: impact of nicotine dose and reinforcement schedule. *Psychopharmacology (Berl)* 190, 353-362.

Chaudhri, N., Caggiula, A.R., Donny, E.C., Booth, S., Gharib, M.A., Craven, L.A., Allen, S.S., Sved, A.F., and Perkins, K.A. (2005). Sex differences in the contribution of nicotine and nonpharmacological stimuli to nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 258-266.

Chaudhri, N., Caggiula, A.R., Donny, E.C., Palmatier, M.I., Liu, X., and Sved, A.F. (2006b). Complex interactions between nicotine and nonpharmacological stimuli reveal multiple roles for nicotine in reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 353-366.

Chaudhri, N., Woods, C.A., Sahuque, L.L., Gill, T.M., and Janak, P.H. (2013). Unilateral inactivation of the basolateral amygdala attenuates context-induced renewal of Pavlovian-conditioned alcohol-seeking. *Eur J Neurosci* 38, 2751-2761.

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

Chen, H., Sharp, B.M., Matta, S.G., and Wu, Q. (2011a). Social interaction promotes nicotine self-administration with olfactogustatory cues in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 36, 2629-2638.

Chen, R., Aherrera, A., Isichei, C., Olmedo, P., Jarmul, S., Cohen, J.E., Navas-Acien, A., and Rule, A.M. (2018). Assessment of indoor air quality at an electronic cigarette (Vaping) convention. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 28, 522-529.

Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2011b). A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. *Science* 333, 1262-1266.

Cheng, J., Wang, J., Ma, X., Ullah, R., Shen, Y., and Zhou, Y.D. (2018). Anterior Paraventricular Thalamus to Nucleus Accumbens Projection Is Involved in Feeding Behavior in a Novel Environment. *Front Mol Neurosci* 11, 202.

Cheng, T. (2014). Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob Control* 23 Suppl 2, ii11-17.

Chiamulera, C., Borgo, C., Falchetto, S., Valerio, E., and Tessari, M. (1996). Nicotine reinstatement of nicotine self-administration after long-term extinction. *Psychopharmacology (Berl)* 127, 102-107.

Choi, J.H., Dresler, C.M., Norton, M.R., and Strahs, K.R. (2003). Pharmacokinetics of a nicotine polacrilex lozenge. *Nicotine Tob Res* 5, 635-644.

Choi, K., Fabian, L., Mottey, N., Corbett, A., and Forster, J. (2012). Young adults' favorable perceptions of snus, dissolvable tobacco products, and electronic cigarettes: findings from a focus group study. *Am J Public Health* 102, 2088-2093.

Cinque, S., Zoratto, F., Poleggi, A., Leo, D., Cerniglia, L., Cimino, S., Tambelli, R., Alleva, E., Gainetdinov, R.R., Laviola, G., *et al.* (2018). Behavioral Phenotyping of Dopamine Transporter Knockout Rats: Compulsive Traits, Motor Stereotypies, and Anhedonia. *Front Psychiatry* 9, 43.

Clemens, K.J., Caille, S., and Cador, M. (2010). The effects of response operandum and prior food training on intravenous nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 211, 43-54.

Clemens, K.J., Caille, S., Stinus, L., and Cador, M. (2009). The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 1355-1366.

Cohen, C., Perrault, G., Griebel, G., and Soubrie, P. (2005). Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). *Neuropsychopharmacology* 30, 145-155.

Collins, A.C., Miner, L.L., and Marks, M.J. (1988). Genetic influences on acute responses to nicotine and nicotine tolerance in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 30, 269-278.

Connolly, C.N., and Wafford, K.A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32, 529-534.

Cooke, W.H., Pokhrel, A., Dowling, C., Fogt, D.L., and Rickards, C.A. (2015). Acute inhalation of vaporized nicotine increases arterial pressure in young non-smokers: a pilot study. *Clin Auton Res* 25, 267-270.

Corrigall, W.A., Coen, K.M., and Adamson, K.L. (1994). Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res* 653, 278-284.

Corrigall, W.A., Franklin, K.B., Coen, K.M., and Clarke, P.B. (1992). The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 107, 285-289.

Cortright, D.N., Crandall, M., Sanchez, J.F., Zou, T., Krause, J.E., and White, G. (2001). The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1183-1189.

Cossu, G., Ledent, C., Fattore, L., Imperato, A., Bohme, G.A., Parmentier, M., and Fratta, W. (2001). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* 118, 61-65.

Counotte, D.S., Spijker, S., Van de Burgwal, L.H., Hogenboom, F., Schoffemeer, A.N., De Vries, T.J., Smit, A.B., and Pattij, T. (2009). Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats. *Neuropsychopharmacology* 34, 299-306.

Cousens, G., and Otto, T. (1998). Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112, 1092-1103.

Craig, A.D. (2009). How do you feel--now? The anterior insula and human awareness. *Nat Rev Neurosci* 10, 59-70.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405-1415.

Critchley, H.D., and Rolls, E.T. (1996). Olfactory neuronal responses in the primate orbitofrontal cortex: analysis in an olfactory discrimination task. *J Neurophysiol* 75, 1659-1672.

Critchley, H.D., Rotshtein, P., Nagai, Y., O'Doherty, J., Mathias, C.J., and Dolan, R.J. (2005). Activity in the human brain predicting differential heart rate responses to emotional facial expressions. *Neuroimage* 24, 751-762.

Critchley, H.D., Wiens, S., Rotshtein, P., Ohman, A., and Dolan, R.J. (2004). Neural systems supporting interoceptive awareness. *Nat Neurosci* 7, 189-195.

Cromwell, H.C., and Berridge, K.C. (1993). Where does damage lead to enhanced food aversion: the ventral pallidum/substantia innominata or lateral hypothalamus? *Brain Res* 624, 1-10.

Cruz, A., and Green, B.G. (2000). Thermal stimulation of taste. *Nature* 403, 889-892.

Cuello, A.C., Emson, P.C., Paxinos, G., and Jessell, T. (1978). Substance P containing and cholinergic projections from the habenula. *Brain Res* 149, 413-429.

Dadmarz, M., and Vogel, W.H. (2003). Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacol Biochem Behav* 76, 425-432.

Dai, H., and Hao, J. (2016). Flavored Electronic Cigarette Use and Smoking Among Youth. *Pediatrics* 138.

Dajas-Bailador, F., and Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25, 317-324.

Damann, N., Voets, T., and Nilius, B. (2008). TRPs in our senses. *Curr Biol* 18, R880-889.

Dani, J.A., and De Biasi, M. (2001). Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 439-446.

Dani, J.A., and De Biasi, M. (2013). Mesolimbic dopamine and habenulo-interpeduncular pathways in nicotine withdrawal. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3.

Dani, J.A., and Heinemann, S. (1996). Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16, 905-908.

Dani, J.A., Ji, D., and Zhou, F.M. (2001). Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron* 31, 349-352.

Datiche, F., and Cattarelli, M. (1996). Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Res Bull* 41, 391-398.

David, V., Besson, M., Changeux, J.P., Granon, S., and Cazala, P. (2006). Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic D1 receptors. *Neuropharmacology* 50, 1030-1040.

Dawkins, L.E., Kimber, C.F., Doig, M., Feyerabend, C., and Corcoran, O. (2016). Self-titration by experienced e-cigarette users: blood nicotine delivery and subjective effects. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 2933-2941.

Dayan, P., and Balleine, B.W. (2002). Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron* 36, 285-298.

de Araujo, I.E. (2009). Gustatory and homeostatic functions of the rodent parabrachial nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 383-391.

de Araujo, I.E. (2011a). Multiple Reward Layers in Food Reinforcement. In *Neurobiology of Sensation and Reward*, J.A. Gottfried, ed. (Boca Raton (FL)).

de Araujo, I.E. (2011b). Sweet taste signaling and the formation of memories of energy sources. *Front Syst Neurosci* 5, 99.

de Araujo, I.E., Kringelbach, M.L., Rolls, E.T., and McGlone, F. (2003a). Human cortical responses to water in the mouth, and the effects of thirst. *J Neurophysiol* 90, 1865-1876.

de Araujo, I.E., Lin, T., Veldhuizen, M.G., and Small, D.M. (2013). Metabolic regulation of brain response to food cues. *Curr Biol* 23, 878-883.

de Araujo, I.E., Oliveira-Maia, A.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Nicolelis, M.A., and Simon, S.A. (2008). Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron* 57, 930-941.

De Araujo, I.E., and Rolls, E.T. (2004). Representation in the human brain of food texture and oral fat. *J Neurosci* 24, 3086-3093.

de Araujo, I.E., Rolls, E.T., Kringelbach, M.L., McGlone, F., and Phillips, N. (2003b). Taste-olfactory convergence, and the representation of the pleasantness of flavour, in the human brain. *Eur J Neurosci* 18, 2059-2068.

de Araujo, I.E., Rolls, E.T., Velazco, M.I., Margot, C., and Cayeux, I. (2005). Cognitive modulation of olfactory processing. *Neuron* 46, 671-679.

de Araujo, I.E., and Simon, S.A. (2009). The gustatory cortex and multisensory integration. *Int J Obes (Lond)* 33 Suppl 2, S34-43.

De Biasi, M., and Salas, R. (2008). Influence of neuronal nicotinic receptors over nicotine addiction and withdrawal. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 917-929.

de Jong, J.W., Afjei, S.A., Pollak Dorocic, I., Peck, J.R., Liu, C., Kim, C.K., Tian, L., Deisseroth, K., and Lammel, S. (2019). A Neural Circuit Mechanism for Encoding Aversive Stimuli in the Mesolimbic Dopamine System. *Neuron* 101, 133-151 e137.

de la Pena, J.B., Ahsan, H.M., Botanas, C.J., Sohn, A., Yu, G.Y., and Cheong, J.H. (2014). Adolescent nicotine or cigarette smoke exposure changes subsequent response to nicotine conditioned place preference and self-administration. *Behav Brain Res* 272, 156-164.

de la Pena, J.B., Ahsan, H.M., Tampus, R., Botanas, C.J., dela Pena, I.J., Kim, H.J., Sohn, A., dela Pena, I., Shin, C.Y., Ryu, J.H., *et al.* (2015). Cigarette smoke exposure during adolescence enhances sensitivity to the rewarding effects of nicotine in adulthood, even after a long period of abstinence. *Neuropharmacology* 99, 9-14.

Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., and Arneric, S.P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci* 56, 545-570.

Dehkordi, O., Rose, J.E., Balan, K.V., Millis, R.M., Bhatti, B., and Jayam-Trouth, A. (2010). Co-expression of nAChRs and molecules of the bitter taste transduction pathway by epithelial cells of intrapulmonary airways. *Life Sci* 86, 281-288.

Denman, A.J., Sammons, J.D., Victor, J.D., and Di Lorenzo, P.M. (2019). Heterogeneity of neuronal responses in the nucleus of the solitary tract suggests sensorimotor integration in the neural code for taste. *J Neurophysiol* 121, 634-645.

Derby, K.S., Cuthrell, K., Caberto, C., Carmella, S.G., Franke, A.A., Hecht, S.S., Murphy, S.E., and Le Marchand, L. (2008). Nicotine metabolism in three ethnic/racial groups with different risks of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3526-3535.

Deroche-Gamonet, V., Belin, D., and Piazza, P.V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305, 1014-1017.

Desgranges, B., Ramirez-Amaya, V., Ricano-Cornejo, I., Levy, F., and Ferreira, G. (2010). Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in the basolateral amygdala but not in the insular cortex in rats. *PLoS One* 5, e10097.

Dessirier, J.M., O'Mahony, M., and Carstens, E. (1997). Oral irritant effects of nicotine: psychophysical evidence for decreased sensation following repeated application and lack of cross-desensitization to capsaicin. *Chem Senses* 22, 483-492.

Dessirier, J.M., O'Mahony, M., and Carstens, E. (1998). Oral irritant effects of nicotine. Psychophysical evidence for decreased sensation following repeated application of and lack of cross-desensitization to capsaicin. *Ann N Y Acad Sci* 855, 828-830.

Dessirier, J.M., O'Mahony, M., and Carstens, E. (2001). Oral irritant properties of menthol: sensitizing and desensitizing effects of repeated application and cross-desensitization to nicotine. *Physiol Behav* 73, 25-36.

DeVito, E.E., and Krishnan-Sarin, S. (2018). E-cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure. *Curr Neuropharmacol* 16, 438-459.

Di Chiara, G. (2000). Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur J Pharmacol* 393, 295-314.

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

Di Lorenzo, P.M., and Garcia, J. (1985). Olfactory responses in the gustatory area of the parabrachial pons. *Brain Res Bull* 15, 673-676.

Di Marzo, V., Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L., Pertwee, R., and De Petrocellis, L. (1998). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett* 436, 449-454.

Di Marzo, V., Lastres-Becker, I., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Milone, A., Davis, J.B., and Fernandez-Ruiz, J.J. (2001). Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol* 420, 123-131.

Do-Monte, F.H., Minier-Toribio, A., Quinones-Laracuate, K., Medina-Colon, E.M., and Quirk, G.J. (2017). Thalamic Regulation of Sucrose Seeking during Unexpected Reward Omission. *Neuron* 94, 388-400 e384.

Doll, R., Peto, R., Boreham, J., and Sutherland, I. (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328, 1519.

Dome, P., Lazary, J., Kalapos, M.P., and Rihmer, Z. (2010). Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 295-342.

Domino, E.F., Ni, L., Domino, J.S., Yang, W., Evans, C., Guthrie, S., Wang, H., Koeppe, R.A., and Zubieta, J.K. (2013). Denicotinized versus average nicotine tobacco cigarette smoking differentially releases striatal dopamine. *Nicotine Tob Res* 15, 11-21.

Donny, E.C., Chaudhri, N., Caggiula, A.R., Evans-Martin, F.F., Booth, S., Gharib, M.A., Clements, L.A., and Sved, A.F. (2003). Operant responding for a visual reinforcer in rats is enhanced by noncontingent nicotine: implications for nicotine self-administration and reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 169, 68-76.

Donny, E.C., Denlinger, R.L., Tidey, J.W., Koopmeiners, J.S., Benowitz, N.L., Vandrey, R.G., al'Absi, M., Carmella, S.G., Cinciripini, P.M., Dermody, S.S., *et al.* (2015). Randomized Trial of Reduced-Nicotine Standards for Cigarettes. *N Engl J Med* 373, 1340-1349.

Donny, E.C., Houtsmuller, E., and Stitzer, M.L. (2007). Smoking in the absence of nicotine: behavioral, subjective and physiological effects over 11 days. *Addiction* *102*, 324-334.

Douglass, A.M., Kucukdereli, H., Ponserre, M., Markovic, M., Grundemann, J., Strobel, C., Alcala Morales, P.L., Conzelmann, K.K., Luthi, A., and Klein, R. (2017). Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. *Nat Neurosci* *20*, 1384-1394.

Du, Q., Liao, Q., Chen, C., Yang, X., Xie, R., and Xu, J. (2019). The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Front Physiol* *10*, 1064.

Duffy, V.B., Peterson, J.M., and Bartoshuk, L.M. (2004). Associations between taste genetics, oral sensation and alcohol intake. *Physiol Behav* *82*, 435-445.

Dunbar, M.S., Shadel, W.G., Tucker, J.S., and Edelen, M.O. (2016). Use of and reasons for using multiple other tobacco products in daily and nondaily smokers: Associations with cigarette consumption and nicotine dependence. *Drug Alcohol Depend* *168*, 156-163.

Dwyer, J.B., McQuown, S.C., and Leslie, F.M. (2009). The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* *122*, 125-139.

Ebbert, J.O., Montori, V., Vickers, K.S., Erwin, P.C., Dale, L.C., and Stead, L.F. (2007). Interventions for smokeless tobacco use cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004306.

Eckenrode, T.C., Barr, G.A., Battisti, W.P., and Murray, M. (1987). Acetylcholine in the interpeduncular nucleus of the rat: normal distribution and effects of deafferentation. *Brain Res* *418*, 273-286.

Edwards, J.G. (2014). TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res* *68*, 77-104.

Einarson, T.R., and Einarson, A. (1997). Hiccups following nicotine gum use. *Ann Pharmacother* *31*, 1263-1264.

Eissenberg, T., and Balster, R.L. (2000). Initial tobacco use episodes in children and adolescents: current knowledge, future directions. *Drug Alcohol Depend* *59 Suppl 1*, S41-60.

El Dib, R., Suzumura, E.A., Akl, E.A., Gomaa, H., Agarwal, A., Chang, Y., Prasad, M., Ashoorion, V., Heels-Ansdell, D., Maziak, W., *et al.* (2017). Electronic nicotine delivery systems and/or electronic non-nicotine delivery systems for tobacco smoking cessation or reduction: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* *7*, e012680.

El Rawas, R., Thiriet, N., Lardeux, V., Jaber, M., and Solinas, M. (2009). Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. *Psychopharmacology (Berl)* *203*, 561-570.

Ellingson, J.M., Silbaugh, B.C., and Brassler, S.M. (2009). Reduced oral ethanol avoidance in mice lacking transient receptor potential channel vanilloid receptor 1. *Behav Genet* *39*, 62-72.

England, L.J., Levine, R.J., Mills, J.L., Klebanoff, M.A., Yu, K.F., and Cnattingius, S. (2003). Adverse pregnancy outcomes in snuff users. *Am J Obstet Gynecol* *189*, 939-943.

Enoch, M.A., Harris, C.R., and Goldman, D. (2001). Does a reduced sensitivity to bitter taste increase the risk of becoming nicotine addicted? *Addict Behav* *26*, 399-404.

Erythropel, H.C., Jabba, S.V., DeWinter, T.M., Mendizabal, M., Anastas, P.T., Jordt, S.E., and Zimmerman, J.B. (2019). Formation of flavorant-propylene Glycol Adducts With Novel Toxicological Properties in Chemically Unstable E-Cigarette Liquids. *Nicotine Tob Res* *21*, 1248-1258.

Escanilla, O.D., Victor, J.D., and Di Lorenzo, P.M. (2015). Odor-taste convergence in the nucleus of the solitary tract of the awake freely licking rat. *J Neurosci* *35*, 6284-6297.

Etter, J.F. (2016a). Characteristics of users and usage of different types of electronic cigarettes: findings from an online survey. *Addiction* *111*, 724-733.

Etter, J.F. (2016b). A longitudinal study of cotinine in long-term daily users of e-cigarettes. *Drug Alcohol Depend* *160*, 218-221.

Etter, J.F. (2016c). Throat hit in users of the electronic cigarette: An exploratory study. *Psychol Addict Behav* *30*, 93-100.

Etter, J.F. (2018). Gateway effects and electronic cigarettes. *Addiction* *113*, 1776-1783.

Etter, J.F., and Bullen, C. (2011). Electronic cigarette: users profile, utilization, satisfaction and perceived efficacy. *Addiction* *106*, 2017-2028.

Everitt, B.J., Morris, K.A., O'Brien, A., and Robbins, T.W. (1991). The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience* *42*, 1-18.

Fagan, P., Pokhrel, P., Herzog, T.A., Pagano, I.S., Franke, A.A., Clanton, M.S., Alexander, L.A., Trinidad, D.R., Sakuma, K.L., Johnson, C.A., *et al.* (2016). Nicotine Metabolism in Young Adult Daily Menthol and Nonmenthol Smokers. *Nicotine Tob Res* *18*, 437-446.

Fagerstrom, K. (2012). Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerstrom Test for Cigarette Dependence. *Nicotine Tob Res* *14*, 75-78.

Farrar, A.M., Font, L., Pereira, M., Mingote, S., Bunce, J.G., Chrobak, J.J., and Salamone, J.D. (2008). Forebrain circuitry involved in effort-related choice: Injections of the GABAA agonist muscimol into ventral pallidum alter response allocation in food-seeking behavior. *Neuroscience* 152, 321-330.

Farsalinos, K.E., Spyrou, A., Tsimopoulou, K., Stefopoulos, C., Romagna, G., and Voudris, V. (2014). Nicotine absorption from electronic cigarette use: comparison between first and new-generation devices. *Sci Rep* 4, 4133.

Faurion, A., Cerf, B., Le Bihan, D., and Pillias, A.M. (1998). fMRI study of taste cortical areas in humans. *Ann N Y Acad Sci* 855, 535-545.

Feirman, S.P., Lock, D., Cohen, J.E., Holtgrave, D.R., and Li, T. (2016). Flavored Tobacco Products in the United States: A Systematic Review Assessing Use and Attitudes. *Nicotine Tob Res* 18, 739-749.

Felix-Ortiz, A.C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C.A., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron* 79, 658-664.

Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C.J., and Bermudez-Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci* 22, 2596-2604.

Feyerabend, C., Ings, R.M., and Russel, M.A. (1985). Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking. *Br J Clin Pharmacol* 19, 239-247.

Fiore, M.C., and Jaen, C.R. (2008). A clinical blueprint to accelerate the elimination of tobacco use. *JAMA* 299, 2083-2085.

Fletcher, M.L., Ogg, M.C., Lu, L., Ogg, R.J., and Boughter, J.D., Jr. (2017). Overlapping Representation of Primary Tastes in a Defined Region of the Gustatory Cortex. *J Neurosci* 37, 7595-7605.

Flores, C.M., Rogers, S.W., Pabreza, L.A., Wolfe, B.B., and Kellar, K.J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41, 31-37.

Flouris, A.D., Chorti, M.S., Poulianiti, K.P., Jamurtas, A.Z., Kostikas, K., Tzatzarakis, M.N., Wallace Hayes, A., Tsatsakis, A.M., and Koutedakis, Y. (2013). Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhal Toxicol* 25, 91-101.

Flynn, F.W., and Grill, H.J. (1983). Insulin elicits ingestion in decerebrate rats. *Science* 221, 188-190.

Flynn, F.W., and Grill, H.J. (1988). Intraoral intake and taste reactivity responses elicited by sucrose and sodium chloride in chronic decerebrate rats. *Behav Neurosci* 102, 934-941.

Flynn, F.W., Grill, H.J., Schwartz, G.J., and Norgren, R. (1991). Central gustatory lesions: I. Preference and taste reactivity tests. *Behav Neurosci* 105, 933-943.

Flynn, F.W., Webster, M., and Ksir, C. (1989). Chronic voluntary nicotine drinking enhances nicotine palatability in rats. *Behav Neurosci* 103, 356-364.

Fontanini, A., Grossman, S.E., Figueroa, J.A., and Katz, D.B. (2009). Distinct subtypes of basolateral amygdala taste neurons reflect palatability and reward. *J Neurosci* 29, 2486-2495.

Fontanini, A., and Katz, D.B. (2009). Behavioral modulation of gustatory cortical activity. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 403-406.

Forestell, C.A., and Mennella, J.A. (2017). The Relationship between Infant Facial Expressions and Food Acceptance. *Curr Nutr Rep* 6, 141-147.

Forget, B., Coen, K.M., and Le Foll, B. (2009). Inhibition of fatty acid amide hydrolase reduces reinstatement of nicotine seeking but not break point for nicotine self-administration--comparison with CB(1) receptor blockade. *Psychopharmacology (Berl)* 205, 613-624.

Fowler, C.D., and Kenny, P.J. (2011). Intravenous nicotine self-administration and cue-induced reinstatement in mice: effects of nicotine dose, rate of drug infusion and prior instrumental training. *Neuropharmacology* 61, 687-698.

Fowler, C.D., and Kenny, P.J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 533-544.

Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular alpha5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471, 597-601.

Frahm, S., Slimak, M.A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.F., Tsetlin, V., et al. (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron* 70, 522-535.

Frank, M.E. (1991). Taste-responsive neurons of the glossopharyngeal nerve of the rat. *J Neurophysiol* 65, 1452-1463.

Frank, M.E., Contreras, R.J., and Hettinger, T.P. (1983). Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. *J Neurophysiol* 50, 941-960.

Gabbott, P.L., Warner, T.A., Jays, P.R., and Bacon, S.J. (2003). Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res* 993, 59-71.

Gallo, M., Roldan, G., and Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 52, 91-97.

Ganaraja, B., and Jeganathan, P.S. (2000). Effect of basolateral amygdala & ventromedial hypothalamic lesions on ingestion & taste preference in rat. *Indian J Med Res* 112, 65-70.

Garcia-Arcos, I., Geraghty, P., Baumlin, N., Campos, M., Dabo, A.J., Jundi, B., Cummins, N., Eden, E., Grosche, A., Salathe, M., *et al.* (2016). Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* 71, 1119-1129.

Garcia, J., Hankins, W.G., and Rusiniak, K.W. (1974). Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science* 185, 824-831.

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

Garrison, K.A., O'Malley, S.S., Gueorguieva, R., and Krishnan-Sarin, S. (2018). A fMRI study on the impact of advertising for flavored e-cigarettes on susceptible young adults. *Drug Alcohol Depend* 186, 233-241.

Garten, S., and Falkner, R.V. (2004). Role of mentholated cigarettes in increased nicotine dependence and greater risk of tobacco-attributable disease. *Prev Med* 38, 793-798.

Geier, A., Mucha, R.F., and Pauli, P. (2000). Appetitive nature of drug cues confirmed with physiological measures in a model using pictures of smoking. *Psychopharmacology (Berl)* 150, 283-291.

George, O., Grieder, T.E., Cole, M., and Koob, G.F. (2010). Exposure to chronic intermittent nicotine vapor induces nicotine dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 96, 104-107.

Geran, L.C., and Travers, S.P. (2009). Bitter-responsive gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *J Neurophysiol* 101, 1598-1612.

Gibson, H.E., Edwards, J.G., Page, R.S., Van Hook, M.J., and Kauer, J.A. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57, 746-759.

Gilbertson, T.A., Boughter, J.D., Jr., Zhang, H., and Smith, D.V. (2001). Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. *J Neurosci* 21, 4931-4941.

Gilpin, N.W., Whitaker, A.M., Baynes, B., Abdel, A.Y., Weil, M.T., and George, O. (2014). Nicotine vapor inhalation escalates nicotine self-administration. *Addict Biol* 19, 587-592.

Glick, S.D., Visker, K.E., and Maisonneuve, I.M. (1996). An oral self-administration model of nicotine preference in rats: effects of mecamylamine. *Psychopharmacology (Berl)* 128, 426-431.

Glick, S.D., Zimmerberg, B., and Jarvik, M.E. (1971). Titration of oral nicotine intake with smoking behaviour in monkeys. *Nature* 233, 207-208.

Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Curr Biol* 27, R580-R586.

Goldberg, S.R., Spealman, R.D., and Goldberg, D.M. (1981). Persistent behavior at high rates maintained by intravenous self-administration of nicotine. *Science* 214, 573-575.

Goldenson, N.I., Kirkpatrick, M.G., Barrington-Trimis, J.L., Pang, R.D., McBeth, J.F., Pentz, M.A., Samet, J.M., and Leventhal, A.M. (2016a). Effects of sweet flavorings and nicotine on the appeal and sensory properties of e-cigarettes among young adult vapers: Application of a novel methodology. *Drug Alcohol Depend* 168, 176-180.

Goldenson, N.I., Leventhal, A.M., Stone, M.D., McConnell, R.S., and Barrington-Trimis, J.L. (2017). Associations of Electronic Cigarette Nicotine Concentration With Subsequent Cigarette Smoking and Vaping Levels in Adolescents. *JAMA Pediatr* 171, 1192-1199.

Goldenson, N.I., Pang, R.D., and Leventhal, A.M. (2016b). Associations between ADHD symptoms and smoking outcome expectancies in a non-clinical sample of daily cigarette smokers. *Am J Addict* 25, 152-159.

Goney, G., Cok, I., Tamer, U., Burgaz, S., and Sengezer, T. (2016). Urinary cotinine levels of electronic cigarette (e-cigarette) users. *Toxicol Mech Methods* 26, 414-418.

Goniewicz, M.L., Gawron, M., Smith, D.M., Peng, M., Jacob, P., 3rd, and Benowitz, N.L. (2017). Exposure to Nicotine and Selected Toxicants in Cigarette Smokers Who Switched to Electronic Cigarettes: A Longitudinal Within-Subjects Observational Study. *Nicotine Tob Res* 19, 160-167.

Goniewicz, M.L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., *et al.* (2014). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control* 23, 133-139.

Goniewicz, M.L., Kuma, T., Gawron, M., Knysak, J., and Kosmider, L. (2013). Nicotine levels in electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 15, 158-166.

Goniewicz, M.L., and Lee, L. (2015). Electronic cigarettes are a source of thirdhand exposure to nicotine. *Nicotine Tob Res* 17, 256-258.

Gonzales, M., Malcoe, L.H., Kegler, M.C., and Espinoza, J. (2006). Prevalence and predictors of home and automobile smoking bans and child environmental tobacco smoke exposure: a cross-sectional study of U.S.- and Mexico-born Hispanic women with young children. *BMC Public Health* 6, 265.

Gonzalez Roz, A., Secades Villa, R., and Weidberg, S. (2017). Evaluating nicotine dependence levels in e-cigarette users. *Adicciones* 29, 136-138.

- Gonzalez, S., Cascio, M.G., Fernandez-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V., and Ramos, J.A. (2002). Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954, 73-81.
- Gottfried, J.A., O'Doherty, J., and Dolan, R.J. (2003). Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science* 301, 1104-1107.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., and Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78, 703-711.
- Gotti, C., Zoli, M., and Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27, 482-491.
- Gourlay, S.G., Benowitz, N.L., Forbes, A., and McNeil, J.J. (1997). Determinants of plasma concentrations of nicotine and cotinine during cigarette smoking and transdermal nicotine treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 51, 407-414.
- Govind, A.P., Vezina, P., and Green, W.N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* 78, 756-765.
- Grabenhorst, F., Rolls, E.T., Parris, B.A., and d'Souza, A.A. (2010). How the brain represents the reward value of fat in the mouth. *Cereb Cortex* 20, 1082-1091.
- Grau-Perales, A.B., Gomez-Chacon, B., and Gallo, M. (2019). Differential activity pattern of c-Fos in the nucleus accumbens between adult and aged rats during flavor recognition memory. *Behav Brain Res* 371, 111935.
- Green, B.G., Nachtigal, D., Hammond, S., and Lim, J. (2012). Enhancement of retronasal odors by taste. *Chem Senses* 37, 77-86.
- Green, T.A., Cain, M.E., Thompson, M., and Bardo, M.T. (2003). Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 170, 235-241.
- Greiff, L., Wollmer, P., Erjefalt, I., Andersson, M., Pipkorn, U., and Persson, C.G. (1993). Effects of nicotine on the human nasal mucosa. *Thorax* 48, 651-655.
- Grill, H.J. (1985). Introduction: physiological mechanisms in conditioned taste aversions. *Ann N Y Acad Sci* 443, 67-88.
- Grill, H.J., and Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 143, 263-279.
- Grimm, J.W., Ratliff, C., North, K., Barnes, J., and Collins, S. (2012). Nicotine increases sucrose self-administration and seeking in rats. *Addict Biol* 17, 623-633.
- Grossman, S.E., Fontanini, A., Wieskopf, J.S., and Katz, D.B. (2008). Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *J Neurosci* 28, 2864-2873.
- Gu, D.F., Hinks, L.J., Morton, N.E., and Day, I.N. (2000). The use of long PCR to confirm three common alleles at the CYP2A6 locus and the relationship between genotype and smoking habit. *Ann Hum Genet* 64, 383-390.
- Guillem, K., and Peoples, L.L. (2011). Acute effects of nicotine amplify accumbal neural responses during nicotine-taking behavior and nicotine-paired environmental cues. *PLoS One* 6, e24049.
- Guillem, K., Vouillac, C., Azar, M.R., Parsons, L.H., Koob, G.F., Cador, M., and Stinus, L. (2005). Monoamine oxidase inhibition dramatically increases the motivation to self-administer nicotine in rats. *J Neurosci* 25, 8593-8600.
- Gundisch, D. (2000). Nicotinic acetylcholine receptors and imaging. *Curr Pharm Des* 6, 1143-1157.
- Gutierrez, R., Carmena, J.M., Nicolelis, M.A., and Simon, S.A. (2006). Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol* 95, 119-133.
- Gutierrez, R., and Simon, S.A. (2011). Chemosensory processing in the taste - reward pathway. *Flavour Fragr J* 26, 231-238.
- Gyekis, J.P., Dingman, M.A., Revitsky, A.R., Bryant, B.P., Vandenbergh, D.J., Frank, M.E., and Blizard, D.A. (2012). Gustatory, trigeminal, and olfactory aspects of nicotine intake in three mouse strains. *Behav Genet* 42, 820-829.
- Haase, L., Cerf-Ducastel, B., and Murphy, C. (2009). Cortical activation in response to pure taste stimuli during the physiological states of hunger and satiety. *Neuroimage* 44, 1008-1021.
- Hadley, K., Orlandi, R.R., and Fong, K.J. (2004). Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngol Clin North Am* 37, 1115-1126.
- Hahn, B., and Stolerman, I.P. (2002). Nicotine-induced attentional enhancement in rats: effects of chronic exposure to nicotine. *Neuropsychopharmacology* 27, 712-722.
- Hahn, G., Charlin, V.L., Sussman, S., Dent, C.W., Manzi, J., Stacy, A.W., Flay, B., Hansen, W.B., and Burton, D. (1990). Adolescents' first and most recent use situations of smokeless tobacco and cigarettes: similarities and differences. *Addict Behav* 15, 439-448.

Haight, J.L., Fuller, Z.L., Fraser, K.M., and Flagel, S.B. (2017). A food-predictive cue attributed with incentive salience engages subcortical afferents and efferents of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Neuroscience* 340, 135-152.

Hajek, P., Goniewicz, M.L., Phillips, A., Myers Smith, K., West, O., and McRobbie, H. (2015). Nicotine intake from electronic cigarettes on initial use and after 4 weeks of regular use. *Nicotine Tob Res* 17, 175-179.

Hajek, P., Phillips-Waller, A., Przulj, D., Pesola, F., Myers Smith, K., Bisal, N., Li, J., Parrott, S., Sasieni, P., Dawkins, L., *et al.* (2019). A Randomized Trial of E-Cigarettes versus Nicotine-Replacement Therapy. *N Engl J Med* 380, 629-637.

Hajek, P., Przulj, D., Phillips, A., Anderson, R., and McRobbie, H. (2017). Nicotine delivery to users from cigarettes and from different types of e-cigarettes. *Psychopharmacology (Berl)* 234, 773-779.

Hajnal, A., and Norgren, R. (2005). Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by sapid sucrose. *Physiol Behav* 84, 363-369.

Hajnal, A., Norgren, R., and Kovacs, P. (2009). Parabrachial coding of sapid sucrose: relevance to reward and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 347-364.

Hajnal, A., Pothos, E.N., Lenard, L., and Hoebel, B.G. (1998). Effects of feeding and insulin on extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. *Brain Res* 785, 41-48.

Hamilton, K.R., Elliott, B.M., Berger, S.S., and Grunberg, N.E. (2014). Environmental enrichment attenuates nicotine behavioral sensitization in male and female rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 22, 356-363.

Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K., and Kannan, H. (1998). Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol* 79, 2535-2545.

Hare, T.A., Camerer, C.F., and Rangel, A. (2009). Self-control in decision-making involves modulation of the vmPFC valuation system. *Science* 324, 646-648.

Harris, A.C., Muelken, P., Haave, Z., Swain, Y., Smethells, J.R., and LeSage, M.G. (2018). Propylene glycol, a major electronic cigarette constituent, attenuates the adverse effects of high-dose nicotine as measured by intracranial self-stimulation in rats. *Drug Alcohol Depend* 193, 162-168.

Harrison, A.A., Gasparini, F., and Markou, A. (2002). Nicotine potentiation of brain stimulation reward reversed by DH beta E and SCH 23390, but not by eticlopride, LY 314582 or MPEP in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160, 56-66.

Hartmann-Boyce, J., McRobbie, H., Bullen, C., Begh, R., Stead, L.F., and Hajek, P. (2016). Electronic cigarettes for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 9, CD010216.

Hauser, S.R., Deehan, G.A., Jr., Toalston, J.E., Bell, R.L., McBride, W.J., and Rodd, Z.A. (2014). Enhanced alcohol-seeking behavior by nicotine in the posterior ventral tegmental area of female alcohol-preferring (P) rats: modulation by serotonin-3 and nicotinic cholinergic receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 3745-3755.

Hauser, S.R., Getachew, B., Oster, S.M., Dhaher, R., Ding, Z.M., Bell, R.L., McBride, W.J., and Rodd, Z.A. (2012a). Nicotine modulates alcohol-seeking and relapse by alcohol-preferring (P) rats in a time-dependent manner. *Alcohol Clin Exp Res* 36, 43-54.

Hauser, S.R., Katner, S.N., Deehan, G.A., Jr., Ding, Z.M., Toalston, J.E., Scott, B.J., Bell, R.L., McBride, W.J., and Rodd, Z.A. (2012b). Development of an oral operant nicotine/ethanol co-use model in alcohol-preferring (p) rats. *Alcohol Clin Exp Res* 36, 1963-1972.

Hayase, T. (2011). Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors. *BMC Pharmacol* 11, 6.

Hayes, J.E., Bartoshuk, L.M., Kidd, J.R., and Duffy, V.B. (2008). Supertasting and PROP bitterness depends on more than the TAS2R38 gene. *Chem Senses* 33, 255-265.

Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., *et al.* (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88, 205-215.

Heath, C.J., and Picciotto, M.R. (2009). Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 254-262.

Heatherington, T.F., Kozlowski, L.T., Frecker, R.C., and Fagerstrom, K.O. (1991). The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict* 86, 1119-1127.

Hecht, S.S., Carmella, S.G., Kotandeniya, D., Pillsbury, M.E., Chen, M., Ransom, B.W., Vogel, R.I., Thompson, E., Murphy, S.E., and Hatsukami, D.K. (2015). Evaluation of toxicant and carcinogen metabolites in the urine of e-cigarette users versus cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 17, 704-709.

Hecht, S.S., Carmella, S.G., Murphy, S.E., Riley, W.T., Le, C., Luo, X., Mooney, M., and Hatsukami, D.K. (2007). Similar exposure to a tobacco-specific carcinogen in smokeless tobacco users and cigarette smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1567-1572.

Henderson, B.J., Wall, T.R., Henley, B.M., Kim, C.H., McKinney, S., and Lester, H.A. (2017). Menthol Enhances Nicotine Reward-Related Behavior by Potentiating Nicotine-Induced Changes in nAChR Function, nAChR Upregulation, and DA Neuron Excitability. *Neuropsychopharmacology* 42, 2285-2291.

Henderson, B.J., Wall, T.R., Henley, B.M., Kim, C.H., Nichols, W.A., Moaddel, R., Xiao, C., and Lester, H.A. (2016). Menthol Alone Upregulates Midbrain nAChRs, Alters nAChR Subtype Stoichiometry, Alters Dopamine Neuron Firing Frequency, and Prevents Nicotine Reward. *J Neurosci* 36, 2957-2974.

Heng, L.J., Huang, B., Guo, H., Ma, L.T., Yuan, W.X., Song, J., Wang, P., Xu, G.Z., and Gao, G.D. (2014). Blocking TRPV1 in nucleus accumbens inhibits persistent morphine conditioned place preference expression in rats. *PLoS One* 9, e104546.

Henningfield, J.E., Benowitz, N.L., Connolly, G.N., Davis, R.M., Gray, N., Myers, M.L., and Zeller, M. (2004). Reducing tobacco addiction through tobacco product regulation. *Tob Control* 13, 132-135.

Henningfield, J.E., and Goldberg, S.R. (1983a). Control of behavior by intravenous nicotine injections in human subjects. *Pharmacol Biochem Behav* 19, 1021-1026.

Henningfield, J.E., and Goldberg, S.R. (1983b). Nicotine as a reinforcer in human subjects and laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 19, 989-992.

Henningfield, J.E., and Keenan, R.M. (1993). Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol* 61, 743-750.

Henningfield, J.E., Miyasato, K., and Jasinski, D.R. (1983). Cigarette smokers self-administer intravenous nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 19, 887-890.

Hermann, G.E., and Rogers, R.C. (1985). Convergence of vagal and gustatory afferent input within the parabrachial nucleus of the rat. *J Auton Nerv Syst* 13, 1-17.

Hersey, J.C., Ng, S.W., Nonnemaker, J.M., Mowery, P., Thomas, K.Y., Vilsaint, M.C., Allen, J.A., and Haviland, M.L. (2006). Are menthol cigarettes a starter product for youth? *Nicotine Tob Res* 8, 403-413.

Hertel, A.W., and Mermelstein, R.J. (2016). Smoker identity development among adolescents who smoke. *Psychol Addict Behav* 30, 475-483.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11, 503-513.

Hildebrand, B.E., Nomikos, G.G., Bondjers, C., Nisell, M., and Svensson, T.H. (1997). Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 129, 348-356.

Ho, C.Y., and Berridge, K.C. (2013). An orexin hotspot in ventral pallidum amplifies hedonic 'liking' for sweetness. *Neuropsychopharmacology* 38, 1655-1664.

Hoffman, A.C., and Evans, S.E. (2013). Abuse potential of non-nicotine tobacco smoke components: acetaldehyde, nornicotine, cotinine, and anabasine. *Nicotine Tob Res* 15, 622-632.

Hoffman, A.C., Salgado, R.V., Dresler, C., Faller, R.W., and Bartlett, C. (2016). Flavour preferences in youth versus adults: a review. *Tob Control* 25, ii32-ii39.

Hogarth, L., and Duka, T. (2006). Human nicotine conditioning requires explicit contingency knowledge: is addictive behaviour cognitively mediated? *Psychopharmacology (Berl)* 184, 553-566.

Hong, S., Zhou, T.C., Smith, M., Saleem, K.S., and 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.

Hong, S.I., Nguyen, T.L., Ma, S.X., Kim, H.C., Lee, S.Y., and Jang, C.G. (2017). TRPV1 modulates morphine-induced conditioned place preference via p38 MAPK in the nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 334, 26-33.

Hoover, W.B., and Vertes, R.P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212, 149-179.

Horvitz, J.C. (2000). Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96, 651-656.

Houchi, H., Babovic, D., Pierrefiche, O., Ledent, C., Daoust, M., and Naassila, M. (2005). CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology* 30, 339-349.

Howard, J.D., Gottfried, J.A., Tobler, P.N., and Kahnt, T. (2015). Identity-specific coding of future rewards in the human orbitofrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5195-5200.

Howard, J.D., Plailly, J., Grueschow, M., Haynes, J.D., and Gottfried, J.A. (2009). Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. *Nat Neurosci* 12, 932-938.

Howlett, A.C., and Mukhopadhyay, S. (2000). Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108, 53-70.

Hua, M., Alfi, M., and Talbot, P. (2013). Health-related effects reported by electronic cigarette users in online forums. *J Med Internet Res* 15, e59.

Huang, L.L., Baker, H.M., Meernik, C., Ranney, L.M., Richardson, A., and Goldstein, A.O. (2017). Impact of non-menthol flavours in tobacco products on perceptions and use among youth, young adults and adults: a systematic review. *Tob Control* 26, 709-719.

Huang, T., Yan, J., and Kang, Y. (2003). Role of the central amygdaloid nucleus in shaping the discharge of gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *Brain Res Bull* 61, 443-452.

Hughes, J.R. (1992). Tobacco withdrawal in self-quitters. *J Consult Clin Psychol* 60, 689-697.

Hughes, J.R., Higgins, S.T., and Bickel, W.K. (1994). Nicotine withdrawal versus other drug withdrawal syndromes: similarities and dissimilarities. *Addiction* 89, 1461-1470.

Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd, and Benowitz, N.L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57, 79-115.

Hummel, T., Livermore, A., Hummel, C., and Kobal, G. (1992). Chemosensory event-related potentials in man: relation to olfactory and painful sensations elicited by nicotine. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 84, 192-195.

Hwang, L.D., Strike, L.T., Couvy-Duchesne, B., de Zubicaray, G.I., McMahon, K., Breslin, P.A.S., Reed, D.R., Martin, N.G., and Wright, M.J. (2019). Associations between brain structure and perceived intensity of sweet and bitter tastes. *Behav Brain Res* 363, 103-108.

Illig, K.R. (2005). Projections from orbitofrontal cortex to anterior piriform cortex in the rat suggest a role in olfactory information processing. *J Comp Neurol* 488, 224-231.

Imperato, A., Mulas, A., and Di Chiara, G. (1986). Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 132, 337-338.

Inui, T., Sugishita, T., Inui-Yamamoto, C., Yasoshima, Y., and Shimura, T. (2019). The Basolateral Nucleus of the Amygdala Executes the Parallel Processes of Avoidance and Palatability in the Retrieval of Conditioned Taste Aversion in Male Rats. *eNeuro* 6.

Jamal, A., Homa, D.M., O'Connor, E., Babb, S.D., Caraballo, R.S., Singh, T., Hu, S.S., and King, B.A. (2015). Current cigarette smoking among adults - United States, 2005-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64, 1233-1240.

Janak, P.H., and Tye, K.M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517, 284-292.

Javadi-Paydar, M., Kerr, T.M., Harvey, E.L., Cole, M., and Taffe, M.A. (2019). Effects of nicotine and THC vapor inhalation administered by an electronic nicotine delivery system (ENDS) in male rats. *Drug Alcohol Depend* 198, 54-62.

Jeewajee, A., Lever, C., Burton, S., O'Keefe, J., and Burgess, N. (2008). Environmental novelty is signaled by reduction of the hippocampal theta frequency. *Hippocampus* 18, 340-348.

Jensen, T.K., Andersen, M.V., Nielsen, K.A., Arendt-Nielsen, L., and Boudreau, S.A. (2016). Interaction between intra-oral cinnamaldehyde and nicotine assessed by psychophysical and physiological responses. *Eur J Oral Sci* 124, 349-357.

Jezzini, A., Mazzucato, L., La Camera, G., and Fontanini, A. (2013). Processing of hedonic and chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks. *J Neurosci* 33, 18966-18978.

Ji, D., Lape, R., and Dani, J.A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 31, 131-141.

Jobson, C.L.M., Renard, J., Szkudlarek, H., Rosen, L.G., Pereira, B., Wright, D.J., Rushlow, W., and Laviolette, S.R. (2019). Adolescent Nicotine Exposure Induces Dysregulation of Mesocorticolimbic Activity States and Depressive and Anxiety-like Prefrontal Cortical Molecular Phenotypes Persisting into Adulthood. *Cereb Cortex* 29, 3140-3153.

Johnson, D.M., Illig, K.R., Behan, M., and Haberly, L.B. (2000). New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems. *J Neurosci* 20, 6974-6982.

Johnson, J.M., Muilenburg, J.L., Rathbun, S.L., Yu, X., Naeher, L.P., and Wang, J.S. (2018). Elevated Nicotine Dependence Scores among Electronic Cigarette Users at an Electronic Cigarette Convention. *J Community Health* 43, 164-174.

Kalkhoran, S., and Glantz, S.A. (2016). E-cigarettes and smoking cessation in real-world and clinical settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 4, 116-128.

Kallupi, M., de Guglielmo, G., Larrosa, E., and George, O. (2019). Exposure to passive nicotine vapor in male adolescent rats produces a withdrawal-like state and facilitates nicotine self-administration during adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol*.

Karimnamazi, H., and Travers, J.B. (1998). Differential projections from gustatory responsive regions of the parabrachial nucleus to the medulla and forebrain. *Brain Res* 813, 283-302.

Kasza, K.A., Ambrose, B.K., Conway, K.P., Borek, N., Taylor, K., Goniewicz, M.L., Cummings, K.M., Sharma, E., Pearson, J.L., Green, V.R., *et al.* (2017). Tobacco-Product Use by Adults and Youths in the United States in 2013 and 2014. *N Engl J Med* 376, 342-353.

Katner, S.N., Toalston, J.E., Smoker, M.P., Rodd, Z.A., McBride, W.J., and Engleman, E.A. (2015). Time-course of extracellular nicotine and cotinine levels in rat brain following administration of nicotine: effects of route and ethanol coadministration. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 551-560.

Katz, D.B., Simon, S.A., and Nicolelis, M.A. (2001). Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J Neurosci* 21, 4478-4489.

Katz, D.B., Simon, S.A., and Nicolelis, M.A. (2002). Taste-specific neuronal ensembles in the gustatory cortex of awake rats. *J Neurosci* 22, 1850-1857.

Kayser, C., Petkov, C.I., and Logothetis, N.K. (2008). Visual modulation of neurons in auditory cortex. *Cereb Cortex* 18, 1560-1574.

Kayyal, H., Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Khamaisy, M., Sharma, V., and Rosenblum, K. (2019). Activity of Insula to Basolateral Amygdala Projecting Neurons is Necessary and Sufficient for Taste Valence Representation. *J Neurosci*.

Kelley, A.E., and Delfs, J.M. (1991). Dopamine and conditioned reinforcement. II. Contrasting effects of amphetamine microinjection into the nucleus accumbens with peptide microinjection into the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 103, 197-203.

Kemble, E.D., Levine, M.S., Gregoire, K., Koeppe, K., and Thomas, T.T. (1972). Reactivity to saccharin and guinine solutions following amygdaloid or septal lesions in rats. *Behav Biol* 7, 503-512.

Kenford, S.L., Fiore, M.C., Jorenby, D.E., Smith, S.S., Wetter, D., and Baker, T.B. (1994). Predicting smoking cessation. Who will quit with and without the nicotine patch. *JAMA* 271, 589-594.

Kenny, P.J., Cheeta, S., and File, S.E. (2000). Anxiogenic effects of nicotine in the dorsal hippocampus are mediated by 5-HT_{1A} and not by muscarinic M1 receptors. *Neuropharmacology* 39, 300-307.

Kenny, P.J., and Markou, A. (2001). Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 531-549.

Kenny, P.J., and Markou, A. (2006). Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. *Neuropsychopharmacology* 31, 1203-1211.

Keyworth, H., Georgiou, P., Zanos, P., Rueda, A.V., Chen, Y., Kitchen, I., Camarini, R., Cropley, M., and Bailey, A. (2018). Wheel running during chronic nicotine exposure is protective against mecamylamine-precipitated withdrawal and up-regulates hippocampal alpha7 nACh receptors in mice. *Br J Pharmacol* 175, 1928-1943.

Kichko, T.I., Lennerz, J., Eberhardt, M., Babes, R.M., Neuhuber, W., Kobal, G., and Reeh, P.W. (2013). Bimodal concentration-response of nicotine involves the nicotinic acetylcholine receptor, transient receptor potential vanilloid type 1, and transient receptor potential ankyrin 1 channels in mouse trachea and sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 347, 529-539.

Kiefer, S.W., Hill, K.G., and Kaczmarek, H.J. (1998). Taste reactivity to alcohol and basic tastes in outbred mice. *Alcohol Clin Exp Res* 22, 1146-1151.

Kim, H., Lim, J., Buehler, S.S., Brinkman, M.C., Johnson, N.M., Wilson, L., Cross, K.S., and Clark, P.I. (2016a). Role of sweet and other flavours in liking and disliking of electronic cigarettes. *Tob Control* 25, ii55-ii61.

Kim, J., Pignatelli, M., Xu, S., Itohara, S., and Tonegawa, S. (2016b). Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. *Nat Neurosci* 19, 1636-1646.

Kim, J., Zhang, X., Muralidhar, S., LeBlanc, S.A., and Tonegawa, S. (2017). Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. *Neuron* 93, 1464-1479 e1465.

Kim, M.J., Mizumori, S.J., and Bernstein, I.L. (2010). Neuronal representation of conditioned taste in the basolateral amygdala of rats. *Neurobiol Learn Mem* 93, 406-414.

Kim, M.R., Kusakabe, Y., Miura, H., Shindo, Y., Ninomiya, Y., and Hino, A. (2003). Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 500-506.

Kinomura, S., Kawashima, R., Yamada, K., Ono, S., Itoh, M., Yoshioka, S., Yamaguchi, T., Matsui, H., Miyazawa, H., Itoh, H., *et al.* (1994). Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography. *Brain Res* 659, 263-266.

Kinouani, S., Pereira, E., and Tzourio, C. (2017). Electronic Cigarette Use in Students and Its Relation with Tobacco-Smoking: A Cross-Sectional Analysis of the i-Share Study. *Int J Environ Res Public Health* 14.

Kleijn, J., Folgering, J.H., van der Hart, M.C., Rollema, H., Cremers, T.I., and Westerink, B.H. (2011). Direct effect of nicotine on mesolimbic dopamine release in rat nucleus accumbens shell. *Neurosci Lett* 493, 55-58.

Klein, L.C., Stine, M.M., Vandenbergh, D.J., Whetzel, C.A., and Kamens, H.M. (2004). Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol Biochem Behav* 78, 13-25.

Klein, S.M., Giovino, G.A., Barker, D.C., Tworek, C., Cummings, K.M., and O'Connor, R.J. (2008). Use of flavored cigarettes among older adolescent and adult smokers: United States, 2004--2005. *Nicotine Tob Res* 10, 1209-1214.

Klitenick, M.A., Deutch, A.Y., Churchill, L., and Kalivas, P.W. (1992). Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. *Neuroscience* 50, 371-386.

Koh, M.T., Wilkins, E.E., and Bernstein, I.L. (2003). Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* 117, 1416-1422.

Kong, G., Morean, M.E., Cavallo, D.A., Camenga, D.R., and Krishnan-Sarin, S. (2015). Reasons for Electronic Cigarette Experimentation and Discontinuation Among Adolescents and Young Adults. *Nicotine Tob Res* 17, 847-854.

Kong, G., Morean, M.E., Cavallo, D.A., Camenga, D.R., and Krishnan-Sarin, S. (2017). Sources of electronic cigarette acquisition among adolescents in Connecticut. *Tob Regul Sci* 3, 10-16.

Koob, G.F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13, 177-184.

Koob, G.F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59, 11-34.

Kota, D., Martin, B.R., Robinson, S.E., and Damaj, M.I. (2007). Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 399-407.

Kota, D., Robinson, S.E., and Imad Damaj, M. (2009). Enhanced nicotine reward in adulthood after exposure to nicotine during early adolescence in mice. *Biochem Pharmacol* 78, 873-879.

Kozlowski, L.T., and Warner, K.E. (2017). Adolescents and e-cigarettes: Objects of concern may appear larger than they are. *Drug Alcohol Depend* 174, 209-214.

Kringelbach, M.L., O'Doherty, J., Rolls, E.T., and Andrews, C. (2003). Activation of the human orbitofrontal cortex to a liquid food stimulus is correlated with its subjective pleasantness. *Cereb Cortex* 13, 1064-1071.

Krishnan-Sarin, S., Green, B.G., Kong, G., Cavallo, D.A., Jatlow, P., Gueorguieva, R., Buta, E., and O'Malley, S.S. (2017). Studying the interactive effects of menthol and nicotine among youth: An examination using e-cigarettes. *Drug Alcohol Depend* 180, 193-199.

Krishnan-Sarin, S., Jackson, A., Morean, M., Kong, G., Bold, K.W., Camenga, D.R., Cavallo, D.A., Simon, P., and Wu, R. (2019). E-cigarette devices used by high-school youth. *Drug Alcohol Depend* 194, 395-400.

Krishnan-Sarin, S., Morean, M.E., Camenga, D.R., Cavallo, D.A., and Kong, G. (2015). E-cigarette Use Among High School and Middle School Adolescents in Connecticut. *Nicotine Tob Res* 17, 810-818.

Kroemer, N.B., Veldhuizen, M.G., Delvy, R., Patel, B.P., O'Malley, S.S., and Small, D.M. (2018). Sweet taste potentiates the reinforcing effects of e-cigarettes. *Eur Neuropsychopharmacol* 28, 1089-1102.

Ksir, C. (1983). Taste and nicotine as determinants of voluntary tobacco use by hamsters. *Pharmacol Biochem Behav* 19, 605-608.

Kumar, R., Pratt, J.A., and Stolerman, I.P. (1983). Characteristics of conditioned taste aversion produced by nicotine in rats. *Br J Pharmacol* 79, 245-253.

Kusuhara, Y., Yoshida, R., Ohkuri, T., Yasumatsu, K., Voigt, A., Hubner, S., Maeda, K., Boehm, U., Meyerhof, W., and Ninomiya, Y. (2013). Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J Physiol* 591, 1967-1985.

Kutlu, M.G., Burke, D., Slade, S., Hall, B.J., Rose, J.E., and Levin, E.D. (2013). Role of insular cortex D(1) and D(2) dopamine receptors in nicotine self-administration in rats. *Behav Brain Res* 256, 273-278.

Labbe, D., Rytz, A., Morgenegg, C., Ali, S., and Martin, N. (2007). Subthreshold olfactory stimulation can enhance sweetness. *Chem Senses* 32, 205-214.

Labouebe, G., Boutrel, B., Tarussio, D., and Thorens, B. (2016). Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. *Nat Neurosci* 19, 999-1002.

Laffitte, A., Neiers, F., and Briand, L. (2014). Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17, 379-385.

Lam, C., and West, A. (2015). Are electronic nicotine delivery systems an effective smoking cessation tool? *Can J Respir Ther* 51, 93-98.

Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212-217.

Langley, J.N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* 33, 374-413.

Laverty, A.A., Vardavas, C.I., and Filippidis, F.T. (2016). Design and marketing features influencing choice of e-cigarettes and tobacco in the EU. *Eur J Public Health* 26, 838-841.

Lavi, K., Jacobson, G.A., Rosenblum, K., and Luthi, A. (2018). Encoding of Conditioned Taste Aversion in Cortico-Amygdala Circuits. *Cell Rep* 24, 278-283.

Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2003). Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area. *Mol Psychiatry* 8, 50-59, 59.

Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 5, 55-65.

Le, A.D., Li, Z., Funk, D., Shram, M., Li, T.K., and Shaham, Y. (2006). Increased vulnerability to nicotine self-administration and relapse in alcohol-naive offspring of rats selectively bred for high alcohol intake. *J Neurosci* 26, 1872-1879.

Le Foll, B., and Goldberg, S.R. (2005). Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 178, 481-492.

Le Foll, B., and Goldberg, S.R. (2006). Nicotine as a typical drug of abuse in experimental animals and humans. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 367-381.

Le Moal, M., and Koob, G.F. (2007). Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 377-393.

Le Novere, N., Corringer, P.J., and Changeux, J.P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53, 447-456.

Lecca, D., Cacciapaglia, F., Valentini, V., Gronli, J., Spiga, S., and Di Chiara, G. (2006). Preferential increase of extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell as compared to that in the core during acquisition and maintenance of intravenous nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 435-446.

Lecourtier, L., and Kelly, P.H. (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 658-672.

LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron* 73, 653-676.

Leigh, N.J., Lawton, R.I., Hershberger, P.A., and Goniewicz, M.L. (2016). Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tob Control* 25, ii81-ii87.

Lemon, C.H. (2015). Perceptual and neural responses to sweet taste in humans and rodents. *Chemosens Percept* 8, 46-52.

Lemon, C.H., and Smith, D.V. (2005). Neural representation of bitter taste in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* 94, 3719-3729.

Leon, M.E., Lugo, A., Boffetta, P., Gilmore, A., Ross, H., Schuz, J., La Vecchia, C., and Gallus, S. (2016). Smokeless tobacco use in Sweden and other 17 European countries. *Eur J Public Health* 26, 817-821.

Lerman, C., Jepson, C., Wileyto, E.P., Patterson, F., Schnoll, R., Mroziewicz, M., Benowitz, N., and Tyndale, R.F. (2010). Genetic variation in nicotine metabolism predicts the efficacy of extended-duration transdermal nicotine therapy. *Clin Pharmacol Ther* 87, 553-557.

Lerman, C., Tyndale, R., Patterson, F., Wileyto, E.P., Shields, P.G., Pinto, A., and Benowitz, N. (2006). Nicotine metabolite ratio predicts efficacy of transdermal nicotine for smoking cessation. *Clin Pharmacol Ther* 79, 600-608.

Lerner, C.A., Rutagarama, P., Ahmad, T., Sundar, I.K., Elder, A., and Rahman, I. (2016). Electronic cigarette aerosols and copper nanoparticles induce mitochondrial stress and promote DNA fragmentation in lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 477, 620-625.

Lesage, E., Aronson, S.E., Sutherland, M.T., Ross, T.J., Salmeron, B.J., and Stein, E.A. (2017). Neural Signatures of Cognitive Flexibility and Reward Sensitivity Following Nicotinic Receptor Stimulation in Dependent Smokers: A Randomized Trial. *JAMA Psychiatry* 74, 632-640.

LeSage, M.G., Burroughs, D., Dufek, M., Keyler, D.E., and Pentel, P.R. (2004). Reinstatement of nicotine self-administration in rats by presentation of nicotine-paired stimuli, but not nicotine priming. *Pharmacol Biochem Behav* 79, 507-513.

LeSage, M.G., Keyler, D.E., Shoeman, D., Raphael, D., Collins, G., and Pentel, P.R. (2002). Continuous nicotine infusion reduces nicotine self-administration in rats with 23-h/day access to nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 279-289.

Leventhal, A.M., Strong, D.R., Kirkpatrick, M.G., Unger, J.B., Sussman, S., Riggs, N.R., Stone, M.D., Khoddam, R., Samet, J.M., and Audrain-McGovern, J. (2015). Association of Electronic Cigarette Use With Initiation of Combustible Tobacco Product Smoking in Early Adolescence. *JAMA* 314, 700-707.

Levin, E.D., Lawrence, S.S., Petro, A., Horton, K., Rezvani, A.H., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. (2007). Adolescent vs. adult-onset nicotine self-administration in male rats: duration of effect and differential nicotinic receptor correlates. *Neurotoxicol Teratol* 29, 458-465.

Levin, E.D., Rezvani, A.H., Montoya, D., Rose, J.E., and Swartzwelder, H.S. (2003). Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 169, 141-149.

Li, J., and Lemon, C.H. (2019). Mouse Parabrachial Neurons Signal a Relationship between Bitter Taste and Nociceptive Stimuli. *J Neurosci* 39, 1631-1648.

Li, J., Newcombe, R., and Walton, D. (2016). Contextual Information Around the First Use of Electronic Cigarettes Among New Zealand Smokers and Recent Quitters. *Nicotine Tob Res* 18, 737-738.

Li, M.D., Cheng, R., Ma, J.Z., and Swan, G.E. (2003). A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction* 98, 23-31.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4692-4696.

Liem, D.G., and Mennella, J.A. (2002). Sweet and sour preferences during childhood: role of early experiences. *Dev Psychobiol* 41, 388-395.

Lim, J., and Johnson, M.B. (2011). Potential mechanisms of retronasal odor referral to the mouth. *Chem Senses* 36, 283-289.

Lips, E.H., Gaborieau, V., McKay, J.D., Chabrier, A., Hung, R.J., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., *et al.* (2010). Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *Int J Epidemiol* 39, 563-577.

Lisko, J.G., Tran, H., Stanfill, S.B., Blount, B.C., and Watson, C.H. (2015). Chemical Composition and Evaluation of Nicotine, Tobacco Alkaloids, pH, and Selected Flavors in E-Cigarette Cartridges and Refill Solutions. *Nicotine Tob Res* 17, 1270-1278.

Liu, H., and Fontanini, A. (2015). State Dependency of Chemosensory Coding in the Gustatory Thalamus (VPMpc) of Alert Rats. *J Neurosci* 35, 15479-15491.

Liu, L., and Simon, S.A. (1994). A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 738-741.

Liu, L., and Simon, S.A. (1996). Capsaicin and nicotine both activate a subset of rat trigeminal ganglion neurons. *Am J Physiol* 270, C1807-1814.

Liu, L., Zhu, W., Zhang, Z.S., Yang, T., Grant, A., Oxford, G., and Simon, S.A. (2004). Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. *J Neurophysiol* 91, 1482-1491.

Livneh, Y., Ramesh, R.N., Burgess, C.R., Levandowski, K.M., Madara, J.C., Fenselau, H., Goldey, G.J., Diaz, V.E., Jikomes, N., Resch, J.M., *et al.* (2017). Homeostatic circuits selectively gate food cue responses in insular cortex. *Nature* 546, 611-616.

Luebbert, M., Radtke, D., Wodarski, R., Damann, N., Hatt, H., and Wetzels, C.H. (2010). Direct activation of transient receptor potential V1 by nickel ions. *Pflugers Arch* 459, 737-750.

Lyall, V., Heck, G.L., Phan, T.H., Mummalaneni, S., Malik, S.A., Vinnikova, A.K., and Desimone, J.A. (2005). Ethanol modulates the VR-1 variant amiloride-insensitive salt taste receptor. II. Effect on chorda tympani salt responses. *J Gen Physiol* 125, 587-600.

MacDermott, A.B., Role, L.W., and Siegelbaum, S.A. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 22, 443-485.

Macpherson, L.J., Hwang, S.W., Miyamoto, T., Dubin, A.E., Patapoutian, A., and Story, G.M. (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32, 335-343.

Mahler, S.V., Smith, K.S., and Berridge, K.C. (2007). Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology* 32, 2267-2278.

Maier, J.X., Blankenship, M.L., Li, J.X., and Katz, D.B. (2015). A Multisensory Network for Olfactory Processing. *Curr Biol* 25, 2642-2650.

Maier, J.X., and Katz, D.B. (2013). Neural dynamics in response to binary taste mixtures. *J Neurophysiol* 109, 2108-2117.

Maier, J.X., Wachowiak, M., and Katz, D.B. (2012). Chemosensory convergence on primary olfactory cortex. *J Neurosci* 32, 17037-17047.

Majak, K., Ronkko, S., Kempainen, S., and Pitkanen, A. (2004). Projections from the amygdaloid complex to the piriform cortex: A PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 476, 414-428.

Malas, M., van der Tempel, J., Schwartz, R., Minichiello, A., Lightfoot, C., Noormohamed, A., Andrews, J., Zawertailo, L., and Ferrence, R. (2016). Electronic Cigarettes for Smoking Cessation: A Systematic Review. *Nicotine Tob Res* 18, 1926-1936.

Malin, D.H., Lake, J.R., Newlin-Maultsby, P., Roberts, L.K., Lanier, J.G., Carter, V.A., Cunningham, J.S., and Wilson, O.B. (1992). Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 43, 779-784.

Malvaez, M., Shieh, C., Murphy, M.D., Greenfield, V.Y., and Wassum, K.M. (2019). Distinct cortical-amygdala projections drive reward value encoding and retrieval. *Nat Neurosci* 22, 762-769.

Mangold, J.E., Payne, T.J., Ma, J.Z., Chen, G., and Li, M.D. (2008). Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans. *J Med Genet* 45, 578-582.

Mansvelder, H.D., Keath, J.R., and McGehee, D.S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33, 905-919.

Mansvelder, H.D., and McGehee, D.S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* 53, 606-617.

Marchalant, Y., Brothers, H.M., Norman, G.J., Karelina, K., DeVries, A.C., and Wenk, G.L. (2009). Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol Dis* 34, 300-307.

Marinelli, S., Pascucci, T., Bernardi, G., Puglisi-Allegra, S., and Mercuri, N.B. (2005). Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 30, 864-870.

Markou, A. (2008). Review. Neurobiology of nicotine dependence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3159-3168.

Markou, A., Li, J., Tse, K., and Li, X. (2018). Cue-induced nicotine-seeking behavior after withdrawal with or without extinction in rats. *Addict Biol* 23, 111-119.

Marks, M.J., Grady, S.R., and Collins, A.C. (1993). Downregulation of nicotinic receptor function after chronic nicotine infusion. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 1268-1276.

Marks, M.J., Stitzel, J.A., and Collins, A.C. (1989). Genetic influences on nicotine responses. *Pharmacol Biochem Behav* 33, 667-678.

Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kossel, M., Holsboer, F., Zieglgansberger, W., Landgraf, R., Lutz, B., and Wotjak, C.T. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27, 832-839.

Martin-Iverson, M.T., and Dourish, C.T. (1988). Role of dopamine D-1 and D-2 receptor subtypes in mediating dopamine agonist effects on food consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 96, 370-374.

Marynak, K.L., Gammon, D.G., Rogers, T., Coats, E.M., Singh, T., and King, B.A. (2017). Sales of Nicotine-Containing Electronic Cigarette Products: United States, 2015. *Am J Public Health* 107, 702-705.

Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., *et al.* (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103-107.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12, 77-84.

Matthews, T.J., Abdelbaky, P., and Pfaff, D.W. (2005). Social and sexual motivation in the mouse. *Behav Neurosci* 119, 1628-1639.

McBurney, D.H., and Bartoshuk, L.M. (1973). Interactions between stimuli with different taste qualities. *Physiol Behav* 10, 1101-1106.

McCutcheon, J.E., Ebner, S.R., Loriaux, A.L., and Roitman, M.F. (2012). Encoding of aversion by dopamine and the nucleus accumbens. *Front Neurosci* 6, 137.

McKelvey, K., Baiocchi, M., Ramamurthi, D., McLaughlin, S., and Halpern-Felsher, B. (2019). Youth say ads for flavored e-liquids are for them. *Addict Behav* 91, 164-170.

McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., and Margolskee, R.F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 563-569.

McMillen, R.C., Gottlieb, M.A., Shaefer, R.M., Winickoff, J.P., and Klein, J.D. (2015). Trends in Electronic Cigarette Use Among U.S. Adults: Use is Increasing in Both Smokers and Nonsmokers. *Nicotine Tob Res* 17, 1195-1202.

McQueen, A., Tower, S., and Sumner, W. (2011). Interviews with "vapers": implications for future research with electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 13, 860-867.

McQuown, S.C., Belluzzi, J.D., and Leslie, F.M. (2007). Low dose nicotine treatment during early adolescence increases subsequent cocaine reward. *Neurotoxicol Teratol* 29, 66-73.

McRobbie, H., Bullen, C., Hartmann-Boyce, J., and Hajek, P. (2014). Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction. *Cochrane Database Syst Rev*, CD010216.

McRobbie, H., Phillips, A., Goniewicz, M.L., Smith, K.M., Knight-West, O., Przulj, D., and Hajek, P. (2015). Effects of Switching to Electronic Cigarettes with and without Concurrent Smoking on Exposure to Nicotine, Carbon Monoxide, and Acrolein. *Cancer Prev Res (Phila)* 8, 873-878.

Meffre, J., Sicre, M., Diarra, M., Marchessaux, F., Paleressompoulle, D., and Ambroggi, F. (2019). Orexin in the Posterior Paraventricular Thalamus Mediates Hunger-Related Signals in the Nucleus Accumbens Core. *Curr Biol* 29, 3298-3306 e3294.

Mennella, J.A., and Bobowski, N.K. (2015). The sweetness and bitterness of childhood: Insights from basic research on taste preferences. *Physiol Behav* 152, 502-507.

Mennella, J.A., Spector, A.C., Reed, D.R., and Coldwell, S.E. (2013). The bad taste of medicines: overview of basic research on bitter taste. *Clin Ther* 35, 1225-1246.

Merrill, L., Girard, B.M., May, V., and Vizzard, M.A. (2012). Transcriptional and translational plasticity in rodent urinary bladder TRP channels with urinary bladder inflammation, bladder dysfunction, or postnatal maturation. *J Mol Neurosci* 48, 744-756.

Mesa-Gresa, P., Perez-Martinez, A., and Redolat, R. (2013). Behavioral effects of combined environmental enrichment and chronic nicotine administration in male NMRI mice. *Physiol Behav* 114-115, 65-76.

Messer, K., Vijayaraghavan, M., White, M.M., Shi, Y., Chang, C., Conway, K.P., Hartman, A., Schroeder, M.J., Compton, W.M., and Pierce, J.P. (2015). Cigarette smoking cessation attempts among current US smokers who also use smokeless tobacco. *Addict Behav* 51, 113-119.

Messina, E.S., Tyndale, R.F., and Sellers, E.M. (1997). A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 1608-1614.

Mesulam, M.M., and Mufson, E.J. (1982). Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function. *J Comp Neurol* 212, 38-52.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I., and Wainer, B.H. (1984). Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12, 669-686.

Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., and Szallasi, A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3655-3660.

Miao, S., Beach, E.S., Sommer, T.J., Zimmerman, J.B., and Jordt, S.E. (2016). High-Intensity Sweeteners in Alternative Tobacco Products. *Nicotine Tob Res* 18, 2169-2173.

Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G.M., Drago, F., and Di Marzo, V. (2009). Altered responses of dopamine D3 receptor null mice to excitotoxic or anxiogenic stimuli: Possible involvement of the endocannabinoid and endovanilloid systems. *Neurobiol Dis* 36, 70-80.

Middleton, L.S., Cass, W.A., and Dvoskin, L.P. (2004). Nicotinic receptor modulation of dopamine transporter function in rat striatum and medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 367-377.

Miech, R., Patrick, M.E., O'Malley, P.M., and Johnston, L.D. (2017). What are kids vaping? Results from a national survey of US adolescents. *Tob Control* 26, 386-391.

Miech, R.A., O'Malley, P.M., Johnston, L.D., and Patrick, M.E. (2016). E-Cigarettes and the Drug Use Patterns of Adolescents. *Nicotine Tob Res* 18, 654-659.

Minaker, L.M., Ahmed, R., Hammond, D., and Manske, S. (2014). Flavored tobacco use among Canadian students in grades 9 through 12: prevalence and patterns from the 2010-2011 youth smoking survey. *Prev Chronic Dis* 11, E102.

Mineur, Y.S., and Picciotto, M.R. (2008). Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* 75, 323-333.

Miranda, M.I., Ramirez-Lugo, L., and Bermudez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882, 230-235.

Mitchell, S.N. (1993). Role of the locus coeruleus in the noradrenergic response to a systemic administration of nicotine. *Neuropharmacology* 32, 937-949.

Mitrovic, I., and Napier, T.C. (1998). Substance P attenuates and DAMGO potentiates amygdala glutamatergic neurotransmission within the ventral pallidum. *Brain Res* 792, 193-206.

Mobascher, A., and Winterer, G. (2008). The molecular and cellular neurobiology of nicotine abuse in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 41 Suppl 1, S51-59.

Mogenson, G.J., Jones, D.L., and Yim, C.Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14, 69-97.

Mogenson, G.J., and Yang, C.R. (1991). The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action. *Adv Exp Med Biol* 295, 267-290.

Moheimani, R.S., Bhettraratana, M., Yin, F., Peters, K.M., Gornbein, J., Araujo, J.A., and Middlekauff, H.R. (2017). Increased Cardiac Sympathetic Activity and Oxidative Stress in Habitual Electronic Cigarette Users: Implications for Cardiovascular Risk. *JAMA Cardiol* 2, 278-284.

Molander, L., Hansson, A., and Lunell, E. (2001). Pharmacokinetics of nicotine in healthy elderly people. *Clin Pharmacol Ther* 69, 57-65.

Molander, L., and Lunell, E. (2001). Pharmacokinetic investigation of a nicotine sublingual tablet. *Eur J Clin Pharmacol* 56, 813-819.

Morales-Perez, C.L., Noviello, C.M., and Hibbs, R.E. (2016). X-ray structure of the human alpha4beta2 nicotinic receptor. *Nature* 538, 411-415.

Morean, M.E., Butler, E.R., Bold, K.W., Kong, G., Camenga, D.R., Cavallo, D.A., Simon, P., O'Malley, S.S., and Krishnan-Sarin, S. (2018). Preferring more e-cigarette flavors is associated with e-cigarette use frequency among adolescents but not adults. *PLoS One* 13, e0189015.

Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y.A., Marti, F., Lambomez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., et al. (2014). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry* 19, 930-936.

Mouly, A.M., and Sullivan, R. (2010). Memory and Plasticity in the Olfactory System: From Infancy to Adulthood. In *The Neurobiology of Olfaction*, A. Menini, ed. (Boca Raton (FL)).

Mozell, M.M., Smith, B.P., Smith, P.E., Sullivan, R.L., Jr., and Swender, P. (1969). Nasal chemoreception in flavor identification. *Arch Otolaryngol* 90, 367-373.

Mueller, K.L., Hoon, M.A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434, 225-229.

Mufson, E.J., and Mesulam, M.M. (1984). Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol* 227, 109-120.

Mugnaini, M., Tessari, M., Tarter, G., Merlo Pich, E., Chiamulera, C., and Bunnemann, B. (2002). Upregulation of [3H]methyllycaconitine binding sites following continuous infusion of nicotine, without changes of alpha7 or alpha6 subunit mRNA: an autoradiography and in situ hybridization study in rat brain. *Eur J Neurosci* 16, 1633-1646.

Murphy, C., Cain, W.S., and Bartoshuk, L.M. (1977). Mutual action of taste and olfaction. *Sens Processes* 1, 204-211.

Murphy, S.E., Raulinaitis, V., and Brown, K.M. (2005). Nicotine 5'-oxidation and methyl oxidation by P450 2A enzymes. *Drug Metab Dispos* 33, 1166-1173.

Musella, A., De Chiara, V., Rossi, S., Prosperetti, C., Bernardi, G., Maccarrone, M., and Centonze, D. (2009). TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* 40, 89-97.

Naassila, M., Pierrefiche, O., Ledent, C., and Daoust, M. (2004). Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 46, 243-253.

Nader, J., Chauvet, C., Rawas, R.E., Favot, L., Jaber, M., Thiriet, N., and Solinas, M. (2012). Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 37, 1579-1587.

Nakashima, M., Uemura, M., Yasui, K., Ozaki, H.S., Tabata, S., and Taen, A. (2000). An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci Res* 36, 297-309.

Namburi, P., Al-Hasani, R., Calhoun, G.G., Bruchas, M.R., and Tye, K.M. (2016). Architectural Representation of Valence in the Limbic System. *Neuropsychopharmacology* 41, 1697-1715.

Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoun, G.G., Halbert, S.A., Wichmann, R., Holden, S.S., Mertens, K.L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A.C., *et al.* (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature* 520, 675-678.

Naneix, F., Darlot, F., Coutureau, E., and Cador, M. (2016). Long-lasting deficits in hedonic and nucleus accumbens reactivity to sweet rewards by sugar overconsumption during adolescence. *Eur J Neurosci* 43, 671-680.

Napier, T.C., Muench, M.B., Maslowski, R.J., and Battaglia, G. (1991). Is dopamine a neurotransmitter within the ventral pallidum/substantia innominata? *Adv Exp Med Biol* 295, 183-195.

Naquira, D., and Arqueros, L. (1978). Water intake in rats affected by addition of nicotine to drinking water. *Acta Physiol Lat Am* 28, 73-76.

Nashmi, R., Xiao, C., Deshpande, P., McKinney, S., Grady, S.R., Whiteaker, P., Huang, Q., McClure-Begley, T., Lindstrom, J.M., Labarca, C., *et al.* (2007). Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci* 27, 8202-8218.

Natividad, L.A., Torres, O.V., Friedman, T.C., and O'Dell, L.E. (2013). Adolescence is a period of development characterized by short- and long-term vulnerability to the rewarding effects of nicotine and reduced sensitivity to the anorectic effects of this drug. *Behav Brain Res* 257, 275-285.

Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390.

Nelson, V.A., Goniewicz, M.L., Beard, E., Brown, J., Sheals, K., West, R., and Shahab, L. (2015). Comparison of the characteristics of long-term users of electronic cigarettes versus nicotine replacement therapy: A cross-sectional survey of English ex-smokers and current smokers. *Drug Alcohol Depend* 153, 300-305.

Newhouse, P.A., Potter, A.S., Dumas, J.A., and Thiel, C.M. (2011). Functional brain imaging of nicotinic effects on higher cognitive processes. *Biochem Pharmacol* 82, 943-951.

Nguyen, T.L., Kwon, S.H., Hong, S.I., Ma, S.X., Jung, Y.H., Hwang, J.Y., Kim, H.C., Lee, S.Y., and Jang, C.G. (2014). Transient receptor potential vanilloid type 1 channel may modulate opioid reward. *Neuropsychopharmacology* 39, 2414-2422.

Nisell, M., Nomikos, G.G., and Svensson, T.H. (1994). Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Synapse* 16, 36-44.

Nisell, M., Nomikos, G.G., and Svensson, T.H. (1995). Nicotine dependence, midbrain dopamine systems and psychiatric disorders. *Pharmacol Toxicol* 76, 157-162.

Nishijo, H., Ono, T., Uwano, T., Kondoh, T., and Torii, K. (2000). Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *J Nutr* 130, 954S-959S.

Nonnemaker, J., Hersey, J., Homsy, G., Busey, A., Allen, J., and Vallone, D. (2013). Initiation with menthol cigarettes and youth smoking uptake. *Addiction* 108, 171-178.

Norberg, M., Stenlund, H., Lindahl, B., Boman, K., and Weinehall, L. (2006). Contribution of Swedish moist snuff to the metabolic syndrome: a wolf in sheep's clothing? *Scand J Public Health* 34, 576-583.

Norgren, R. (1976). Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 166, 17-30.

Norgren, R., Hajnal, A., and Mungarndee, S.S. (2006). Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol Behav* 89, 531-535.

Norgren, R., and Leonard, C.M. (1973). Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150, 217-237.

Nunez-Jaramillo, L., Jimenez, B., Ramirez-Munguia, N., Delint-Ramirez, I., Luna-Illades, C., Tapia, R., and Bermudez-Rattoni, F. (2008). Taste novelty induces intracellular redistribution of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor in the insular cortex. *Brain Res* 1215, 116-122.

Nunez-Parra, A., Li, A., and Restrepo, D. (2014). Coding odor identity and odor value in awake rodents. *Prog Brain Res* 208, 205-222.

O'Doherty, J., Kringelbach, M.L., Rolls, E.T., Hornak, J., and Andrews, C. (2001a). Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. *Nat Neurosci* 4, 95-102.

O'Doherty, J., Rolls, E.T., Francis, S., Bowtell, R., and McGlone, F. (2001b). Representation of pleasant and aversive taste in the human brain. *J Neurophysiol* 85, 1315-1321.

O'Doherty, J.P., Deichmann, R., Critchley, H.D., and Dolan, R.J. (2002). Neural responses during anticipation of a primary taste reward. *Neuron* 33, 815-826.

Ogawa, H., Hasegawa, K., and Murayama, N. (1992). Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. *Exp Brain Res* 91, 415-424.

Ogawa, H., Hayama, T., and Ito, S. (1984). Location and taste responses of parabrachio-thalamic relay neurons in rats. *Exp Neurol* 83, 507-517.

Ogawa, H., Hayama, T., and Yamashita, Y. (1988). Thermal sensitivity of neurons in a rostral part of the rat solitary tract nucleus. *Brain Res* 454, 321-331.

Ogawa, H., Ito, S., Murayama, N., and Hasegawa, K. (1990). Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neurosci Res* 9, 196-201.

Ohla, K., Yoshida, R., Roper, S.D., Di Lorenzo, P.M., Victor, J.D., Boughter, J.D., Fletcher, M., Katz, D.B., and Chaudhari, N. (2019). Recognizing Taste: Coding Patterns Along the Neural Axis in Mammals. *Chem Senses* 44, 237-247.

Olausson, P., Jentsch, J.D., and Taylor, J.R. (2004). Nicotine enhances responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 171, 173-178.

Olds, J. (1956). A preliminary mapping of electrical reinforcing effects in the rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 49, 281-285.

Olds, J., and 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.

Olender, T., Keydar, I., Pinto, J.M., Tatarsky, P., Alkelai, A., Chien, M.S., Fishilevich, S., Restrepo, D., Matsunami, H., Gilad, Y., *et al.* (2016). The human olfactory transcriptome. *BMC Genomics* 17, 619.

Olfert, I.M., DeVallance, E., Hoskinson, H., Branyan, K.W., Clayton, S., Pitzer, C.R., Sullivan, D.P., Breit, M.J., Wu, Z., Klinkhachorn, P., *et al.* (2018). Chronic exposure to electronic cigarettes results in impaired cardiovascular function in mice. *J Appl Physiol* (1985) 124, 573-582.

Oliveira-Maia, A.J., Stapleton-Kotloski, J.R., Lyall, V., Phan, T.H., Mummalaneni, S., Melone, P., Desimone, J.A., Nicolelis, M.A., and Simon, S.A. (2009). Nicotine activates TRPM5-dependent and independent taste pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1596-1601.

Oliver, A.J., Jensen, J.A., Vogel, R.I., Anderson, A.J., and Hatsukami, D.K. (2013). Flavored and nonflavored smokeless tobacco products: rate, pattern of use, and effects. *Nicotine Tob Res* 15, 88-92.

Omaiye, E.E., McWhirter, K.J., Luo, W., Pankow, J.F., and Talbot, P. (2019a). High-Nicotine Electronic Cigarette Products: Toxicity of JUUL Fluids and Aerosols Correlates Strongly with Nicotine and Some Flavor Chemical Concentrations. *Chem Res Toxicol* 32, 1058-1069.

Omaiye, E.E., McWhirter, K.J., Luo, W., Tierney, P.A., Pankow, J.F., and Talbot, P. (2019b). High concentrations of flavor chemicals are present in electronic cigarette refill fluids. *Sci Rep* 9, 2468.

Palazzolo, D.L. (2013). Electronic cigarettes and vaping: a new challenge in clinical medicine and public health. A literature review. *Front Public Health* 1, 56.

Palmatier, M.I., and Bevins, R.A. (2002). Examination of GABAergic and dopaminergic compounds in the acquisition of nicotine-conditioned hyperactivity in rats. *Neuropsychobiology* 45, 87-94.

Palmatier, M.I., Evans-Martin, F.F., Hoffman, A., Caggiula, A.R., Chaudhri, N., Donny, E.C., Liu, X., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., *et al.* (2006). Dissociating the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine using a rat self-administration paradigm with concurrently available drug and environmental reinforcers. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 391-400.

Palmatier, M.I., Lantz, J.E., O'Brien, L.C., and Metz, S.P. (2013). Effects of nicotine on olfactogustatory incentives: preference, palatability, and operant choice tests. *Nicotine Tob Res* 15, 1545-1554.

Palmatier, M.I., Liu, X., Caggiula, A.R., Donny, E.C., and Sved, A.F. (2007). The role of nicotinic acetylcholine receptors in the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine. *Neuropsychopharmacology* 32, 1098-1108.

Palmatier, M.I., O'Brien, L.C., and Hall, M.J. (2012). The role of conditioning history and reinforcer strength in the reinforcement enhancing effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 219, 1119-1131.

Palmatier, M.I., Smith, A.L., Odineal, E.M., Williams, E.A., Sheppard, A.B., and Bradley, C.A. (2019). Nicotine self-administration with tobacco flavor additives in male rats. *Nicotine Tob Res.*

Palmerino, C.C., Rusiniak, K.W., and Garcia, J. (1980). Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 208, 753-755.

Panagis, G., Miliaressis, E., Anagnostakis, Y., and Spyraiki, C. (1995). Ventral pallidum self-stimulation: a moveable electrode mapping study. *Behav Brain Res* 68, 165-172.

Panagis, G., Nomikos, G.G., Miliaressis, E., Chergui, K., Kastellakis, A., Svensson, T.H., and Spyraiki, C. (1997). Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in c-fos expression in reward-related brain regions. *Neuroscience* 77, 175-186.

Panagis, G., and Spyraiki, C. (1996). Neuropharmacological evidence for the role of dopamine in ventral pallidum self-stimulation. *Psychopharmacology (Berl)* 123, 280-288.

Panksepp, J.B., and Lahvis, G.P. (2007). Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav* 6, 661-671.

Panlilio, L.V., Hogarth, L., and Shoaib, M. (2015). Concurrent access to nicotine and sucrose in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 1451-1460.

Park, T.H., and Carr, K.D. (1998). Neuroanatomical patterns of fos-like immunoreactivity induced by a palatable meal and meal-paired environment in saline- and naltrexone-treated rats. *Brain Res* 805, 169-180.

Parker, L.A., and Carvell, T. (1986). Orofacial and somatic responses elicited by lithium-, nicotine- and amphetamine-paired sucrose solution. *Pharmacol Biochem Behav* 24, 883-887.

Parker, L.A., and Doucet, K. (1995). The effects of nicotine and nicotine withdrawal on taste reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 125-129.

Parkes, S.L., Ferreira, G., and Coutureau, E. (2016). Acquisition of specific response-outcome associations requires NMDA receptor activation in the basolateral amygdala but not in the insular cortex. *Neurobiol Learn Mem* 128, 40-45.

Pasumarthi, R.K., and Fadel, J. (2008). Activation of orexin/hypocretin projections to basal forebrain and paraventricular thalamus by acute nicotine. *Brain Res Bull* 77, 367-373.

Paton, J.J., Belova, M.A., Morrison, S.E., and Salzman, C.D. (2006). The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature* 439, 865-870.

Patrick, M.E., Miech, R.A., Carlier, C., O'Malley, P.M., Johnston, L.D., and Schulenberg, J.E. (2016). Self-reported reasons for vaping among 8th, 10th, and 12th graders in the US: Nationally-representative results. *Drug Alcohol Depend* 165, 275-278.

Pauly, J., Li, Q., and Barry, M.B. (2007). Tobacco-free electronic cigarettes and cigars deliver nicotine and generate concern. *Tob Control* 16, 357.

Peana, A.T., Muggironi, G., and Diana, M. (2010). Acetaldehyde-reinforcing effects: a study on oral self-administration behavior. *Front Psychiatry* 1, 23.

Pecina, S., and Berridge, K.C. (2005). Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci* 25, 11777-11786.

Pecina, S., Berridge, K.C., and Parker, L.A. (1997). Pimozide does not shift palatability: separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 58, 801-811.

Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W., and Zhuang, X. (2003). Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci* 23, 9395-9402.

Pelloux, Y., Giorla, E., Montanari, C., and Baunez, C. (2019). Social modulation of drug use and drug addiction. *Neuropharmacology* 159, 107545.

Pepper, J.K., Gilkey, M.B., and Brewer, N.T. (2015). Physicians' Counseling of Adolescents Regarding E-Cigarette Use. *J Adolesc Health* 57, 580-586.

Pepper, J.K., Ribisl, K.M., and Brewer, N.T. (2016). Adolescents' interest in trying flavoured e-cigarettes. *Tob Control* 25, ii62-ii66.

Perez, C.A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J.A., Preuss, A.K., Zhang, H., Max, M., and Margolskee, R.F. (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5, 1169-1176.

Perkins, K.A., Gerlach, D., Vender, J., Grobe, J., Meeker, J., and Hutchison, S. (2001). Sex differences in the subjective and reinforcing effects of visual and olfactory cigarette smoke stimuli. *Nicotine Tob Res* 3, 141-150.

Perkins, K.A., and Karelitz, J.L. (2013). Influence of reinforcer magnitude and nicotine amount on smoking's acute reinforcement enhancing effects. *Drug Alcohol Depend* 133, 167-171.

Perrotto, R.S., and Scott, T.R. (1976). Gustatory neural coding in the pons. *Brain Res* 110, 283-300.

Perry, D.C., Xiao, Y., Nguyen, H.N., Musachio, J.L., Davila-Garcia, M.I., and Kellar, K.J. (2002). Measuring nicotinic receptors with characteristics of alpha4beta2, alpha3beta2 and alpha3beta4 subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem* 82, 468-481.

Piano, M.R., Benowitz, N.L., Fitzgerald, G.A., Corbridge, S., Heath, J., Hahn, E., Pechacek, T.F., Howard, G., and American Heart Association Council on Cardiovascular, N. (2010). Impact of smokeless tobacco products

on cardiovascular disease: implications for policy, prevention, and treatment: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* 122, 1520-1544.

Piazza, P.V., and Le Moal, M.L. (1996). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 359-378.

Picciotto, M.R., Zoli, M., Lena, C., Bessis, A., Lallemand, Y., Le Novere, N., Vincent, P., Pich, E.M., Brulet, P., and Changeux, J.P. (1995). Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374, 65-67.

Pich, E.M., Pagliusi, S.R., Tessari, M., Talabot-Ayer, D., Hooft van Huijsduijnen, R., and Chiamulera, C. (1997). Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275, 83-86.

Pickworth, W.B., Moolchan, E.T., Berlin, I., and Murty, R. (2002). Sensory and physiologic effects of menthol and non-menthol cigarettes with differing nicotine delivery. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 55-61.

Pidoplichko, V.I., DeBiasi, M., Williams, J.T., and Dani, J.A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390, 401-404.

Pierce, J., and Halpern, B.P. (1996). Orthonasal and retronasal odorant identification based upon vapor phase input from common substances. *Chem Senses* 21, 529-543.

Piette, C.E., Baez-Santiago, M.A., Reid, E.E., Katz, D.B., and Moran, A. (2012). Inactivation of basolateral amygdala specifically eliminates palatability-related information in cortical sensory responses. *J Neurosci* 32, 9981-9991.

Pina, J.A., Namba, M.D., Leyrer-Jackson, J.M., Cabrera-Brown, G., and Gipson, C.D. (2018). Social Influences on Nicotine-Related Behaviors. *Int Rev Neurobiol* 140, 1-32.

Piper, M.E., Piasecki, T.M., Federman, E.B., Bolt, D.M., Smith, S.S., Fiore, M.C., and Baker, T.B. (2004). A multiple motives approach to tobacco dependence: the Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives (WISDM-68). *J Consult Clin Psychol* 72, 139-154.

Placzek, A.N., and Dani, J.A. (2009). Synaptic plasticity within midbrain dopamine centers contributes to nicotine addiction. *Nebr Symp Motiv* 55, 5-15.

Plassmann, H., O'Doherty, J., Shiv, B., and Rangel, A. (2008). Marketing actions can modulate neural representations of experienced pleasantness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1050-1054.

Pomerleau, C.S., and Pomerleau, O.F. (1992). Euphoriant effects of nicotine in smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 108, 460-465.

Pomerleau, O.F. (1992). Nicotine and the central nervous system: biobehavioral effects of cigarette smoking. *Am J Med* 93, 2S-7S.

Pomerleau, O.F., Collins, A.C., Shiffman, S., and Pomerleau, C.S. (1993). Why some people smoke and others do not: new perspectives. *J Consult Clin Psychol* 61, 723-731.

Pontieri, F.E., Tanda, G., and Di Chiara, G. (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12304-12308.

Pontieri, F.E., Tanda, G., Orzi, F., and Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382, 255-257.

Ponzone, L., Moretti, M., Sala, M., Fasoli, F., Mucchietto, V., Lucini, V., Cannazza, G., Gallesi, G., Castellana, C.N., Clementi, F., *et al.* (2015). Different physiological and behavioural effects of e-cigarette vapour and cigarette smoke in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 25, 1775-1786.

Popova, L., and Ling, P.M. (2013). Alternative tobacco product use and smoking cessation: a national study. *Am J Public Health* 103, 923-930.

Potvin, S., Stip, E., and Roy, J.Y. (2003). [Schizophrenia and addiction: An evaluation of the self-medication hypothesis]. *Encephale* 29, 193-203.

Prescott, J., and Stevenson, R.J. (1995). Effects of oral chemical irritation on tastes and flavors in frequent and infrequent users of chili. *Physiol Behav* 58, 1117-1127.

Pritchard, T.C., Hamilton, R.B., Morse, J.R., and Norgren, R. (1986). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 244, 213-228.

Pritchard, T.C., Macaluso, D.A., and Eslinger, P.J. (1999). Taste perception in patients with insular cortex lesions. *Behav Neurosci* 113, 663-671.

Pritchard, W.S., Robinson, J.H., Guy, T.D., Davis, R.A., and Stiles, M.F. (1996). Assessing the sensory role of nicotine in cigarette smoking. *Psychopharmacology (Berl)* 127, 55-62.

Proulx, C.D., Hikosaka, O., and Malinow, R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17, 1146-1152.

Pushkin, A.N., Eugene, A.J., Lallai, V., Torres-Mendoza, A., Fowler, J.P., Chen, E., and Fowler, C.D. (2019). Cannabinoid and nicotine exposure during adolescence induces sex-specific effects on anxiety- and reward-related behaviors during adulthood. *PLoS One* 14, e0211346.

Quester, S., and Romanczuk-Seiferth, N. (2015). Brain Imaging in Gambling Disorder. *Curr Addict Rep* 2, 220-229.

Quick, M.W., and Lester, R.A. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53, 457-478.

Rada, P.V., Mark, G.P., Yeomans, J.J., and Hoebel, B.G. (2000). Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 65, 375-379.

Ramirez, F., Moscarello, J.M., LeDoux, J.E., and Sears, R.M. (2015). Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit. *J Neurosci* 35, 3470-3477.

Ranganath, C., and Rainer, G. (2003). Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nat Rev Neurosci* 4, 193-202.

Rangel-Gomez, M., Cruz-Cano, R., Van Wagoner, C., Kidanu, A., McDonald, C.G., and Clark, P.I. (2019). Dissociating the effect of flavor and nicotine in smokeless tobacco products using electroencephalography: The case of wintergreen flavors. *Addict Behav* 91, 82-89.

Rao, P.D., Nanding, H., Strasser, A.A., and Wise, P.M. (2018). Pilot Experiment: The Effect of Added Flavorants on the Taste and Pleasantness of Mixtures of Glycerol and Propylene Glycol. *Chemosens Percept* 11, 1-9.

Reep, R.L., and Winans, S.S. (1982a). Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster *Mesocricetus auratus*. *Neuroscience* 7, 1265-1288.

Reep, R.L., and Winans, S.S. (1982b). Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, *Mesocricetus auratus*. *Neuroscience* 7, 2609-2635.

Reid, M.S., Ho, L.B., and Berger, S.P. (1996). Effects of environmental conditioning on the development of nicotine sensitization: behavioral and neurochemical analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 126, 301-310.

Reid, M.S., Ho, L.B., and Berger, S.P. (1998). Behavioral and neurochemical components of nicotine sensitization following 15-day pretreatment: studies on contextual conditioning. *Behav Pharmacol* 9, 137-148.

Reisiger, A.R., Kaufling, J., Manzoni, O., Cador, M., Georges, F., and Caille, S. (2014). Nicotine self-administration induces CB1-dependent LTP in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 34, 4285-4292.

Rezvani, A.H., and Levin, E.D. (2001). Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* 49, 258-267.

Rezvani, A.H., Slade, S., Wells, C., Petro, A., Lumeng, L., Li, T.K., Xiao, Y., Brown, M.L., Paige, M.A., McDowell, B.E., *et al.* (2010). Effects of sazetidine-A, a selective alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor desensitizing agent on alcohol and nicotine self-administration in selectively bred alcohol-preferring (P) rats. *Psychopharmacology (Berl)* 211, 161-174.

Rice, M.E., and Cragg, S.J. (2004). Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat Neurosci* 7, 583-584.

Rinker, J.A., Busse, G.D., and Riley, A.L. (2008). An assessment of sex differences in nicotine-induced conditioned taste aversions. *Pharmacol Biochem Behav* 88, 427-431.

Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78, 625-636.

Roberts, J.C., Davis, J.B., and Benham, C.D. (2004). [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res* 995, 176-183.

Robinson, S., Sandstrom, S.M., Denenberg, V.H., and Palmiter, R.D. (2005). Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav Neurosci* 119, 5-15.

Robinson, S.F., Marks, M.J., and Collins, A.C. (1996). Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 124, 332-339.

Robinson, T.E., and Berridge, K.C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 247-291.

Robinson, T.E., and Berridge, K.C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96, 103-114.

Rogers, W.R., Wilbur, R.L., Bass, R.L., 3rd, and Johnson, D.E. (1985). Effects of cigarette nicotine content on smoking behavior of baboons. *Addict Behav* 10, 225-233.

Roitman, M.F., Wheeler, R.A., and Carelli, R.M. (2005). Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron* 45, 587-597.

Roitman, M.F., Wheeler, R.A., Wightman, R.M., and Carelli, R.M. (2008). Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nat Neurosci* 11, 1376-1377.

Rolls, E.T. (2000). The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* 10, 284-294.

Rolls, E.T. (2005). Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol Behav* 85, 45-56.

Rolls, E.T., Kringelbach, M.L., and de Araujo, I.E. (2003a). Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. *Eur J Neurosci* 18, 695-703.

Rolls, E.T., O'Doherty, J., Kringelbach, M.L., Francis, S., Bowtell, R., and McGlone, F. (2003b). Representations of pleasant and painful touch in the human orbitofrontal and cingulate cortices. *Cereb Cortex* 13, 308-317.

Rolls, E.T., Sienkiewicz, Z.J., and Yaxley, S. (1989). Hunger Modulates the Responses to Gustatory Stimuli of Single Neurons in the Caudolateral Orbitofrontal Cortex of the Macaque Monkey. *Eur J Neurosci* *1*, 53-60.

Rolls, E.T., Verhagen, J.V., and Kadohisa, M. (2003c). Representations of the texture of food in the primate orbitofrontal cortex: neurons responding to viscosity, grittiness, and capsaicin. *J Neurophysiol* *90*, 3711-3724.

Rosbrook, K., and Green, B.G. (2016). Sensory Effects of Menthol and Nicotine in an E-Cigarette. *Nicotine Tob Res* *18*, 1588-1595.

Rose, J.E. (2006). Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology (Berl)* *184*, 274-285.

Rose, J.E., and Behm, F.M. (2004). Extinguishing the rewarding value of smoke cues: pharmacological and behavioral treatments. *Nicotine Tob Res* *6*, 523-532.

Rose, J.E., Behm, F.M., and Levin, E.D. (1993). Role of nicotine dose and sensory cues in the regulation of smoke intake. *Pharmacol Biochem Behav* *44*, 891-900.

Rose, J.E., Behm, F.M., Westman, E.C., and Johnson, M. (2000). Dissociating nicotine and nonnicotine components of cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav* *67*, 71-81.

Rose, J.E., and Corrigan, W.A. (1997). Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences. *Psychopharmacology (Berl)* *130*, 28-40.

Rose, J.E., and Levin, E.D. (1991). Inter-relationships between conditioned and primary reinforcement in the maintenance of cigarette smoking. *Br J Addict* *86*, 605-609.

Rose, J.E., Tashkin, D.P., Ertle, A., Zinser, M.C., and Lafer, R. (1985). Sensory blockade of smoking satisfaction. *Pharmacol Biochem Behav* *23*, 289-293.

Rose, J.E., Westman, E.C., Behm, F.M., Johnson, M.P., and Goldberg, J.S. (1999). Blockade of smoking satisfaction using the peripheral nicotinic antagonist trimethaphan. *Pharmacol Biochem Behav* *62*, 165-172.

Rosenstein, D., and Oster, H. (1988). Differential facial responses to four basic tastes in newborns. *Child Dev* *59*, 1555-1568.

Roudnitzky, N., Bult, J.H., de Wijk, R.A., Reden, J., Schuster, B., and Hummel, T. (2011). Investigation of interactions between texture and ortho- and retronasal olfactory stimuli using psychophysical and electrophysiological approaches. *Behav Brain Res* *216*, 109-115.

Rowell, P.P., Hurst, H.E., Marlowe, C., and Bennett, B.D. (1983). Oral administration of nicotine: its uptake and distribution after chronic administration to mice. *J Pharmacol Methods* *9*, 249-261.

Rozin, P. (1982). "Taste-smell confusions" and the duality of the olfactory sense. *Percept Psychophys* *31*, 397-401.

Rudenga, K., Green, B., Nachtigal, D., and Small, D.M. (2010). Evidence for an integrated oral sensory module in the human anterior ventral insula. *Chem Senses* *35*, 693-703.

Rudenga, K.J., and Small, D.M. (2013). Ventromedial prefrontal cortex response to concentrated sucrose reflects liking rather than sweet quality coding. *Chem Senses* *38*, 585-594.

Rusk, I.N., and Cooper, S.J. (1989). The selective dopamine D1 receptor agonist SK&F 38393: its effects on palatability- and deprivation-induced feeding, and operant responding for food. *Pharmacol Biochem Behav* *34*, 17-22.

Rusted, J.M., and Warburton, D.M. (1992). Facilitation of memory by post-trial administration of nicotine: evidence for an attentional explanation. *Psychopharmacology (Berl)* *108*, 452-455.

Saccone, S.F., Hinrichs, A.L., Saccone, N.L., Chase, G.A., Konvicka, K., Madden, P.A., Breslau, N., Johnson, E.O., Hatsukami, D., Pomerleau, O., *et al.* (2007). Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet* *16*, 36-49.

Saddoris, M.P., Gallagher, M., and Schoenbaum, G. (2005). Rapid associative encoding in basolateral amygdala depends on connections with orbitofrontal cortex. *Neuron* *46*, 321-331.

Salas, R., Sturm, R., Boulter, J., and De Biasi, M. (2009). Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J Neurosci* *29*, 3014-3018.

Samanta, A., Hughes, T.E.T., and Moiseenkova-Bell, V.Y. (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* *87*, 141-165.

Sammons, J.D., Weiss, M.S., Escanilla, O.D., Fooden, A.F., Victor, J.D., and Di Lorenzo, P.M. (2016). Spontaneous Changes in Taste Sensitivity of Single Units Recorded over Consecutive Days in the Brainstem of the Awake Rat. *PLoS One* *11*, e0160143.

Samuelsen, C.L., and Fontanini, A. (2017). Processing of Intraoral Olfactory and Gustatory Signals in the Gustatory Cortex of Awake Rats. *J Neurosci* *37*, 244-257.

Samuelsen, C.L., Gardner, M.P., and Fontanini, A. (2012). Effects of cue-triggered expectation on cortical processing of taste. *Neuron* *74*, 410-422.

Samuelsen, C.L., Gardner, M.P., and Fontanini, A. (2013). Thalamic contribution to cortical processing of taste and expectation. *J Neurosci* *33*, 1815-1827.

Sanchez, J.F., Krause, J.E., and Cortright, D.N. (2001). The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* *107*, 373-381.

Saper, C.B., and Loewy, A.D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 197, 291-317.

Sarter, M., Hasselmo, M.E., Bruno, J.P., and Givens, B. (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 98-111.

Saunders, C.J., Li, W.Y., Patel, T.D., Muday, J.A., and Silver, W.L. (2013). Dissecting the role of TRPV1 in detecting multiple trigeminal irritants in three behavioral assays for sensory irritation. *F1000Res* 2, 74.

Schier, L.A., Hashimoto, K., Bales, M.B., Blonde, G.D., and Spector, A.C. (2014). High-resolution lesion-mapping strategy links a hot spot in rat insular cortex with impaired expression of taste aversion learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 1162-1167.

Schneider, S., and Diehl, K. (2016). Vaping as a Catalyst for Smoking? An Initial Model on the Initiation of Electronic Cigarette Use and the Transition to Tobacco Smoking Among Adolescents. *Nicotine Tob Res* 18, 647-653.

Schneller, L.M., Bansal-Travers, M., Goniewicz, M.L., McIntosh, S., Ossip, D., and O'Connor, R.J. (2018). Use of flavored electronic cigarette refill liquids among adults and youth in the US-Results from Wave 2 of the Population Assessment of Tobacco and Health Study (2014-2015). *PLoS One* 13, e0202744.

Schnoll, R.A., Patterson, F., Wileyto, E.P., Tyndale, R.F., Benowitz, N., and Lerman, C. (2009). Nicotine metabolic rate predicts successful smoking cessation with transdermal nicotine: a validation study. *Pharmacol Biochem Behav* 92, 6-11.

Schober, W., Szendrei, K., Matzen, W., Osiander-Fuchs, H., Heitmann, D., Schettgen, T., Jorres, R.A., and Fromme, H. (2014). Use of electronic cigarettes (e-cigarettes) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of e-cigarette consumers. *Int J Hyg Environ Health* 217, 628-637.

Schoedel, K.A., Hoffmann, E.B., Rao, Y., Sellers, E.M., and Tyndale, R.F. (2004). Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 14, 615-626.

Schoenbaum, G., Chiba, A.A., and Gallagher, M. (1999). Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J Neurosci* 19, 1876-1884.

Schroeder, C.E., and Foxe, J. (2005). Multisensory contributions to low-level, 'unisensory' processing. *Curr Opin Neurobiol* 15, 454-458.

Schwieterman, M.L., Colquhoun, T.A., Jaworski, E.A., Bartoshuk, L.M., Gilbert, J.L., Tieman, D.M., Odabasi, A.Z., Moskowitz, H.R., Foltz, K.M., Klee, H.J., *et al.* (2014). Strawberry flavor: diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLoS One* 9, e88446.

Sclafani, A. (2004). Oral and postoral determinants of food reward. *Physiol Behav* 81, 773-779.

Scott, A., Lugg, S.T., Aldridge, K., Lewis, K.E., Bowden, A., Mahida, R.Y., Grudzinska, F.S., Dosanjh, D., Parekh, D., Foronjy, R., *et al.* (2018). Pro-inflammatory effects of e-cigarette vapour condensate on human alveolar macrophages. *Thorax* 73, 1161-1169.

Scott, T.R. (1992). Taste: the neural basis of body wisdom. *World Rev Nutr Diet* 67, 1-39.

Scott, T.R., Giza, B.K., and Yan, J. (1999). Gustatory neural coding in the cortex of the alert cynomolgus macaque: the quality of bitterness. *J Neurophysiol* 81, 60-71.

Scott, T.R., and Mark, G.P. (1987). The taste system encodes stimulus toxicity. *Brain Res* 414, 197-203.

Scott, T.R., Yaxley, S., Sienkiewicz, Z.J., and Rolls, E.T. (1986). Gustatory responses in the frontal opercular cortex of the alert cynomolgus monkey. *J Neurophysiol* 56, 876-890.

Sellings, L.H., Baharnouri, G., McQuade, L.E., and Clarke, P.B. (2008). Rewarding and aversive effects of nicotine are segregated within the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 28, 342-352.

Severson, H.H., Forrester, K.K., and Biglan, A. (2007). Use of smokeless tobacco is a risk factor for cigarette smoking. *Nicotine Tob Res* 9, 1331-1337.

Sewards, T.V., and Sewards, M.A. (2001). Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 395-407.

Shabel, S.J., and Janak, P.H. (2009). Substantial similarity in amygdala neuronal activity during conditioned appetitive and aversive emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15031-15036.

Shahab, L., and Goniewicz, M. (2014). Electronic cigarettes are at least as effective as nicotine patches for smoking cessation. *Evid Based Med* 19, 133.

Shang, X., Shang, Y., Fu, J., and Zhang, T. (2017). Nicotine Significantly Improves Chronic Stress-Induced Impairments of Cognition and Synaptic Plasticity in Mice. *Mol Neurobiol* 54, 4644-4658.

Shi, C.J., and Cassell, M.D. (1998). Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol* 399, 440-468.

Shiffman, S., Dunbar, M.S., Kirchner, T.R., Li, X., Tindle, H.A., Anderson, S.J., Scholl, S.M., and Ferguson, S.G. (2013). Cue reactivity in non-daily smokers: effects on craving and on smoking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 321-333.

Shiffman, S., Gnys, M., Richards, T.J., Paty, J.A., Hickcox, M., and Kassel, J.D. (1996). Temptations to smoke after quitting: a comparison of lapsers and maintainers. *Health Psychol* 15, 455-461.

Shiffman, S., Waters, A., and Hickcox, M. (2004). The nicotine dependence syndrome scale: a multidimensional measure of nicotine dependence. *Nicotine Tob Res* 6, 327-348.

Shimura, T., Imaoka, H., and Yamamoto, T. (2006). Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. *Eur J Neurosci* 23, 1596-1604.

Shimura, T., Kamada, Y., and Yamamoto, T. (2002). Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav Brain Res* 134, 123-130.

Shiple, M.T., and Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30, 123-176.

Shiple, M.T., and Geinisman, Y. (1984). Anatomical evidence for convergence of olfactory, gustatory, and visceral afferent pathways in mouse cerebral cortex. *Brain Res Bull* 12, 221-226.

Shoaib, M., Stolerman, I.P., and Kumar, R.C. (1994). Nicotine-induced place preferences following prior nicotine exposure in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 113, 445-452.

Sikora, M., Nicolas, C., Istin, M., Jaafari, N., Thiriet, N., and Solinas, M. (2018). Generalization of effects of environmental enrichment on seeking for different classes of drugs of abuse. *Behav Brain Res* 341, 109-113.

Simon, S.A., de Araujo, I.E., Gutierrez, R., and Nicolelis, M.A. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci* 7, 890-901.

Simons, C.T., Boucher, Y., Carstens, M.I., and Carstens, E. (2006). Nicotine suppression of gustatory responses of neurons in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* 96, 1877-1886.

Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158, 343-359.

Siu, E.C., and Tyndale, R.F. (2007). Characterization and comparison of nicotine and cotinine metabolism in vitro and in vivo in DBA/2 and C57BL/6 mice. *Mol Pharmacol* 71, 826-834.

Small, D.M. (2012). Flavor is in the brain. *Physiol Behav* 107, 540-552.

Small, D.M., Gerber, J.C., Mak, Y.E., and Hummel, T. (2005). Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron* 47, 593-605.

Small, D.M., and Green, B.G. (2012). A Proposed Model of a Flavor Modality. In *The Neural Bases of Multisensory Processes*, M.M. Murray, and M.T. Wallace, eds. (Boca Raton (FL)).

Small, D.M., Jones-Gotman, M., and Dagher, A. (2003). Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 19, 1709-1715.

Small, D.M., Jones-Gotman, M., Zatorre, R.J., Petrides, M., and Evans, A.C. (1997). Flavor processing: more than the sum of its parts. *Neuroreport* 8, 3913-3917.

Small, D.M., and Prescott, J. (2005). Odor/taste integration and the perception of flavor. *Exp Brain Res* 166, 345-357.

Small, D.M., Veldhuizen, M.G., and Green, B. (2013). Sensory neuroscience: taste responses in primary olfactory cortex. *Curr Biol* 23, R157-159.

Small, D.M., Voss, J., Mak, Y.E., Simmons, K.B., Parrish, T., and Gitelman, D. (2004). Experience-dependent neural integration of taste and smell in the human brain. *J Neurophysiol* 92, 1892-1903.

Small, D.M., Zatorre, R.J., Dagher, A., Evans, A.C., and Jones-Gotman, M. (2001). Changes in brain activity related to eating chocolate: from pleasure to aversion. *Brain* 124, 1720-1733.

Small, E., Shah, H.P., Davenport, J.J., Geier, J.E., Yavarovich, K.R., Yamada, H., Sabarinath, S.N., Derendorf, H., Pauly, J.R., Gold, M.S., *et al.* (2010). Tobacco smoke exposure induces nicotine dependence in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 208, 143-158.

Smith-Swintosky, V.L., Plata-Salaman, C.R., and Scott, T.R. (1991). Gustatory neural coding in the monkey cortex: stimulus quality. *J Neurophysiol* 66, 1156-1165.

Smith, A., and Roberts, D.C. (1995). Oral self-administration of sweetened nicotine solutions by rats. *Psychopharmacology (Berl)* 120, 341-346.

Smith, D.V., and Margolskee, R.F. (2001). Making sense of taste. *Sci Am* 284, 32-39.

Smith, J.C., Williams, D.P., and Jue, S.H. (1976). Rapid oral mixing of glucose and saccharin by rats. *Science* 191, 304-305.

Smith, K.S., and Berridge, K.C. (2005). The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci* 25, 8637-8649.

Smith, K.S., and Berridge, K.C. (2007). Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci* 27, 1594-1605.

Sng, J.C., Taniura, H., and Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 27, 606-612.

Soares, E.S., Stapleton, J.R., Rodriguez, A., Fitzsimmons, N., Oliveira, L., Nicolelis, M.A., and Simon, S.A. (2007). Behavioral and neural responses to gustatory stimuli delivered non-contingently through intra-oral cannulas. *Physiol Behav* 92, 629-642.

Soderpalm, A.H., and Berridge, K.C. (2000). The hedonic impact and intake of food are increased by midazolam microinjection in the parabrachial nucleus. *Brain Res* 877, 288-297.

Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R., and Jaber, M. (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 17145-17150.

Soneji, S., Barrington-Trimis, J.L., Wills, T.A., Leventhal, A.M., Unger, J.B., Gibson, L.A., Yang, J., Primack, B.A., Andrews, J.A., Miech, R.A., *et al.* (2017). Association Between Initial Use of e-Cigarettes and Subsequent Cigarette Smoking Among Adolescents and Young Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr* *171*, 788-797.

Sorge, R.E., and Clarke, P.B. (2009). Rats self-administer intravenous nicotine delivered in a novel smoking-relevant procedure: effects of dopamine antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* *330*, 633-640.

Soto, A., Gasalla, P., Begega, A., and Lopez, M. (2017). c-Fos activity in the insular cortex, nucleus accumbens and basolateral amygdala following the intraperitoneal injection of saccharin and lithium chloride. *Neurosci Lett* *647*, 32-37.

Soule, E.K., Lopez, A.A., Guy, M.C., and Cobb, C.O. (2016a). Reasons for using flavored liquids among electronic cigarette users: A concept mapping study. *Drug Alcohol Depend* *166*, 168-176.

Soule, E.K., Maloney, S.F., Spindle, T.R., Rudy, A.K., Hiler, M.M., and Cobb, C.O. (2017). Electronic cigarette use and indoor air quality in a natural setting. *Tob Control* *26*, 109-112.

Soule, E.K., Rosas, S.R., and Nasim, A. (2016b). Reasons for electronic cigarette use beyond cigarette smoking cessation: A concept mapping approach. *Addict Behav* *56*, 41-50.

Soussy, S., El-Hellani, A., Baalbaki, R., Salman, R., Shihadeh, A., and Saliba, N.A. (2016). Detection of 5-hydroxymethylfurfural and furfural in the aerosol of electronic cigarettes. *Tob Control* *25*, ii88-ii93.

Sparks, J.A., and Pauly, J.R. (1999). Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* *141*, 145-153.

Spear, L.P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* *24*, 417-463.

Spector, A.C., Klumpp, P.A., and Kaplan, J.M. (1998). Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behav Neurosci* *112*, 678-694.

Spector, A.C., and Travers, S.P. (2005). The representation of taste quality in the mammalian nervous system. *Behav Cogn Neurosci Rev* *4*, 143-191.

Spence, C. (2015). Multisensory flavor perception. *Cell* *161*, 24-35.

St Helen, G., Dempsey, D.A., Havel, C.M., Jacob, P., 3rd, and Benowitz, N.L. (2017). Impact of e-liquid flavors on nicotine intake and pharmacology of e-cigarettes. *Drug Alcohol Depend* *178*, 391-398.

St Helen, G., Havel, C., Dempsey, D.A., Jacob, P., 3rd, and Benowitz, N.L. (2016). Nicotine delivery, retention and pharmacokinetics from various electronic cigarettes. *Addiction* *111*, 535-544.

Steen, K.H., and Reeh, P.W. (1993). Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, *in vitro*. *J Neurophysiol* *70*, 397-405.

Stein, B.E. (1998). Neural mechanisms for synthesizing sensory information and producing adaptive behaviors. *Exp Brain Res* *123*, 124-135.

Steiner, J.E. (1973). The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symp Oral Sens Percept*, 254-278.

Steiner, J.E. (1979). Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. *Adv Child Dev Behav* *13*, 257-295.

Steiner, J.E., Glaser, D., Hawilo, M.E., and Berridge, K.C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev* *25*, 53-74.

Stevenson, R.J., and Oaten, M.J. (2010). Sweet odours and sweet tastes are conflated in memory. *Acta Psychol (Amst)* *134*, 105-109.

Stevenson, R.J., Prescott, J., and Boakes, R.A. (1995). The acquisition of taste properties by odors. *Learning and Motivation* *26*, 433-455.

Stevenson, R.J., Prescott, J., and Boakes, R.A. (1999). Confusing tastes and smells: how odours can influence the perception of sweet and sour tastes. *Chem Senses* *24*, 627-635.

Stoker, A.K., Semenova, S., and Markou, A. (2008). Affective and somatic aspects of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in C57BL/6J and BALB/cByJ mice. *Neuropharmacology* *54*, 1223-1232.

Stolerman, I.P. (1999). Inter-species consistency in the behavioural pharmacology of nicotine dependence. *Behav Pharmacol* *10*, 559-580.

Stolerman, I.P., and Jarvis, M.J. (1995). The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)* *117*, 2-10; discussion 14-20.

Stone, L.M., Tan, S.S., Tam, P.P., and Finger, T.E. (2002). Analysis of cell lineage relationships in taste buds. *J Neurosci* *22*, 4522-4529.

Stuber, G.D., Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., van Leeuwen, W.A., Hardjoprajitno, J.E., Cho, S., Tye, K.M., Kempadoo, K.A., Zhang, F., Deisseroth, K., *et al.* (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature* *475*, 377-380.

Suarez, A.B., Ifran, M.C., Pautassi, R.M., and Kamenetzky, G.V. (2017). Changes in sucrose and quinine taste reactivity patterns in infant rat pups after exposure to the other tastant. *Appetite* *114*, 259-264.

Sullivan, P.F., and Kendler, K.S. (1999). The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res* *1 Suppl 2*, S51-57; discussion S69-70.

Sussan, T.E., Gajghate, S., Thimmulappa, R.K., Ma, J., Kim, J.H., Sudini, K., Consolini, N., Cormier, S.A., Lomnicki, S., Hasan, F., *et al.* (2015). Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS One* *10*, e0116861.

Sutherland, R.J. (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci Biobehav Rev* *6*, 1-13.

Szabo, T., Biro, T., Gonzalez, A.F., Palkovits, M., and Blumberg, P.M. (2002). Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* *98*, 51-57.

Szallasi, A., and Blumberg, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* *51*, 159-212.

Taha, S.A., and Fields, H.L. (2005). Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J Neurosci* *25*, 1193-1202.

Takahashi, Y.K., Langdon, A.J., Niv, Y., and Schoenbaum, G. (2016). Temporal Specificity of Reward Prediction Errors Signaled by Putative Dopamine Neurons in Rat VTA Depends on Ventral Striatum. *Neuron* *91*, 182-193.

Talavera, K., Gees, M., Karashima, Y., Meseguer, V.M., Vanoirbeek, J.A., Damann, N., Everaerts, W., Benoit, M., Janssens, A., Vennekens, R., *et al.* (2009). Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* *12*, 1293-1299.

Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F., and Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* *438*, 1022-1025.

Talhout, R., Opperhuizen, A., and van Amsterdam, J.G. (2006). Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. *Food Chem Toxicol* *44*, 1789-1798.

Tan, H., Bishop, S.F., Lauzon, N.M., Sun, N., and Laviolette, S.R. (2009). Chronic nicotine exposure switches the functional role of mesolimbic dopamine transmission in the processing of nicotine's rewarding and aversive effects. *Neuropharmacology* *56*, 741-751.

Tanabe, T., Iino, M., and Takagi, S.F. (1975a). Discrimination of odors in olfactory bulb, pyriform-amygdaloid areas, and orbitofrontal cortex of the monkey. *J Neurophysiol* *38*, 1284-1296.

Tanabe, T., Yarita, H., Iino, M., Ooshima, Y., and Takagi, S.F. (1975b). An olfactory projection area in orbitofrontal cortex of the monkey. *J Neurophysiol* *38*, 1269-1283.

Tandon, S., Keefe, K.A., and Taha, S.A. (2017). Mu opioid receptor signaling in the nucleus accumbens shell increases responsiveness of satiety-modulated lateral hypothalamus neurons. *Eur J Neurosci* *45*, 1418-1430.

Thiel, C.M. (2003). Cholinergic modulation of learning and memory in the human brain as detected with functional neuroimaging. *Neurobiol Learn Mem* *80*, 234-244.

Thiel, K.J., Sanabria, F., and Neisewander, J.L. (2009). Synergistic interaction between nicotine and social rewards in adolescent male rats. *Psychopharmacology (Berl)* *204*, 391-402.

Thuerauf, N., Markovic, K., Braun, G., Bleich, S., Reulbach, U., Kornhuber, J., and Lunkenheimer, J. (2006). The influence of mecamylamine on trigeminal and olfactory chemoreception of nicotine. *Neuropsychopharmacology* *31*, 450-461.

Tian, Y.H., Lee, S.Y., Kim, H.C., and Jang, C.G. (2010). Repeated methamphetamine treatment increases expression of TRPV1 mRNA in the frontal cortex but not in the striatum or hippocampus of mice. *Neurosci Lett* *472*, 61-64.

Tierney, P.A., Karpinski, C.D., Brown, J.E., Luo, W., and Pankow, J.F. (2016). Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control* *25*, e10-15.

Tokita, K., Karadi, Z., Shimura, T., and Yamamoto, T. (2004). Centrifugal inputs modulate taste aversion learning associated parabrachial neuronal activities. *J Neurophysiol* *92*, 265-279.

Tomchik, S.M., Berg, S., Kim, J.W., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci* *27*, 10840-10848.

Ton, H.T., Smart, A.E., Aguilar, B.L., Olson, T.T., Kellar, K.J., and Ahern, G.P. (2015). Menthol Enhances the Desensitization of Human alpha3beta4 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* *88*, 256-264.

Tornwall, O., Silventoinen, K., Kaprio, J., and Tuorila, H. (2012). Why do some like it hot? Genetic and environmental contributions to the pleasantness of oral pungency. *Physiol Behav* *107*, 381-389.

Toth, A., Boczan, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., and Blumberg, P.M. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* *135*, 162-168.

Touzani, K., Taghzouti, K., and Velley, L. (1997). Increase of the aversive value of taste stimuli following ibotenic acid lesion of the central amygdaloid nucleus in the rat. *Behav Brain Res* *88*, 133-142.

Travers, S.P., and Geran, L.C. (2009). Bitter-responsive brainstem neurons: characteristics and functions. *Physiol Behav* 97, 592-603.

Travers, S.P., and Norgren, R. (1995). Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. *J Neurophysiol* 73, 2144-2162.

Treit, D., and Berridge, K.C. (1990). A comparison of benzodiazepine, serotonin, and dopamine agents in the taste-reactivity paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 37, 451-456.

Tye, K.M., Stuber, G.D., de Ridder, B., Bonci, A., and Janak, P.H. (2008). Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. *Nature* 453, 1253-1257.

Tyndale, R.F., and Sellers, E.M. (2002). Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. *Ther Drug Monit* 24, 163-171.

Ussher, M., Nunziata, P., Cropley, M., and West, R. (2001). Effect of a short bout of exercise on tobacco withdrawal symptoms and desire to smoke. *Psychopharmacology (Berl)* 158, 66-72.

Van Buskirk, R.L., and Erickson, R.P. (1977). Odorant responses in taste neurons of the rat NTS. *Brain Res* 135, 287-303.

Vandaele, Y., Noe, E., Cador, M., Dellu-Hagedorn, F., and Caille, S. (2018). Attentional capacities prior to drug exposure predict motivation to self-administer nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 235, 2041-2050.

Vanderkam, P., Boussageon, R., Underner, M., Langbourg, N., Brabant, Y., Binder, P., Freche, B., and Jaafari, N. (2016). [Efficacy and security of electronic cigarette for tobacco harm reduction: Systematic review and meta-analysis]. *Presse Med* 45, 971-985.

Vardavas, C.I., Anagnostopoulos, N., Kougias, M., Evangelopoulou, V., Connolly, G.N., and Behrakis, P.K. (2012). Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance, and exhaled nitric oxide. *Chest* 141, 1400-1406.

Veldhuizen, M.G., Douglas, D., Aschenbrenner, K., Gitelman, D.R., and Small, D.M. (2011). The anterior insular cortex represents breaches of taste identity expectation. *J Neurosci* 31, 14735-14744.

Veldhuizen, M.G., Nachtigal, D., Teulings, L., Gitelman, D.R., and Small, D.M. (2010a). The insular taste cortex contributes to odor quality coding. *Front Hum Neurosci* 4.

Veldhuizen, M.G., Shepard, T.G., Wang, M.F., and Marks, L.E. (2010b). Coactivation of gustatory and olfactory signals in flavor perception. *Chem Senses* 35, 121-133.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32-58.

Vertes, R.P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142, 1-20.

Villanti, A.C., Johnson, A.L., Ambrose, B.K., Cummings, K.M., Stanton, C.A., Rose, S.W., Feirman, S.P., Tworek, C., Glasser, A.M., Pearson, J.L., *et al.* (2017a). Flavored Tobacco Product Use in Youth and Adults: Findings From the First Wave of the PATH Study (2013-2014). *Am J Prev Med* 53, 139-151.

Villanti, A.C., Johnson, A.L., Rath, J.M., Williams, V., Vallone, D.M., Abrams, D.B., Hedeker, D., and Mermelstein, R.J. (2017b). Identifying "social smoking" U.S. young adults using an empirically-driven approach. *Addict Behav* 70, 83-89.

Villanti, A.C., Richardson, A., Vallone, D.M., and Rath, J.M. (2013). Flavored tobacco product use among U.S. young adults. *Am J Prev Med* 44, 388-391.

Villavicencio, M., Moreno, M.G., Simon, S.A., and Gutierrez, R. (2018). Encoding of Sucrose's Palatability in the Nucleus Accumbens Shell and Its Modulation by Exteroceptive Auditory Cues. *Front Neurosci* 12, 265.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.

Volkow, N.D., Koob, G.F., and McLellan, A.T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med* 374, 363-371.

von dem Hagen, E.A., Beaver, J.D., Ewbank, M.P., Keane, J., Passamonti, L., Lawrence, A.D., and Calder, A.J. (2009). Leaving a bad taste in your mouth but not in my insula. *Soc Cogn Affect Neurosci* 4, 379-386.

Vrana, S.R. (1993). The psychophysiology of disgust: differentiating negative emotional contexts with facial EMG. *Psychophysiology* 30, 279-286.

Vriens, J., Appendino, G., and Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 75, 1262-1279.

Waelti, P., Dickinson, A., and Schultz, W. (2001). Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature* 412, 43-48.

Wagener, T.L., Floyd, E.L., Stepanov, I., Driskill, L.M., Frank, S.G., Meier, E., Leavens, E.L., Tackett, A.P., Molina, N., and Queimado, L. (2017). Have combustible cigarettes met their match? The nicotine delivery profiles and harmful constituent exposures of second-generation and third-generation electronic cigarette users. *Tob Control* 26, e23-e28.

Wallace, M.T. (2015). Multisensory Perception: The Building of Flavor Representations. *Curr Biol* 25, R986-988.

Walter, H., Abler, B., Ciaramidaro, A., and Erk, S. (2005). Motivating forces of human actions. *Neuroimaging reward and social interaction. Brain Res Bull* 67, 368-381.

Wang, L., Gillis-Smith, S., Peng, Y., Zhang, J., Chen, X., Salzman, C.D., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2018a). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature* 558, 127-131.

Wang, T., Han, W., and Chen, H. (2016). Socially acquired nicotine self-administration with an aversive flavor cue in adolescent female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 1837-1844.

Wang, T., Han, W., Chitre, A.S., Poleskaya, O., Solberg Woods, L.C., Palmer, A.A., and Chen, H. (2018b). Social and anxiety-like behaviors contribute to nicotine self-administration in adolescent outbred rats. *Sci Rep* 8, 18069.

Wang, T., Wang, B., and Chen, H. (2014). Menthol facilitates the intravenous self-administration of nicotine in rats. *Front Behav Neurosci* 8, 437.

Warburton, D.M., Rusted, J.M., and Fowler, J. (1992). A comparison of the attentional and consolidation hypotheses for the facilitation of memory by nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 108, 443-447.

Waterhouse, U., Brennan, K.A., and Ellenbroek, B.A. (2018). Nicotine self-administration reverses cognitive deficits in a rat model for schizophrenia. *Addict Biol* 23, 620-630.

Weiland, R., Ellgring, H., and Macht, M. (2010). Gustofacial and olfactofacial responses in human adults. *Chem Senses* 35, 841-853.

Welch, J.M., Simon, S.A., and Reinhart, P.H. (2000). The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13889-13894.

West, R., Courts, S., Beharry, S., May, S., and Hajek, P. (1999). Acute effect of glucose tablets on desire to smoke. *Psychopharmacology (Berl)* 147, 319-321.

Westman, E.C., Behm, F.M., and Rose, J.E. (1996). Dissociating the nicotine and airway sensory effects of smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 53, 309-315.

White, V.M., Hayman, J., and Hill, D.J. (2008). Can population-based tobacco-control policies change smoking behaviors of adolescents from all socio-economic groups? Findings from Australia: 1987-2005. *Cancer Causes Control* 19, 631-640.

Wickham, R.J. (2015). How Menthol Alters Tobacco-Smoking Behavior: A Biological Perspective. *Yale J Biol Med* 88, 279-287.

Wickham, R.J., Nunes, E.J., Hughley, S., Silva, P., Walton, S.N., Park, J., and Addy, N.A. (2018). Evaluating oral flavorant effects on nicotine self-administration behavior and phasic dopamine signaling. *Neuropharmacology* 128, 33-42.

Wilcove, W.G. (1973). Ingestion affected by the oral environment: the role of gustatory adaptation on taste reactivity in the rat. *Physiol Behav* 11, 297-312.

Williams, J.A., Bartoshuk, L.M., Fillingim, R.B., and Dotson, C.D. (2016). Exploring Ethnic Differences in Taste Perception. *Chem Senses* 41, 449-456.

Wills, T.A., Sargent, J.D., Knight, R., Pagano, I., and Gibbons, F.X. (2016). E-cigarette use and willingness to smoke: a sample of adolescent non-smokers. *Tob Control* 25, e52-59.

Wilson, D.M., and Lemon, C.H. (2013). Modulation of central gustatory coding by temperature. *J Neurophysiol* 110, 1117-1129.

Wilson, D.M., and Lemon, C.H. (2014). Temperature systematically modifies neural activity for sweet taste. *J Neurophysiol* 112, 1667-1677.

Wise, R.A. (1996). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19, 319-340.

Wong, G.T., Gannon, K.S., and Margolskee, R.F. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381, 796-800.

Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20, 92-98.

Wonnacott, S., Irons, J., Rapier, C., Thorne, B., and Lunt, G.G. (1989). Presynaptic modulation of transmitter release by nicotinic receptors. *Prog Brain Res* 79, 157-163.

Wonnacott, S., Sidhpura, N., and Balfour, D.J. (2005). Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr Opin Pharmacol* 5, 53-59.

Wu, A., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2015). Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nat Commun* 6, 8171.

Xian, H., Scherrer, J.F., Madden, P.A., Lyons, M.J., Tsuang, M., True, W.R., and Eisen, S.A. (2003). The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit. *Nicotine Tob Res* 5, 245-254.

Xing, J., and Li, J. (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol* 97, 503-511.

Yamamoto, S., Wajima, T., Hara, Y., Nishida, M., and Mori, Y. (2007). Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1772, 958-967.

Yamamoto, T., Azuma, S., and Kawamura, Y. (1984a). Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: electrophysiological and behavioral studies in rats. *Exp Brain Res* 56, 23-31.

Yamamoto, T., Matsuo, R., and Kawamura, Y. (1980). Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J Neurophysiol* 44, 440-455.

Yamamoto, T., Yuyama, N., Kato, T., and Kawamura, Y. (1984b). Gustatory responses of cortical neurons in rats. I. Response characteristics. *J Neurophysiol* 51, 616-635.

Yamamoto, T., Yuyama, N., Kato, T., and Kawamura, Y. (1985). Gustatory responses of cortical neurons in rats. II. Information processing of taste quality. *J Neurophysiol* 53, 1356-1369.

Yang, A.K., Mendoza, J.A., Lafferty, C.K., Lacroix, F., and Britt, J.P. (2019). Hippocampal Input to the Nucleus Accumbens Shell Enhances Food Palatability. *Biol Psychiatry*.

Yerger, V.B. (2011). Menthol's potential effects on nicotine dependence: a tobacco industry perspective. *Tob Control* 20 *Suppl* 2, ii29-36.

Yerger, V.B., and McCandless, P.M. (2011). Menthol sensory qualities and smoking topography: a review of tobacco industry documents. *Tob Control* 20 *Suppl* 2, ii37-43.

Yokota, T., Eguchi, K., and Hiraba, K. (2011). Functional properties of putative pyramidal neurons and inhibitory interneurons in the rat gustatory cortex. *Cereb Cortex* 21, 597-606.

Yu, V., Rahimy, M., Korrapati, A., Xuan, Y., Zou, A.E., Krishnan, A.R., Tsui, T., Aguilera, J.A., Advani, S., Crotty Alexander, L.E., *et al.* (2016). Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines. *Oral Oncol* 52, 58-65.

Zaidi, F.N., and Whitehead, M.C. (2006). Discrete innervation of murine taste buds by peripheral taste neurons. *J Neurosci* 26, 8243-8253.

Zald, D.H., and Pardo, J.V. (2000). Cortical activation induced by intraoral stimulation with water in humans. *Chem Senses* 25, 267-275.

Zare, S., Nemati, M., and Zheng, Y. (2018). A systematic review of consumer preference for e-cigarette attributes: Flavor, nicotine strength, and type. *PLoS One* 13, e0194145.

Zatorre, R.J., Jones-Gotman, M., Evans, A.C., and Meyer, E. (1992). Functional localization and lateralization of human olfactory cortex. *Nature* 360, 339-340.

Zellner, D.A., Berridge, K.C., Grill, H.J., and Ternes, J.W. (1985). Rats learn to like the taste of morphine. *Behav Neurosci* 99, 290-300.

Zendehdel, K., Nyren, O., Luo, J., Dickman, P.W., Boffetta, P., Englund, A., and Ye, W. (2008). Risk of gastroesophageal cancer among smokers and users of Scandinavian moist snuff. *Int J Cancer* 122, 1095-1099.

Zernig, G., Kummer, K.K., and Prast, J.M. (2013). Dyadic social interaction as an alternative reward to cocaine. *Front Psychiatry* 4, 100.

Zhang, M., Harrison, E., Biswas, L., Tran, T., and Liu, X. (2018). Menthol facilitates dopamine-releasing effect of nicotine in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 175, 47-52.

Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301.

Zhao-Shea, R., Liu, L., Soll, L.G., Improgo, M.R., Meyers, E.E., McIntosh, J.M., Grady, S.R., Marks, M.J., Gardner, P.D., and Tapper, A.R. (2011). Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 36, 1021-1032.

Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115, 255-266.

Zhao, X.L., Yan, J.Q., Chen, K., Yang, X.J., Li, J.R., and Zhang, Y. (2011). [Glutamatergic neurons expressing c-Fos in the brainstem and amygdala participate in signal transmission and integration of sweet taste]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31, 1138-1141.

Zhu, S.H., Sun, J.Y., Bonnevie, E., Cummins, S.E., Gamst, A., Yin, L., and Lee, M. (2014). Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control* 23 *Suppl* 3, iii3-9.

Zhu, Y., Nachtrab, G., Keyes, P.C., Allen, W.E., Luo, L., and Chen, X. (2018). Dynamic salience processing in paraventricular thalamus gates associative learning. *Science* 362, 423-429.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Hogestatt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457.