



**HAL**  
open science

**Mécanismes de vulnérabilité aux troubles de l'usage  
d'alcool induite par un polymorphisme simple du gène  
codant pour la sous-unité alpha5 des récepteurs  
nicotiniques**

Léa Tochon

► **To cite this version:**

Léa Tochon. Mécanismes de vulnérabilité aux troubles de l'usage d'alcool induite par un polymorphisme simple du gène codant pour la sous-unité alpha5 des récepteurs nicotiniques. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0376 . tel-03576713

**HAL Id: tel-03576713**

**<https://theses.hal.science/tel-03576713v1>**

Submitted on 16 Feb 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.

## THESE

Présentée à

**L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

**Léa TOCHON**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

SPECIALITE NEUROSCIENCES

---

**MECANISMES DE VULNERABILITE AUX TROUBLES DE  
L'USAGE D'ALCOOL INDUITE PAR UN POLYMORPHISME  
D'UN SEUL NUCLEOTIDE DU GENE CODANT POUR LA SOUS-  
UNITE  $\alpha 5$  DES RECEPTEURS NICOTINIQUES**

---

Thèse soutenue le 14 décembre 2021

Devant la commission d'examen composée de :

- Mr François GEORGES (DR, CNRS UMR 5293, Univ. de Bordeaux).Président du jury
- Mr Mickaël NAASSILA (PR, Inserm UMRS 1247, Univ. d'Amiens)...Rapporteur
- Mme Sylvie GRANON (PR, CNRS UMR 9197, Univ. Paris-Saclay)....Rapporteur
- Mme Mélina FATSEAS (PU-PH, CNRS UMR 5287, Univ. de Bordeaux)..Examinateur
- Mr Vincent DAVID (CR, CNRS UMR 5287, Univ. de Bordeaux).....Directeur de thèse



# Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux) dirigé par le Dr Jean-René CAZALETS sous la direction du Dr Vincent DAVID et avec la collaboration des Dr Uwe MASKOS et Morgane BESSON (Institut Pasteur, CNRS UMR 3571, Paris).

## PUBLICATIONS

### Publiées

Husson M, Harrington L, **TOCHON L**, Cho Y, Ibañez-Tallon I, Maskos U, David V (2020).

$\beta$ 4-nicotinic receptors are critically involved in reward-related behaviors and self-regulation of nicotine reinforcement. *J. Neurosci.* 40 (12): 0356.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0356-19.2020>

*Article of exceptional importance (F1000 recommendation) :*

<https://facultyopinions.com/prime/737584784>

### Soumises

**TOCHON L**, Vouimba RM, Corio M, Béracochéa D, Guillou JL, David V (2021).

Chronic alcohol consumption and withdrawal shift learning and synaptic plasticity from hippocampus- to striatum-dependant pathways. *eLife*, submitted in Oct 2021.

Lakosa A, Rahimian A, Tomasi F, Tahraoui S, Marti F, David V, Canonne C, Danckaert A, **TOCHON L**, De Chaumont F, Forget B, Maskos U, Besson M (2021).

The gut microbiome influences nicotine rewarding properties and glial cells in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, submitted in dec 2021.

### En préparation

**TOCHON L**, Allain AE, Caillé-Garnier S, Bertrand S, David V.

Lack of  $\alpha$ 5\*nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN. *In preparation for Molecular Psychiatry*.

**TOCHON L**, Henkous N, Besson M, Dominique N, Maskos U, David V.

Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles: preclinical support for Cloninger's alcoholism typology. *In preparation for Biological Psychiatry*.

**TOCHON L**, Pageze C, Guillou JLG, David V.

Alcohol-prone  $\alpha$ 5-nicotinic receptor mutant mice display sex-dependent opposite social-emotional profiles in emotion recognition and pro-social tasks. *In preparation for Genes, Brain and Behavior*.



## ORALES

- **Journée du Neurocampus** (Rencontre des 6 instituts neuroscientifiques bordelais)  
Bordeaux, 29 septembre 2021  
Mechanisms of vulnerability to AUDs induced by a single nucleotide polymorphism of the gene encoding the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit.  
Tochon L.
- **Prix de thèse Neurocampus**  
Bordeaux, 18 juin 2021  
Mechanisms of vulnerability to AUDs induced by a single nucleotide polymorphism of the gene encoding the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit.  
Tochon L.  
*\*Lauréate « coup de cœur du jury »*  
<https://www.bordeaux-neurocampus.fr/laureates-of-the-bordeaux-neurocampus-doctoral-research-award/>
- **Conférence Internationale REWARD**  
Bordeaux, 3 octobre 2019  
Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN. Tochon L.  
*\*Sélectionnée pour programme principal*
- **3<sup>ème</sup> Séminaire INCIA**  
Bordeaux, 17 janvier 2019  
The key role of an accessory nicotinic receptor in AUDs vulnerability. Tochon L.

- **NeuroFrance (Symposium international)**  
Visioconférence, 19-21 mai 2021  
Mutant mice expressing polymorphisms for  $\alpha 5$  nicotinic receptors as preclinical models of type 1 and 2 alcoholism.  
Tochon L, Henkous N, Besson M, Dominique N, Maskos U, David V  
[https://www.dropbox.com/s/1168xpouvas1rf/P6.29\\_Tochon%20L-VIDEO.mp4?dl=0](https://www.dropbox.com/s/1168xpouvas1rf/P6.29_Tochon%20L-VIDEO.mp4?dl=0)
- **Conférence Internationale REWARD**  
Bordeaux, 2-4 octobre 2019  
Chronic alcohol consumption and withdrawal shift learning and synaptic plasticity from hippocampus- to striatum-dependant pathways.  
Tochon L, Vouimba RM, Corio M, Béracochéa D, Guillou JL, David V.
- **17<sup>ème</sup> Congrès ESBRA (Société Européenne pour la Recherche Biomédicale sur l'Alcoolisme)**  
Lille, 21-24 septembre 2019  
Chronic alcohol consumption and withdrawal shift learning and synaptic plasticity from hippocampus- to striatum-dependant pathways.  
Tochon L, Vouimba RM, Corio M, Béracochéa D, Guillou JL, David V.

Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN.  
Tochon L, Allain AE, Caillé-Garnier S, Betrand S, David V.
- **NeuroFrance (Symposium international)**  
Marseille, 22-24 mai 2019  
Chronic alcohol consumption and withdrawal shift learning and synaptic plasticity from hippocampus- to striatum-dependant pathways.  
Tochon L, Vouimba RM, Corio M, Béracochéa D, Guillou JL, David V.
- **Journée du Neurocampus (Rencontre des 6 instituts neuroscientifiques bordelais)**  
Bordeaux, 15 mai 2019  
Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN.  
Tochon L, Allain AE, Caillé-Garnier S, Betrand S, David V.
- **19<sup>ème</sup> Journée de l'Ecole Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé (ED n°154)**  
Bordeaux, 14 mai 2019  
Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN.  
Tochon L, Allain AE, Caillé-Garnier S, Betrand S, David V.  
*\*Prix poster Jury (/59)*



-2021-

## Remerciements

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Mickaël Naassila, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne et Directeur du GRAP (Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances), ainsi qu'à Madame Sylvie Granon, Professeure à l'Université Paris-Saclay, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être mes rapporteurs de thèse. J'exprime également ma gratitude à Madame Mélina Fatseas, Praticienne Hospitalière au Centre Hospitalier Charles Perrens de Bordeaux, qui a bien voulu être examinatrice, et à Monsieur François Georges, Directeur de recherche à l'IMN (Institut des Maladies Neurodégénératives), pour l'honneur qu'il me fait de m'écouter à nouveau en présidant ce jury de thèse.

C'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Monsieur Vincent David, pour l'énergie et la patience qu'il a déployé à me former à la recherche, pour m'avoir partagé ses brillantes intuitions, pour avoir répondu aux questions dont je l'accablais, mais surtout pour son optimisme, sa bienveillance et ses qualités humaines. Je suis ravie et fière d'avoir travaillé en sa compagnie.

J'exprime également ma gratitude à Monsieur Jean-René Cazalets, qui en ses qualités de Directeur de l'INCI (institut des neurosciences cognitives et intégratives d'Aquitaine) a pris le temps de m'initier à la recherche dès ma licence. Je le remercie de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans ce laboratoire où je me suis pleinement intégrée, et de continuer à suivre mon parcours.

Un grand merci à Monsieur Uwe Maskos, Directeur d'Unité au département de Neurosciences de l'Institut Pasteur de Paris, et à Madame Morgane Besson, Chercheuse au sein de cette même unité, qui ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse et apporté un soutien matériel et technique précieux.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à ce projet et à son bon déroulement, tout particulièrement Madame Sandrine Bertrand, Directeur de recherche à l'INCI et future directrice de cette unité, et Madame Anne-Emilie Allain, Ingénieure de recherche à l'INCI, pour m'avoir formée à l'électrophysiologie *in vitro* et permis de bénéficier de l'appui de la plateforme PhyCell.

Merci à Monsieur Jean-Louis Guillou, Professeur à l'Université de Bordeaux et Madame Rose-Marie Vouimba-Siguelnitzky, Maître de conférence à l'Université de Bordeaux, d'abord pour leurs qualités d'enseignants pour lesquels j'avais beaucoup d'estime pendant mon cursus universitaire, et pour leurs qualités de chercheurs comportementalistes et électrophysiologistes, approches auxquelles je suis fière d'avoir été formée avec eux. Qu'ils soient aussi remerciés pour leur soutien et leur gentillesse à mon égard tout au long de mon parcours.

Je tiens aussi à remercier grandement Madame Elodie Poianama, Madame Anne Fayoux, et Monsieur Yoan Salafranques, zootéchniciens à l'INCI, pour avoir pris soin de nos animaux sans lesquels nombres de progrès en médecine n'auraient vus le jour. Un grand merci également à Madame Nadia Henkous, Ingénieure de recherche, Madame Marion Piquemal-Lagoueillat, Technicienne de recherche, et Monsieur Thierry Lafon, Technicien en maintenance et instrumentation à l'INCI pour leur soutien expérimental et technique de qualité.



Merci aux étudiants ayant contribué à la collecte, l'analyse, l'interprétation et la mise en forme de ces données et évidemment à mon épanouissement à leur contact : Emma Dulière, Céline Guinet, Lily-Rose Duffau, Mathias Baronnet, Sarah Roche, Cindie Leteneur, Juliette Moreno, Florine Guérin, Valentine Seyrac, Samuel Rode, Asmae Belmahi ; et plus particulièrement Cécile Pagèze, nouvellement étudiante doctorante au sein de notre unité, pour son aide et son implication dans la rédaction de cette thèse.

Je remercie tous les membres des équipes EMOTIV et MINDS de l'INCIA, avec pour ceux que je n'ai pas cités précédemment, Madame Stéphanie Caille-Garnier, Chargée de recherche, Madame Martine Cador, Directrice de recherche, Monsieur Marc Corio, Maître de conférence, Monsieur Daniel Beracochéa, Directeur de recherche, et Madame Nicole Mons, Chargée de recherche, pour m'avoir conseillé et soutenu tout au long de l'élaboration de cette thèse. Merci à tous les autres membres du laboratoire que je n'ai pas cités mais que j'ai eu l'occasion de côtoyer et qui m'ont aidé, même ponctuellement, et ont incontestablement contribué à faire de l'INCIA un environnement professionnel où je me suis sentie à ma place. Un grand merci à Vincent David, Marc Corio, Nadia Henkous, Elodie Poianama, Marion Piquemal-Lagoueillat, Cécile Pagèze et Céleste Ferraguto, mais aussi Kyrian Nicolay-kritter, Pierre Faucher, Fabienne Martin et Yolaine Rabat avec qui j'ai démarré cette expérience, pour le soutien émotionnel sans faille et la bonne humeur qu'ils me prodiguent au quotidien.

Enfin, au terme de ce parcours, je remercie celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. C'est notamment avec une joie immense que je dédie cette thèse à mes parents, Béatrice et Olivier, dont j'admire depuis toujours la force et la détermination, et auxquels je suis infiniment redevable pour leur soutien moral, affectif, matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Merci à mon deuxième père et à mon cher frère, Alexandre et Killian dont l'optimisme et l'énergie qui m'accompagnent au quotidien sont la source de mon bonheur. Merci à Clara de prendre soin de moi depuis toujours, et à Isabelle et à Lili d'embellir cet environnement familial. Merci à mes grands-parents, Isabelle et tout particulièrement Paul et Justine pour lesquels mes études étaient une fierté et dont j'aurai aimé qu'ils soient témoins de l'accomplissement. Je remercie chaleureusement ceux dont j'ai fait ma famille, Aurélien et Dimitri, que j'ai la chance inconsiderée de compter parmi mes amis, et qui me soutiennent et surtout me supportent dans tout ce que j'entreprends comme ce projet de thèse. Enfin, merci à Arnaldo, qui m'offre tout le bonheur et la sérénité dont j'ai besoin pour réussir et avec qui je n'ai qu'une hâte, c'est de partager une vie remplie d'aventures (et de science). Merci également à tous ceux à pattes qui ne liront jamais ces lignes mais dont le soutien émotionnel est réel et qui contribuent aussi incontestablement à mon bonheur.

Merci à tous ceux qui liront cette thèse ; en espérant que celle-ci puisse vous apporter un intérêt scientifique, les informations que vous recherchez, ou bien juste éveiller votre curiosité.

Bonne lecture.

# Résumé

Des études génétiques humaines ont impliqué des variants alléliques du gène *CHRNA5*, codant pour la sous-unité  $\alpha 5$  du récepteur nicotinique cholinergique ( $\alpha 5$ -nAChR), comme facteurs de risque au développement de troubles de l'usage d'alcool (TUALs). L'un de ces variants appelé  $\alpha 5$ -SNP D398N est particulièrement représenté chez les occidentaux (~35% des individus). Pourtant, les mécanismes par lesquels ces variants génèrent un tel risque est inconnu. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de comprendre **comment les processus comportementaux et les réseaux neuronaux impliqués dans la vulnérabilité aux TUALs sont modifiés par le SNP D398N de la sous-unité  $\alpha 5$** . Pour cela, j'ai utilisé des souris transgéniques mâles et femelles exprimant soit le  $\alpha 5$ -SNP humain (souris  $\alpha 5$ KI), soit une délétion du gène *CHRNA5* (souris  $\alpha 5$ KO), et articulé mes travaux autour de 3 questions :

- (1) Comment le SNP ou la délétion de la sous-unité  $\alpha 5$  modifie le **comportement de consommation d'alcool** ?
- (2) Quel est le substrat neuronal de ces modifications ? En me concentrant sur les régions cérébrales exprimant la plus forte densité d' $\alpha 5$  : l'**aire tegmentale ventrale (ATV)**, structure clé du système de la récompense et le **noyau interpédonculaire (IPN)** impliqué dans l'aversion.
- (3) Est-ce que ces mutations de la sous-unité  $\alpha 5$  modifient les **traits pré consommatoires** ?

En combinant modèles d'auto-administration d'alcool et enregistrements électrophysiologiques *in vitro* des neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN, nous avons constaté que l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$  favorise la consommation d'alcool à fortes doses et entraîne une inversion de l'antagonisme fonctionnel du circuit ATV-IPN. Nous avons ensuite confirmé, l'implication des neurones GABAergiques de l'IPN exprimant la sous-unité  $\alpha 5$  dans le contrôle de la consommation d'alcool grâce à la réexpression neurospécifique de cette sous-unité.

En testant ensuite les souris  $\alpha 5$ KI, j'ai constaté que le  $\alpha 5$ -SNP altère la consommation d'alcool de façon comparable à la délétion : les souris  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO boivent toutes deux de plus grandes quantités d'alcool à fortes doses. Cependant, de façon surprenante, l'évaluation phénotypique préconsommatoire de ces deux lignées mutantes révèle des phénotypes socio-émotionnels opposés, évoquant fortement deux profils alcooliques humains établis par Cloninger et coll., : le type I = plus féminin, « évitant » et anxieux ; versus le type II = masculin, « chercheur de sensations ». Ces données suggèrent que les modèles précliniques exprimant des variants génétiques humains peuvent aider à identifier différentes motivations à consommer, et donc différents sous-types de TUALs, et les mécanismes neurobiologiques sous-jacents. Ceux-ci constitueraient une avancée majeure pour le développement de traitements personnalisés et donc potentiellement plus efficaces.

**Mots-clés** : sous-unité  $\alpha 5$  du récepteur nicotinique cholinergique ; aire tegmentale ventrale ; noyau interpédonculaire ; souris transgéniques ; troubles de l'usage d'alcool ; traits pré consommatoires.

# Abstract

Human genetic studies have implicated gene variants in the *CHRNA5* gene, encoding for the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha 5$ -nAChR), as high risk factors for developing alcohol use disorders (AUDs). The single nucleotide polymorphism (SNP) D398N is highly represented in Western population (in ~35% of individuals). Yet, mechanisms through which they may influence this risk remain unknown. In this context, the aim of my PhD was to understand **how the  $\alpha 5$ -SNP modify behavioral processes and neural circuits involved in the vulnerability to AUDs**. To this aim, I used male and female transgenic mice expressing either the human  $\alpha 5$ -SNP ( $\alpha 5$ KI mice), or a deletion of the *CHRNA5* gene ( $\alpha 5$ KO mice), and organized my research work around the three following questions:

- (1) How are these  $\alpha 5$  subunit mutations modifying **alcohol-drinking behaviour**?
- (2) What is the neural substrate of these modifications? Focusing on regions carrying the highest density of  $\alpha 5$ -nAChR in the brain: the **ventral tegmental area (VTA)**, a key component of the reward system and the **interpeduncular nucleus (IPN)**, which may mediate a regulation/aversion signal.
- (3) Do  $\alpha 5$ -subunit mutations modify the **preconsummatory traits** related to alcohol abuse? Which unfortunately are still poorly assessed in preclinical addiction studies.

By combining models of alcohol self-administration and *in-vitro* electrophysiological recordings of the VTA dopaminergic and the IPN GABAergic neurons, we found that the lack of  $\alpha 5$  subunit results in a functional imbalance in the VTA-IPN circuit, shifting the alcohol consumption toward high doses in both males and females, with nevertheless some sex-dependent effects. Using viral neurospecific reexpression, we obtained further evidence that  $\alpha 5$ -expressing IPN GABAergic neurons play a critical role in the control of alcohol intake.

By testing the  $\alpha 5$ KI mice, we found that, as for the  $\alpha 5$  subunit deletion, the  $\alpha 5$ -SNP deregulates alcohol consumption: both  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO mice drink larger amount of alcohol at high doses. However, prior any alcohol exposition, these two mutant strains display opposite socio-emotional phenotypes. Strickingly, these are highly consistent with two human alcoholic profiles established by Cloninger and colleagues, with: the Type I = female, risk and novelty 'avoidant' displaying high anxiety; versus the Type II = male, 'sensation seeker'. These data suggest that preclinical models expressing human genetic variants can help to identify different motivations to consum and thus different AUDs subtypes while exploring their neurobiological basis. These could represent a major step toward the development of personalized and thus more effective treatments.

**Keywords:**  *$\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit; ventral tegmental area; interpeduncular nucleus; transgenic mice; alcohol use disorders; preconsummatory traits.*

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>5</b>
<b>Partie I : L'alcool : histoire, effets et circuits neuronaux</b> .....	<b>6</b>
I- De l'usage au problème de santé publique .....	6
1. L'alcool : l'un des psychotropes licites les plus consommés .....	6
a. Brève histoire de l'alcool .....	6
b. Statistiques de l'OMS (rapport de 2018) .....	7
c. Définition préliminaire des concepts clefs .....	9
2. Principaux effets neuropharmacologiques de l'alcool .....	11
a. En consommation aiguë .....	11
b. En consommation chronique .....	11
c. Lors d'un sevrage alcoolique .....	12
II- Circuits neuronaux des effets récompensants et renforçants de l'alcool .....	12
1. Description du circuit cérébral de la récompense .....	12
a. Voie dopaminergique mésocorticolimbique .....	12
b. Principales voies glutamatergiques et GABAergiques .....	13
2. Anatomie de l'aire tegmentale ventrale : ATV .....	14
c. Cytoarchitecture de l'ATV .....	14
d. Afférences de l'ATV .....	18
e. Efférences de l'ATV .....	18
3. Rôle des neurones dopaminergiques de l'ATV en conditions normales et pathologiques .....	18
a. Le contrôle des comportements motivés .....	18
b. La signalisation de l'erreur de prédiction de la récompense .....	20
c. Les effets de l'alcool .....	20
III- Implication de la voie habénulo-interpédonculaire .....	23
1. Anatomie de l'habénula « oubliée » : partie médiane (MHb) .....	23
a. Cytoarchitecture de la MHb .....	23
b. Afférences de la MHb .....	24
c. Efférences de la MHb .....	25
2. Anatomie du noyau interpédonculaire : IPN .....	26
a. Cytoarchitecture de l'IPN .....	26
b. Afférences de l'IPN .....	27
c. Efférences de l'IPN .....	28
3. Rôles de la voie MHb-IPN .....	29
a. Le contrôle comportemental et les fonctions exécutives .....	29
b. Motivation et état hédonique .....	30
c. L'anxiété et la dépression .....	30
d. ... et concernant l'alcool ? .....	31
IV- Interaction entre ATV, MHb et IPN : la voie mésointerpédonculaire .....	32
1. Neuroanatomie du circuit ATV-MHb-IPN .....	32
2. Signalisation de la nouveauté versus familiarité .....	32
3. Les comportements anxieux .....	34
<b>Partie II : Diagnostiquer, soigner et élaborer de nouveaux traitements contre les TUALs</b> .....	<b>36</b>
I- Les troubles de l'usage d'alcool : une pathologie complexe .....	36
1. Le trouble de l'usage d'alcool .....	36
a. De l'usage récréatif à l'addiction, les théories .....	36
b. Les critères d'addiction .....	38
2. Prise en charge de la dépendance et traitements contre les TUALs .....	40
a. Gestion du syndrome de sevrage alcoolique .....	40

b.	Thérapies pharmacologiques approuvées .....	41
c.	Thérapies pharmacologiques non approuvées .....	43
d.	Thérapies comportementales et psychologiques .....	43
e.	Thérapies potentielles basées sur la neuromodulation.....	45
3.	Facteurs de vulnérabilité au développement de TUAL .....	45
a.	Facteurs de tolérance .....	46
b.	Facteurs psychodynamiques ou psychiatriques .....	46
c.	Facteurs environnementaux .....	47
d.	Facteurs génétiques.....	47
II-	Modèles précliniques des mécanismes neurobiologiques impliqués dans les troubles de l'usage d'alcool .....	48
1.	Importance des modèles précliniques animaux .....	48
a.	Tout (ou presque) est sous contrôle ... ..	48
b.	Critères de validité.....	49
2.	Modèles d'auto-administration volontaire d'alcool chez le rongeur .....	50
a.	Modèles non opérants.....	50
b.	Modèles basés sur un conditionnement opérant.....	53
c.	Modèles basés sur la préférence de place conditionnée (PPC).....	54
3.	Modélisations des caractéristiques de l'addiction chez le rongeur .....	55
a.	Escalade de la consommation.....	56
b.	Recherche motivée voir compulsive .....	56
c.	Maintien en dépit des conséquences négatives.....	57
d.	Préférence par rapport à d'autres récompenses.....	57
e.	Incubation/rechute.....	58
<b>Partie III : Implication des récepteurs nicotiques des voies mésocorticolimbiques et habenu- interpédonculaire dans la vulnérabilité à l'alcool-dépendance .....</b>		
<b>60</b>		
I-	Récepteurs nicotiques des voies mésocorticolimbique et habéno-interpédonculaire .....	60
1.	Présentation générale des récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChRs) .....	60
a.	Structure .....	60
b.	Localisation .....	62
c.	Fonction .....	63
2.	Récepteurs nAChRs du système dopaminergique mésocorticolimbique .....	65
a.	Anatomie de la transmission cholinergique dans l'ATV.....	65
b.	Modulation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV par les nAChRs .....	68
c.	Rôles des nAChRs dans les effets renforçants de la nicotine.....	68
3.	Récepteurs nAChRs de la voie cholinergique habéno-interpédonculaire .....	69
a.	Rôle dans les effets négatifs et aversifs du sevrage nicotinique .....	69
b.	Rôle dans les propriétés aversives de la nicotine .....	70
II-	Récepteurs nicotiques et effets de l'alcool .....	70
1.	Les nAChRs : une cible commune à l'alcool et à la nicotine .....	70
a.	Comorbidité entre les addictions à l'alcool et à la nicotine.....	70
b.	Interactions entre nAChRs et alcool .....	71
c.	Impact des nAChRs sur la consommation d'alcool .....	71
d.	Impact des nAChRs sur le sevrage alcoolique .....	72
2.	Implications de gènes codant les nAChRs dans les addictions à l'alcool et à la nicotine .....	73
a.	Polymorphismes d'un seul nucléotide du gène CHRNA5 .....	73
b.	Le $\alpha$ 5-SNP D398N rs16969968 du gène CHRNA5 .....	73
3.	Récepteurs $\alpha$ 5*nAChRs et comportements associés la consommation d'alcool .....	74
a.	Localisation de la sous-unité $\alpha$ 5.....	74
b.	Structure et fonction de la sous-unité $\alpha$ 5.....	76
c.	L'auto-administration de nicotine .....	79
d.	L'auto-administration d'alcool.....	81
e.	Les circuits attentionnels .....	82
f.	Les comportements associés au stress et à l'anxiété .....	83
<b>Objectifs du doctorat :</b> .....		<b>87</b>

**RESULTATS ..... 89**

**Chapitre I : Implication des  $\alpha 5^*$ nAChRs dans les propriétés addictives de l'alcool et l'activité neuronale dans l'ATV et l'IPN..... 90**

- I- Article 1..... 90
  - "Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN" ..... 90
- II- Expériences complémentaires..... 111
  - 1. La délétion d'un seul allèle du gène CHRNA5 est suffisante pour augmenter l'auto-administration intracérébrale d'alcool et inverser les activités neuronales dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN, induites par l'alcool ..... 111
  - 2. Le  $\alpha 5$ -SNP D398N augmente l'auto-administration intracérébrale de solutions d'alcool à fortes concentrations ..... 113

**Chapitre II : Impact de la délétion et du SNP D398N de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR sur la consommation d'alcool et les phénotypes pré consommatoires associés .....115**

- I- Article 2..... 115
  - "Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles: ..... 115
  - Preclinical support for Cloninger alcoholic subtypes" ..... 115

**Chapitre III : impact de la délétion et du SNP D398N de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR sur les comportements prosociaux .....150**

- I- Article 3..... 150
  - "Alcohol-prone  $\alpha 5$ -nicotinic receptor mutant mice display sex-dependent opposite profiles in emotion recognition and pro-social tasks" ..... 150
- II- Expériences complémentaires..... 171
  - 1. Le  $\alpha 5$ -SNP D398N entraîne une augmentation de la transmission BLA-CA1v et BLA-CA1d alors que la délétion de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR diminue la transmission BLA-CA1v ..... 171

**DISCUSSION GENERALE .....175**

**Le circuit des  $\alpha 5^*$ nAChRs et les comportements associés à la consommation d'alcool .....176**

- I- L'ATV et l'IPN ..... 176
- II- ATV  $\leftrightarrow$  IPN ? ..... 177
- III- ?  $\leftrightarrow$  ATV  $\leftrightarrow$  IPN  $\leftrightarrow$  ? ..... 178
- IV- Dimorphisme sexuel dans les circuits et fonctions des  $\alpha 5^*$ nAChRs ..... 180

**Mutants  $\alpha 5$ -nAChRs : modèles précliniques de TUALs spécifiques ? .....183**

- I- Vers une meilleure appréhension de l'hétérogénéité des TUALs : les sous-types..... 183
  - 1. Les sous-types I et II de Cloninger ..... 183
  - 2. Les 5 sous-types de TUALs du NIAAA ..... 184
- II- Souris transgéniques  $\alpha 5$ KI/ $\alpha 5$ KO comme modèles précliniques des TUALs de type I/II ?..... 186
  - 1. La pertinence des modèles murins transgéniques  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO ..... 186
  - 2. Les limites de cette translation/comment la renforcer ..... 188
    - a. Côté préclinique..... 188
    - b. Côté clinique ..... 190

**Intérêts thérapeutiques .....191**

- I- Les  $\alpha 5^*$ nAChRs : une cible thérapeutique potentielle ? ..... 191
- II- Identifier les traitements pharmacologiques spécifiques à chaque sous-type à l'aide de modèles précliniques..... 191

**BIBLIOGRAPHIE.....193**



# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Ach</b>	acétylcholine
<b>aCSF</b>	fluide cérébrospinal artificiel
<b>ACTH</b>	hormone adrénocorticotrope
<b>ADH</b>	alcool déshydrogénase
<b>ALDH</b>	aldéhyde déshydrogénase
<b>ATV</b>	aire tegmentale ventrale
<b>AUDIT</b>	questionnaire d'identification du trouble de l'usage d'alcool
<b>2BC</b>	« two-bottle choice »
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcium
<b>ChAT</b>	choline acétyltransférase
<b>CLi</b>	noyau linéaire caudal
<b>CORT</b>	corticostérone
<b>CPF</b>	cortex préfrontal
<b>CRF</b>	facteur de libération de la corticotropine
<b>D398N</b>	substitution d'un aspartate par une asparagine au 398ème acide aminé
<b>DA</b>	Dopamine
<b>DID</b>	« drinking in the dark »
<b>DSM</b>	manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
<b>DTg</b>	noyau tegmental dorsal
<b>EMA</b>	agence européenne des médicaments
<b>EPM</b>	labyrinthe en croix surélevé ou « elevated plus maze »
<b>EPR</b>	erreur de prédiction de récompense
<b>EtOH</b>	ethanol
<b>FDA</b>	administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments
<b>FR</b>	fasciculus retroflexus
<b>FTM ; MFB</b>	faisceau télencéphalique médian ; medial forebrain bundle
<b>GABA</b>	acide gamma-amino butyrique
<b>GAD</b>	glutamate décarboxylase
<b>GARP</b>	« gothenburg alcohol research project »
<b>HPA</b>	axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien
<b>HPC</b>	hippocampe
<b>5-HT</b>	5-hydroxytryptamine
<b>INSERM</b>	institut national français de la santé et de la recherche médicale
<b>IPA</b>	noyau interpédonculaire apical
<b>IPC</b>	noyau interpédonculaire central
<b>IPDL</b>	noyau interpédonculaire dorsolatéral
<b>IPDM</b>	noyau interpédonculaire dorsomédian
<b>IPI</b>	noyau interpédonculaire intermédiaire
<b>IPL</b>	noyau interpédonculaire latéral
<b>IPN</b>	noyau interpédonculaire
<b>IPP</b>	Inhibition pré pulse
<b>IPR</b>	noyau interpédonculaire rostral
<b>KI</b>	« knock-in »
<b>KO</b>	« knock-out »



<b>LDTg</b>	noyau tegmental latéro-dorsal
<b>LH</b>	habénula latérale
<b>LR</b>	« low level of response »
<b>MAAD</b>	mécanisme des addictions à l'alcool et aux drogues
<b>MAO</b>	monoamine oxydase
<b>MHb</b>	habénula médiane
<b>MHbD</b>	noyau dorsal de l'habénula médiane
<b>MHbS</b>	noyau supérieur de l'habénula médiane
<b>MHbV</b>	noyau ventral de l'habénula médiane
<b>MHbVc</b>	noyau ventro-centrale de l'habénula médiane
<b>MHbVI</b>	noyau ventro-latéral de l'habénula médiane
<b>MHbVm</b>	noyau ventro-médian de l'habénula médiane
<b>MILDECA</b>	mission interministérielle de lutte contre la drogue et les conduites addictives
<b>NAC</b>	noyau accumbens
<b>nAChR</b>	récepteur cholinergique nicotinique
<b>NE</b>	norépinéphrine
<b>NIAAA</b>	institut national américain pour l'abus d'alcool et l'alcoolisme
<b>NMDA</b>	N-méthyl-D-aspartate
<b>NPP</b>	préférence de place pour la nouveauté ou « novelty place preference »
<b>OMS</b>	organisation mondiale de la santé
<b>OF</b>	espace ouvert ou « open-field »
<b>PBP</b>	noyau parabrachial pigmenté
<b>PFR</b>	aire réflexus parafasciculaire
<b>PN</b>	noyau paranigral
<b>PPC</b>	préférence de place conditionnée
<b>PPTg</b>	noyau tegmental pédonculopontin
<b>RLi</b>	Noyau linéaire rostral
<b>RMTg</b>	Noyau tegmental rostromédian
<b>SC</b>	stimulus conditionné
<b>SD</b>	test de l'inhibition passive ou « step-down inhibitory avoidance task »
<b>SI</b>	stimulus inconditionné
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>SNP</b>	système nerveux périphérique
<b>(<math>\alpha</math>5-)SNP</b>	polymorphisme simple ou « single nucleotide polymorphism » (du gène CHRNA5)
<b>TPAS</b>	troubles de la personnalité antisociale
<b>TUALs</b>	troubles de l'usage d'alcool
<b>VTT ; tVTA</b>	queue de l'ATV
<b>WT</b>	sauvage ou « wild-type »

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Apprentis chercheurs MAAD accueillis dans notre équipe pour être sensibilisés aux troubles de l'usage d'alcool.

**Figure 2:** Anatomie de l'ATV.

**Figure 3:** Répartition, taille et densité des neurones dopaminergiques dans l'ATV antérieure, postérieure et de sa queue.

**Figure 4:** Afférences et efférences de l'ATV.

**Figure 5.** Hétérogénéité médio-latérale et antéro-postérieure de la réponse à l'alcool dans l'ATV.

**Figure 6.** Localisation de l'habénula et anatomie de l'habénula médiane (MHb).

**Figure 7.** Connexions afférentes et efférentes de l'habénula.

**Figure 8.** Anatomie de l'IPN.

**Figure 9.** Organisation topographique du circuit MHb-IPN

**Figure 10.** Connexions afférentes et efférentes de la voie MHb-IPN.

**Figure 11.** Critères diagnostique du TUAL d'après le DSM-5.

**Figure 12.** Structure des nAChRs.

**Figure 13.** Expression des sous-unités du nAChR dans le SNC.

**Figure 14.** Représentation didactique des trois principaux états fonctionnels du nAChR.

**Figure 15.** Innervation cholinergique de l'ATV.

**Figure 16.** Les récepteurs nAChRs contrôlent la connectivité afférente et éfferente des neurones dopaminergiques de l'ATV.

**Figure 17.** Cluster contenant le gène CHRNA5 codant pour la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR.

**Figure 18.** Expression de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans les neurones GABAergiques de l'IPN et dopaminergiques de l'ATV.

**Figure 19.** Propriétés conférées par la sous-unité  $\alpha 5$  au sein du nAChR.

**Figure 20.**  $\alpha 5$ -Amigo1 et  $\alpha 5$ -Epyc : deux sous-populations de neurones GABAergiques de l'IPN exprimant la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR.

**Figure 21.** La sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est exprimée dans plusieurs circuits impliqués dans l'addiction.

**Figure 22.** Auto-administration intra-ATV d'alcool et enregistrement électrophysiologiques des neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN chez des souris  $\alpha 5^{+/-}$  mâles.

**Figure 23.** Auto-administration intra-ATV d'alcool chez des mâles et des femelles  $\alpha 5$ KI porteurs du  $\alpha 5$ -SNP D398N humain.

**Figure 24.** Modulation différentielle des voies BLA-CA1d et BLA-CA1v chez les mutants  $\alpha 5$ .

**Figure 25.** TUALs de type I/II et souris  $\alpha 5$ KI/ $\alpha 5$ KO.

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

# Partie I : L'alcool : histoire, effets et circuits neuronaux

## I- De l'usage au problème de santé publique

### 1. L'alcool : l'un des psychotropes licites les plus consommés

#### a. Brève histoire de l'alcool

Les boissons alcoolisées, qu'elles soient obtenues par fermentation (bière, vin, cidre) ou par distillation (digestifs, apéritifs, liqueurs et boissons titrant plus de 15% vol d'alcool) ont pour dénominateur commun l'**éthanol** (EtOH) de formule chimique  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , plus connu sous le terme d'alcool qui sera employé tout au long de ce manuscrit. L'alcool est un **psychotrope naturel** qui modifie l'activité cérébrale.

L'ivresse procurée par l'alcool est connue depuis la nuit des temps. Dyonisos (chez les grecs) et Bacchus (chez les romains) sont les dieux du vin et de ses excès ; après le déluge, Noé « *planta la vigne et s'enivra* » (Genèse). Que ce soit dans un cadre rituel, sacré, convivial ou festif, la littérature a toujours rapporté la présence d'alcool dans la vie sociale des humains (Khaderi, 2019).

En France, l'augmentation de la consommation d'alcools forts et les troubles liés à l'excès d'alcool commencent à mobiliser certains groupes sociaux à la fin du 19ème siècle, qui obtiennent finalement l'interdiction de l'absinthe par le gouvernement en mars 1915. Aux Etats-Unis, les désordres causés par l'alcool et la montée de mouvements de moralisation de la vie publique conduisent de 1919 à 1933 à la prohibition généralisée de l'alcool. La Finlande adopte la même règle de 1919 à 1932 et la Russie interdit la vente libre de vodka de 1914 à 1925. Mais face aux difficultés à faire appliquer ces lois, les risques liés à la consommation de produits non réglementés et l'absence de taxe sur l'alcool, les résolutions de ces gouvernements prennent fin et l'alcool redevient **licite**.

Malgré la constatation des conséquences néfastes associées à sa consommation et son statut temporairement illicite, l'alcool n'a pas toujours été considéré comme une **drogue**. Etant très fortement ancré dans certaines cultures depuis des millénaires, l'opinion publique a tendance à ne pas considérer l'alcool comme une drogue avant la publication en 1998 d'un rapport rédigé par le pharmacologue Bernard Roques (Roques et al., 1998). Ce dernier bouscule les idées reçues en établissant une classification des drogues sans préjuger de leur caractère licite

ou illicite mais en se fondant sur les symptômes de dépendance physiques et psychiques, la neurotoxicité, la toxicité générale, les effets chez la femme enceinte et le nouveau-né ou encore la dangerosité sociale. La conclusion du rapport est que l'alcool (tout comme le tabac et l'héroïne) fait partie, d'après les critères de classification mentionnés ci-avant, du premier groupe de drogues le **plus dangereux** (les psychostimulants, hallucinogènes et tabac constituent le deuxième groupe, et le cannabis le troisième groupe).

Pourtant, dans de nombreuses sociétés d'aujourd'hui, la consommation de boissons alcoolisées fait partie intégrante du paysage culturel, patrimonial et traditionnel et accompagne les événements festifs de la vie familiale et sociale.

#### b. Statistiques de l'OMS (rapport de 2018)

À l'échelle mondiale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il y a actuellement **2,3 milliards de consommateurs** d'alcool (World Health Organization, 2018). La consommation quotidienne moyenne d'un buveur est de 33 grammes d'alcool pur par jour, ce qui équivaut approximativement à deux verres de vin (de 150 ml), à une grande bouteille de bière (de 750 ml) ou à deux verres de spiritueux (de 40 ml). Les enquêtes en milieu scolaire indiquent que, dans de nombreux pays, la consommation d'alcool commence avant l'âge de 15 ans et en Europe, près de 44% des jeunes de 15 à 19 ans sont consommateurs. Au cours de ces dernières années, les conduites d'alcoolisation des adolescents et jeunes adultes ont évoluées avec par exemple l'apparition d'un nouveau mode de consommation appelé le « **binge drinking** ». Ce terme anglo-saxon fait référence à une consommation d'alcool excessive, c'est-à-dire jusqu'à intoxication, et épisodique, c'est-à-dire dans un laps de temps très court (Maurage et al., 2020). Il s'agit ainsi d'une alternance récurrente entre des épisodes d'intoxication intense et des périodes d'abstinence, motivée par la recherche intentionnelle et organisée d'ivresse qui se déroule souvent en groupe et parfois sur la voie publique.

Des mesures nationales de lutte contre la drogue et de prévention des dépendances sont en place avec par exemple, en France, la **MILDECA** (Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue Et les Conduites Addictives ; <https://www.drogues.gouv.fr/la-mildeca/>). Depuis 1999, la MILDECA a élargi son champ d'action à l'alcool et a apporté quelques améliorations observées ces dernières années auprès des collégiens et lycéens. La MILDECA a notamment intégré dans sa stratégie la sensibilisation des jeunes, par la recherche, aux dangers des addictions ; et de sa collaboration avec l'association l'Arbre des connaissances et l'INSERM est

né en 2012 le programme **Apprentis Chercheurs MAAD** (Mécanisme des Addictions à l'Alcool et aux Drogues ; <https://www.maad-digital.fr/thematiques-abordees/apprentis-chercheurs>). Ce programme, auquel mon équipe et moi avons participé deux années de suite (**Figure 1**), vise à accueillir au laboratoire un binôme composé d'un collégien et d'un lycéen. A raison de 9 mercredis par an, ces apprentis chercheurs enfilent blouse et gants pour mener des expériences et être initiés à la recherche dans le domaine des addictions. Cette expérience très enrichissante leur permet de prendre conscience des effets délétères induits par la consommation d'alcool sur le cerveau, de les aider à opérer des choix éclairés à l'égard de l'alcool et de partager ces connaissances avec leurs camarades et leur entourage.



**Figure 1.** Apprentis chercheurs MAAD accueillis dans notre équipe pour être sensibilisés à la recherche sur les troubles de l'usage d'alcool. Gauche : Florine et Valentine à la paillasse (édition 2017-2018). Droite : Lily-Rose et Mathias en soutien dans les tests comportementaux (édition 2018-2019).

Mais ces différentes mesures sont relativement récentes et les niveaux de consommation d'alcool chez les jeunes restent très préoccupants. De plus, les tendances et les projections établies en 2018 prévoient une augmentation sur 10 ans de la consommation mondiale d'alcool par habitant. Or l'abus d'alcool entraîne déjà aujourd'hui dans le monde **3,3 millions de décès chaque année**, soit 5,9% des décès totaux et près de **25% des décès chez les 20-39 ans**. La consommation d'alcool est un facteur étiologique dans **plus de 200 maladies et traumatismes** (World Health Organization., 2018). Elle est associée au risque d'apparition de troubles mentaux et comportementaux, de maladies hépatiques et cardiovasculaires, de cancers mais aussi à des traumatismes intentionnels ou non intentionnels résultant d'actes de

violence, de suicides et d'accidents de la circulation routière. La consommation d'alcool chez la femme enceinte peut également entraîner un syndrome d'alcoolisme fœtal ou des complications liées à la prématurité.

On estime qu'au niveau mondial, **237 millions d'hommes et 46 millions de femmes souffrent de troubles de l'usage d'alcool (TUALs)**. C'est en Europe et aux Etats-Unis que les prévalences sont les plus élevées (14,8 % chez les hommes et 3,5 % chez les femmes ; et 11,5 % chez les hommes et 5,1 % chez les femmes, respectivement).

En dépit de mesures gouvernementales et d'efforts de préventions, les TUALs affectent donc la santé et la vie de plusieurs centaines de millions de personnes dans le monde, que ce soit celles des personnes atteintes ou celles des membres de leur famille et de leur entourage. De plus, malgré les progrès réalisés en matière de diagnostic, de prise en charge et de traitements, ceux-ci sont encore insuffisants pour soigner de manière durable les TUALs. Ces difficultés sont notamment liées à la complexité de ce spectre pathologique (tant dans son étiologie, que dans son identification ou sa progression) dont l'hétérogénéité n'est appréhendée que depuis récemment (Litten et al., 2015b). Et comme discuté récemment (Heilig et al., 2021), l'hétérogénéité de la rémission et du rétablissement, ou encore de l'absence d'une signature neuronale spécifique de l'addiction, ont fait l'objet de nombreuses critiques ces dernières années, remettant en question la considération de l'addiction comme une **pathologie cérébrale** (pourtant bien acceptée dans la communauté neuroscientifique). Ce déni est bien sûr une entrave supplémentaire à la compréhension et surtout au développement de traitements et à leur accès, et souligne aussi le besoin urgent de renforcer la recherche multidisciplinaire

### c. Définition préliminaire des concepts clefs

Malgré ces effets toxiques (ataxie, inattention, diminution des réflexes) et létaux (détresse respiratoire) à forte dose, l'alcool a des effets récréatifs et anxiolytiques à faible dose (euphorie, convivialité, levée de l'inhibition sociale). Cette capacité à induire du **plaisir** ou à **soulager** d'une certaine **détresse** motive sa consommation et la répétition de cette consommation (Gilman et al., 2008). L'alcool est en effet, comme toutes les drogues, à la fois **récompensant** et **renforçant**. Les récompenses sont les stimuli que le cerveau interprète comme intrinsèquement positifs, alors que les stimuli renforçants sont ceux qui augmentent



la probabilité que les comportements associés avec (impliquant la recherche et la consommation) soient répétés (Nestler et al., 2009).

Le **circuit cérébral de la récompense** ciblé par les drogues, répond normalement aux renforcements naturels tels que la nourriture, l'eau ou le sexe, et inclut les projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) du mésencéphale vers le noyau accumbens (NAc) et d'autres structures du cerveau antérieur. L'usage répété d'alcool produit de nombreux changements au niveau de ce circuit impliqué dans les phénomènes de tolérance/sensibilisation, de dépendance notamment psychologique et de rechute (G. F. Koob et al., 1998).

La **tolérance ou sensibilisation** à l'alcool fait référence à la diminution des effets après son administration répétée à la même dose, ou à la nécessité d'augmenter la dose afin d'obtenir l'effet recherché (Nestler et al., 2009).

La **dépendance à l'alcool** est un état adaptatif qui se développe en réponse à une administration répétée d'alcool, et qui en cas d'arrêt brusque de la consommation rompt l'équilibre homéostatique et engendre l'apparition de symptômes de sevrage (Nestler et al., 2009; Rolland, 2016).

L'**addiction à l'alcool** se caractérise quant à elle, par une consommation compulsive et incontrôlable d'alcool, en dépit des conséquences négatives que celle-ci engendre et résulte d'une dérégulation du processus de renforcement positif croissant sous-tendu par le circuit cérébral de la récompense. La dépendance, la tolérance, et les autres conséquences dérivées d'une consommation à long-terme de drogue peuvent être concourantes au développement de l'addiction mais ne sont pas étiologiquement reliées : les symptômes de sevrage ne sont pas nécessaires ou suffisants au développement des comportements addictifs (Nestler et al., 2009; Rolland, 2016).

Le diagnostic de « **trouble de l'usage d'alcool** » (**TUAL**) englobe à la fois les dimensions de tolérance, de dépendance physique et psychologique et de perte de contrôle qui définissent une addiction à l'alcool. Cette appellation désigne ainsi l'utilisation anormale/pathologique de l'alcool (Rolland, 2014, 2016). L'appellation de « troubles liés à l'usage d'alcool » fait quant à elle plutôt référence aux troubles induits par l'alcool, c'est-à-dire aux conséquences de sa consommation (Rolland, 2016). Par exemple, le syndrome de Wernicke-Korsakoff est un trouble lié à l'usage d'alcool, mais ne fait pas référence à un trouble de l'usage d'alcool (TUAL).

## 2. Principaux effets neuropharmacologiques de l'alcool

### a. En consommation aiguë

L'alcool, à la différence des autres drogues, interagit avec un grand nombre de cibles distinctes dans l'organisme (avec plus ou moins d'affinité). De par ses propriétés liposolubles, il désorganise de manière non spécifique les membranes plasmiques, pénètre à l'intérieur des cellules et même de leur noyau où il modifie l'expression génique. Il interagit aussi directement avec certains canaux ioniques et récepteurs membranaires localisés à la surface des cellules. Parmi toutes ces cibles, **c'est pour les récepteurs GABAergiques de type A (GABA<sub>A</sub>) et glutamatergiques NMDA que l'alcool présente le plus d'affinité** (G. F. Koob & Volkow, 2016; Nestler et al., 2009). Les effets initiaux de l'alcool résultent de :

- la facilitation de la neurotransmission inhibitrice par les **récepteurs GABA<sub>A</sub>** (responsables des effets anxiolytiques, sédatifs et de paralysie respiratoire en cas d'overdose) ;
- et de la diminution de la neurotransmission excitatrice par blocage des **récepteurs NMDA** ; contribuant aux effets psychotomimétiques et amnésiants).

A plus forte dose, l'alcool entraîne également :

- une diminution de la fonction neuronale globale en bloquant les **canaux calciques (Ca<sup>2+</sup>) de type L**,
- et la stimulation des **récepteurs sérotoninergiques de type 3 (5-HT<sub>3</sub>)** contribuant aux effets euphorisants, nausées et vomissements.

### b. En consommation chronique

L'ingestion chronique d'alcool entraîne la mise en place progressive de **mécanismes compensatoires** visant à réadapter le fonctionnement cérébral en présence d'alcool (G. F. Koob & Volkow, 2016; Nestler et al., 2009). L'activation excessive et chronique des récepteurs GABA<sub>A</sub> est compensée par une régulation à la baisse du nombre de récepteurs fonctionnels (désensibilisation voire disparition). A l'inverse, le blocage chronique des récepteurs NMDA et canaux Ca<sup>2+</sup>-type L est compensé par une régulation à la hausse du nombre de récepteurs et canaux fonctionnels (augmentation de leur expression).

### c. Lors d'un sevrage alcoolique

Lorsque l'équilibre homéostatique compensatoire est rompu par l'arrêt brutal de la consommation, il en résulte une **hyperactivité glutamatergique** et une **hypoactivité GABAergique** (G. F. Koob & Volkow, 2016; Nestler et al., 2009). Cet état d'**hyperexcitation cérébrale** est à l'origine de pertes neuronales (neurones soumis à des influx calciques excessifs et toxiques) et de **symptômes de sevrages** : hypertension artérielle, tachycardie, tachypnée, hyperthermie, transpiration, tremblements, convulsions ou crises épileptiques, hallucinations auditives, visuelles et tactiles avec désorientations temporelles, paranoïa et délire de persécution contribuant à l'état d'agitation. Un syndrome de sevrage alcoolique non pris en charge peut évoluer jusqu'à une forme sévère appelée **délirium tremens**. Cet état, pouvant durer entre 5 jours et 2 semaines, est caractérisé par une confusion extrême (perte des notions de lieu, temps et identité), des hallucinations constantes et effrayantes (psychotiques), des idées délirantes (persécution, mysticisme, mégalomanie) et de la fièvre.

Avant la mise en place de traitements adaptés, le taux de mortalité associé au délirium tremens était de 35%, mais il est aujourd'hui descendu à 5%. De manière générale, de nombreux traitements ont démontré leur efficacité dans l'accompagnement et le maintien à court terme de l'abstinence. Mais à long terme, 80% des patients rechutent et il n'existe à ce jour pas de traitement véritablement efficace (du moins pour tous les patients) contre la dimension « addictive » des TUALs, dont les principaux mécanismes connus à ce jour sont décrits ci-après.

## II- Circuits neuronaux des effets récompensants et renforçants de l'alcool

### 1. Description du circuit cérébral de la récompense

#### a. Voie dopaminergique mésocorticolimbique

Les substrats neuronaux sous-tendant la perception de la récompense et le phénomène de renforcement positif sont faits d'un ensemble de structures interconnectées du cerveau antérieur appelé **circuit cérébral de la récompense** ou **système du plaisir** (S. Cooper et al., 2017; Ikemoto, 2010; G. F. Koob, 1992). Celles-ci incluent de nombreuses structures dont les « principales » sont : le noyau accumbens, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, le septum et le cortex préfrontal. Ces structures reçoivent une riche

innervation **dopaminergique** en provenance de l'**aire tegmentale ventrale (ATV)** du mésencéphale que l'on appelle alors **voie dopaminergique mésocorticolimbique**. Au niveau anatomique, la voie dopaminergique mésocorticolimbique passe par ce que l'on appelle le **faisceau télencéphalique médian** (FTM ou MFB pour « medial forebrain bundle »).

Le circuit cérébral de la récompense a normalement pour fonction de consolider les comportements nécessaires à la survie et à la reproduction : il sous-tend le plaisir et les comportements associés aux renforcements naturels tels que la nourriture, l'eau ou le sexe. Mais les drogues d'abus sont aussi capables d'**activer artificiellement** ce circuit de manière à augmenter soit la libération de dopamine (DA), soit les effets de la DA dans le NAc ou les structures associées, soit à produire des effets similaires à ceux de la DA (Nestler et al., 2009; Pierce & Kumaresan, 2006).

#### b. Principales voies glutamatergiques et GABAergiques

L'arrivée d'un signal annonçant une récompense, après traitement sensoriel par le cortex, modifie l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV. Ceux-ci libèrent de la DA dans le noyau accumbens, le cortex préfrontal, l'amygdale et le septum. La libération de DA dans le **noyau accumbens (NAc)** sous-tend les effets plaisants de la récompense et les processus motivationnels associés à la consommation de cette récompense. Le **cortex préfrontal (CPF)** est impliqué dans la focalisation de l'attention et la prise de décision, et renvoie des projections glutamatergiques en direction de l'ATV (G. F. Koob, 1992). L'**amygdale** et le **septum** contribuent à l'évaluation du caractère récompensant ou non des stimuli neutres associés à la récompense, et l'amygdale permet aussi l'établissement et l'apprentissage d'associations entre le caractère plaisant ou non d'une expérience et les stimuli neutres présents lors de cette expérience. L'**hippocampe (HPC)** intervient également dans la mémorisation du contexte spatio-temporel associé à l'expérience plaisante. Il envoie avec le CPF et l'amygdale des projections glutamatergiques vers le NAc (qui reçoit aussi de la part de l'amygdale des afférences GABAergiques). Selon les différents signaux reçus, le NAc envoie ensuite des informations vers le tronc cérébral et les voies motrices pour enclencher ou non une action dirigée vers la récompense. Le NAc envoie également en retour des projections GABAergiques (avec dynorphine et substance P) vers l'ATV, formant ainsi **une boucle de rétrocontrôle directe ATV-NAc-ATV**. Toutes ces cibles sont interconnectées et l'amygdale, l'HPC et le NAc innervent l'hypothalamus (par des voies respectivement : glutamatergique, glutamatergique et GABAergique). L'**hypothalamus** est important pour la coordination entre

l'intérêt pour la récompense et les besoins physiologiques pour l'organisme. Il envoie en retour des projections peptidergiques vers le NAc.

## 2. Anatomie de l'aire tegmentale ventrale : ATV

### c. Cytoarchitecture de l'ATV

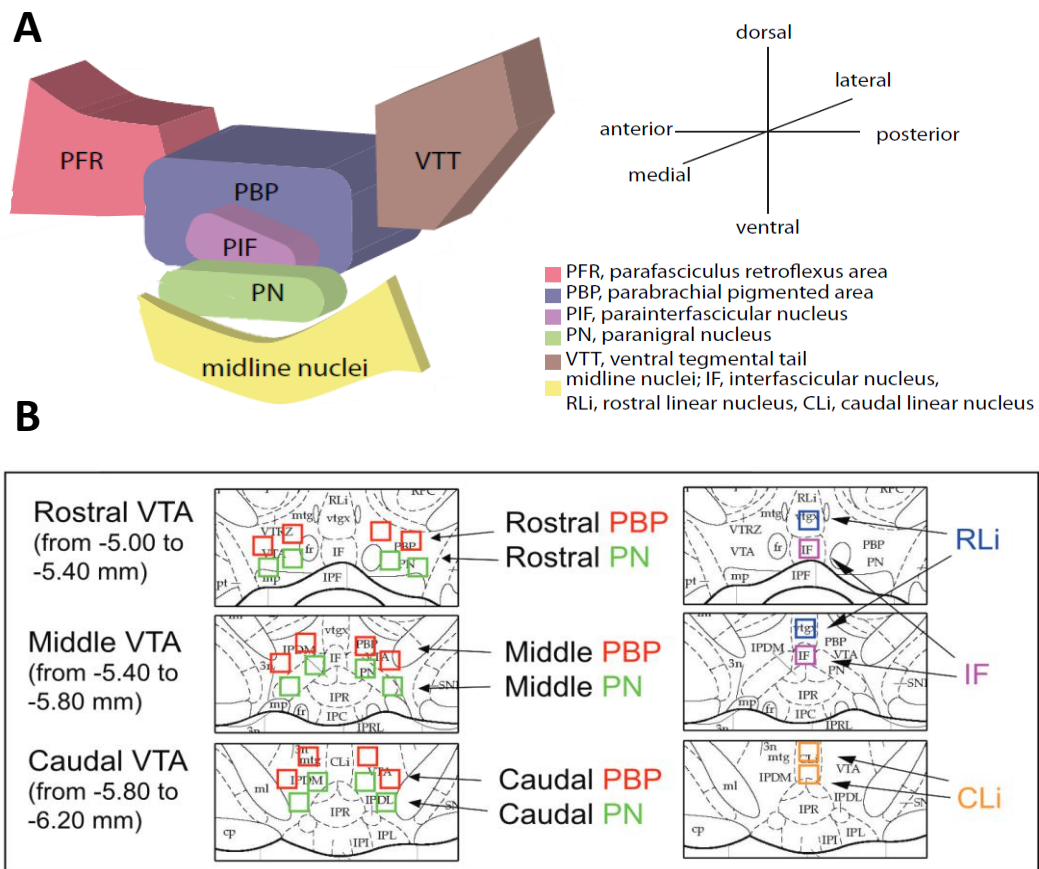
L'**aire tegmentale ventrale (ATV)** est une structure cérébrale profonde à localisation médioventrale appartenant au mésencéphale, limitée latéralement par la substance noire compacte, dorsalement par les noyaux rouges et ventralement par le noyau interpedonculaire.

C'est une structure **hétérogène** composée elle-même de différents noyaux (**Figure 2**) et de différents de types de neurones aux propriétés électrophysiologiques différentes. Plusieurs sous-divisions de l'ATV (jusqu'à 8) ont été proposées (Ikemoto, 2007; Phillipson, 1979) avec : les noyaux **parabrachial pigmenté (PBP)**, **paranigral (PN)**, **parainterfasciculaire (PIF)** **interfasciculaire (IF)**, **linéaire rostral (RLi)** et **linéaire caudal (CLi)**, l'**aire rétroflexus parafasciculaire (PFR)** et le **RMTg** ou **queue de l'ATV (VTT ou tvTA)**.

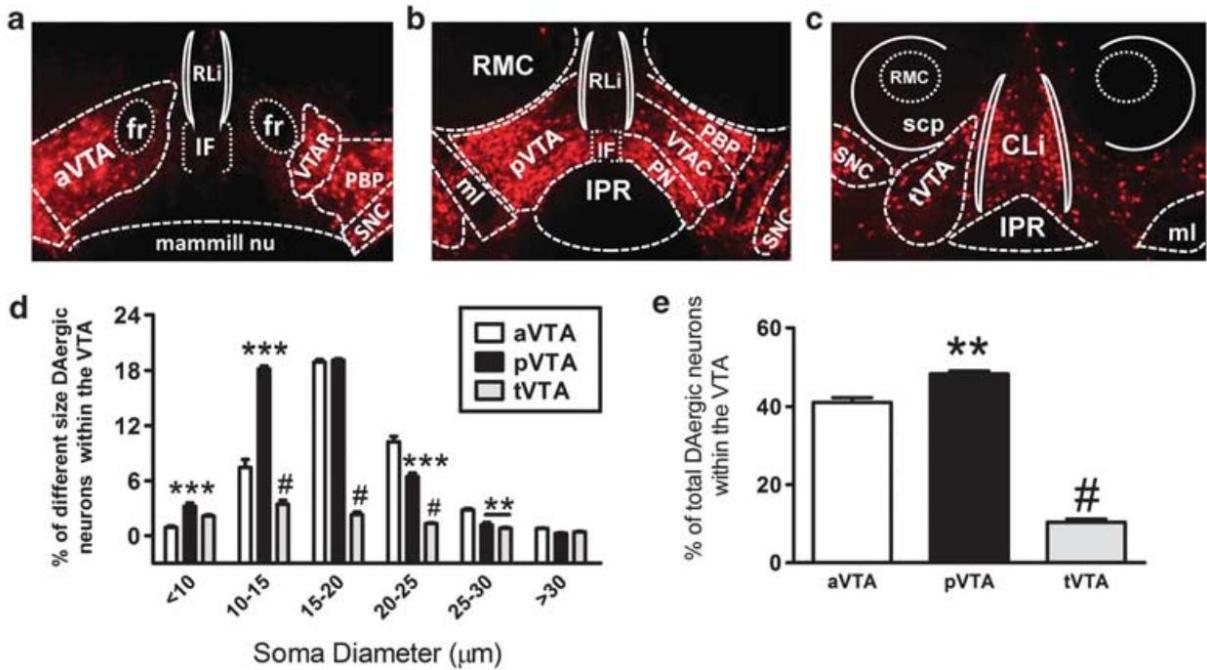
L'ATV contient trois types neuronaux : les plus abondants sont les **neurones dopaminergiques** représentant 60 à 65% de la population neuronale totale, suivis des **neurones GABAergiques** qui représentent 30 à 35% des neurones totaux (de projection ou interneurones locaux), et un petit nombre de **neurones glutamatergiques** représentant approximativement 2% à 3% du total (Carr & Sesack, 2000; Morales & Margolis, 2017a; Swanson, 1982). Des **neurones mixtes** co-libérant DA et glutamate, DA et GABA ou glutamate et GABA ont également été identifiés (Morales & Margolis, 2017a; Ungless & Grace, 2012; Yamaguchi et al., 2011). Ce fait souligne l'importance de l'identification précise des neurones enregistrés lors d'études électrophysiologiques.

Tous ces neurones sont entremêlés mais pas répartis de manière homogène dans cette aire. Les parties caudale et ventrale de l'ATV contiennent le plus grand pourcentage de neurones dopaminergiques comme illustré en **Figure 3** (Margolis et al., 2006; Zhao-Shea et al., 2011b). Les neurones GABA de l'ATV ont une topographie rostro-caudale (Olson & Nestler, 2007). Et les neurones glutamatergiques sont localisés au niveau des parties rostrale et médiale de l'ATV et leur nombre décroît dans les portions caudale et latérale (Yamaguchi et al., 2011). En terme de sous-divisions, les noyaux PN et surtout PBP sont les plus riches en neurones

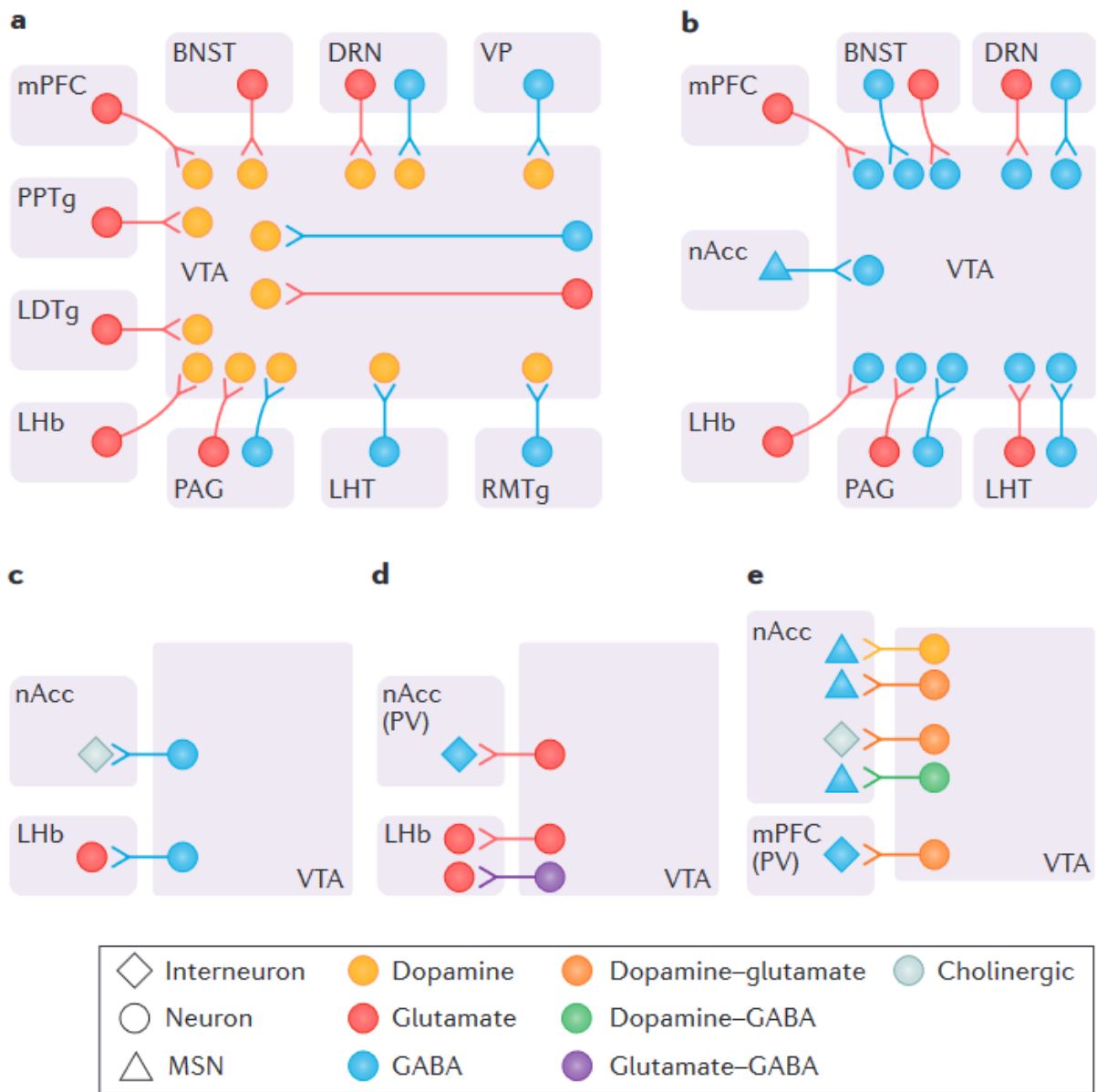
dopaminergiques (Nair-Roberts et al., 2008), alors que le PFR et le RMTg en présentent une faible densité (Ikemoto, 2007). La partie latérale du PBP et surtout le noyau PN sont les plus riches en neurones GABAergiques (Olson & Nestler, 2007), tandis que l'expression des neurones glutamatergiques est d'avantage concentrée dans les noyaux médians IF et RLi (Morales & Margolis, 2017a).



**Figure 2 : Anatomie de l'ATV. (A)** Représentation schématique des 7 sous-noyaux de l'ATV en vue sagittale gauche. Figure extraite de (Holly & Miczek, 2016). **(B)** Diagrammes représentant les sous-noyaux de l'ATV présents au niveau rostral (Bregma -5,0 à -5,4 mm), médian (Bregma -5,4 à -5,8 mm) et caudal (Bregma -5,8 à -6,2 mm) de l'ATV, sur des planches anatomiques de sections coronales de cerveau de rat. Figure extraite de (Ciccarelli et al., 2012). **Abréviations:** CLi, noyau linéaire caudal ; IF, noyau interfasciculaire ; PFR, aire réflexus parafasciculaire ; PBP, aire parabrachiale pigmentée ; PIF, noyau parainterfasciculaire ; PN, noyau paranigral ; RLi, noyau linéaire rostral ; VTT, queue de l'ATV.



**Figure 3: Répartition, taille et densité des neurones dopaminergiques dans l'ATV antérieure, postérieure et de sa queue.** (a–c) Tranches représentatives du mésencéphale montrant les neurones dopaminergiques (en rouge) dans l'ATV antérieure (aVTA), postérieure (pVTA) ou la queue (tVTA). (a) Entre -2.91 et -3.28 mm du bregma, la aVTA est définie comme la région dorsale au noyau mammillaire médian et médiale à la substance noire pars compacta (SNC). Elle contient deux sous-régions : l'aire tegmentale ventrale rostrale (VTAR) et le noyau parabrachial pigmenté (PBP). La aVTA n'inclut pas les noyaux interfasciculaire (IF) et linéaire rostral (RLi). (b) Entre -3.28 et -3.80 mm du bregma, la pVTA est définie comme la région dorsale au noyau interpedonculaire (IPR), médiale à la SNC et ventrale au noyau rouge (RMC et/ou scp). Elle contient trois sous-régions : le PBP, l'aire tegmentale ventrale caudale (VTAC) et le noyau paranigral (PN). La pVTA n'inclut pas les noyaux IF et RLi et/ou le noyau linéaire caudal (CLi). (c) Entre -3.80 et -4.04 mm du bregma, la tVTA est définie comme l'étendue la plus caudale de l'ATV. La tVTA a une faible densité de neurones dopaminergiques et une densité élevée de neurones GABAergiques. (d) Taille du soma des neurones dopaminergiques dans l'aVTA (barre blanche), la pVTA (barre noire) et la tVTA (barre grise). (e) Densité des neurones dopaminergiques dans la aVTA, la pVTA et la tVTA. 2508-2864 neurones dopaminergiques ont été mesurés par souris. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  par à la aVTA. # $p < 0.001$  par à l'aVTA et à la pVTA. Figure extraite de (Zhao-Shea et al., 2011b). **Abbréviations:** aVTA, ATV antérieure; CLi, noyau linéaire caudal; fr, fasciculus retroflexus; IPR, noyau interpedonculaire; ml, lemnisque médian; PBP, noyau parabrachial pigmenté; pVTA, ATV postérieure; RLi, noyau linéaire rostra; SNC, substance noire compacta; tVTA, queue de l'ATV; VTAC; VTAR,



**Figure 4: Afférences et efférences de l'ATV.** Ces schémas résument les principales connexions synaptiques de l'ATV ayant été détectées anatomiquement (par microscopie électronique) ou fonctionnellement (par optogénétique et électrophysiologie *ex vivo*). En **(a)** et **(b)** sont représentées les afférences respectives sur les neurones dopaminergiques et GABAergiques de l'ATV ; et en **(c)**, **(d)** et **(e)** sont représentées les efférences respectives des neurones GABAergiques, glutamatergiques et dopaminergiques. Figure issue de la revue de (Morales & Margolis, 2017b). **Abréviations:** *BNST*, noyau lit de la strie terminale; *DRN*, noyau raphé dorsal ; *LDTg*, noyau tegmental latéro-dorsal; *LHb*, habénula latérale; *LHT*, hypothalamus latéral; *mPFC*, cortex préfrontal médian; *MSNs*, neurones spinifères de taille moyenne; *nAcc*, noyau accumbens; *PAG*, substance grise périaqueducule; *PPTg*, noyau tegmental pédonculo-pontin; *PV*, parvalbumine; *RMTg*, noyau tegmental rostromédian; *VP*, pallidum ventral; *VTA*, aire tegmentale ventrale.



#### d. Afférences de l'ATV

Comme schématisé dans la **Figure 4**, l'ATV reçoit des projections en provenance de diverses régions cérébrales, incluant des projections glutamatergiques du CPF, mais aussi glutamatergiques, cholinergiques et GABAergiques en provenance de noyaux tegmental pédonculo-pontin (PPTg) et tegmental latéro-dorsal (LDTg ; Dautan et al., 2016; Geisler & Zahm, 2005; Oakman et al., 1995; Sesack & Grace, 2010). Les autres régions projetant sur l'ATV sont notamment le NAc, l'amygdale, le pallidum ventral, le colliculus supérieur, l'hypothalamus latéral et aussi l'habénula latérale (LH) capable de moduler la libération de DA mésolimbique par l'ATV (Herkenham & Nauta, 1979; Matsumoto & Hikosaka, 2007).

#### e. Afférences de l'ATV

Les neurones de l'ATV projettent sur le striatum ventro-médian incluant le « core » et le « shell » du NAc, le CPF, l'HPC, le cortex entorhinal et les aires septales latérales (Beier et al., 2015). Des études utilisant des marqueurs rétrogrades ont démontré que des groupes distincts de neurones originaires de l'ATV projettent sur des régions spécifiques du cerveau antérieur (Margolis et al., 2006; Morales & Margolis, 2017a). Les projections sur le NAc contiennent 65-85 % de neurones dopaminergiques, tandis que seulement 30-40 % des projections sur le CPF sont dopaminergiques (Fallon et al., 1984; Swanson, 1982; Yetnikoff et al., 2014) ; les neurones restants sont GABAergiques (Carr & Sesack, 2000).

### **3. Rôle des neurones dopaminergiques de l'ATV en conditions normales et pathologiques**

#### a. Le contrôle des comportements motivés

Le rôle majeur des neurones dopaminergiques de l'ATV est de développer la **motivation** et d'engendrer des comportements adaptés en fonction de l'état physiologique de l'individu face aux changements de l'environnement (Bromberg-Martin et al., 2010). Les comportements motivés vers un stimulus impliquent l'**estimation** de la composante **affective** de ce stimulus (plaisir ou déplaisir provoqué par sa « consommation »); et de la « **valeur incitatrice** » associée à ce stimulus, c'est-à-dire le niveau d'effort à fournir pour consommer ce plaisir ou éviter ce déplaisir.

Les neurones dopaminergiques ont au moins deux modes de fréquence de décharge : tonique et phasique. L'activation **tonique** consiste en une fréquence de décharge régulière (<10 Hz)

en l'absence de stimulus qui maintient un niveau basal (faible) du neurotransmetteur extracellulaire (la DA) (Schultz, 2010; Schultz et al., 1997). L'activation **phasique** entraîne une augmentation de la fréquence de décharge (15-200 Hz) des neurones dopaminergiques qui aboutit à une augmentation significative des taux extracellulaires de DA (Phillips et al., 2003) et une disponibilité post-phasique prolongée de la DA dans le NAc (Lohani et al., 2018). Une augmentation de la fréquence de décharge tonique entraîne également une augmentation de la libération de DA dans les structures cibles comme le NAc, mais dans une moindre mesure qu'une fréquence de décharge phasique (Floresco et al., 2003).

Les changements entre ces différents modes de libération de DA coderaient non seulement la valence de la motivation mais aussi son intensité (Salamone et al., 2015, 2016; Salamone & Correa, 2012). La présentation de **stimuli récompensants** entraîne une libération phasique de DA par 60 à 80% des neurones dopaminergiques de l'ATV (Berridge, 2012; Schultz, 2010). Tsai et coll., 2009 ont notamment démontré par une approche optogénétique que l'excitation phasique des neurones dopaminergiques de l'ATV chez l'animal éveillé était suffisante pour entraîner, même en l'absence de récompense, un comportement conditionné de préférence de place (Tsai et al., 2009). D'autres études ont montré que l'activité dopaminergique prédictive reflète la magnitude attendue, produisant ainsi un signal proportionnel à la valeur espérée de la récompense (Tobler et al., 2005).

De nombreuses études ont montré qu'au-delà des stimuli plaisants, les **stimuli aversifs** peuvent aussi changer l'activité des neurones dopaminergiques. Une expérience stressante ou aversive peut causer l'activation phasique, tonique ou l'inhibition de neurones dopaminergiques et donc des changements du taux de DA libérée dans les régions de projections (Barik et al., 2013; Brischoux et al., 2009; Chaudhury et al., 2013; Lammel et al., 2012; Valenti et al., 2012). Les neurones GABAergiques du RMTg (ou queue de l'ATV) semblent notamment moduler l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV en réponse à des stimuli aversifs (Jhou et al., 2009). Une étude plus récente a également démontré que les terminaisons dopaminergiques dans la portion ventromédiane (vm) de la coquille du NAc sont excités par des stimuli aversifs (de Jong et al., 2019). Cette signalisation dopaminergique liée à l'aversion dans le « shell » du NAcvm est médiée par des entrées glutamatergiques dans l'ATV en provenance de l'hypothalamus latéral (de Jong et al., 2019).

Pendant un conditionnement, les synapses entre les neurones dopaminergiques et leurs cibles sont renforcées (décharges phasiques) puis normalisées lorsque le comportement est

conditionné (décharges toniques) ; indiquant que la plasticité des neurones dopaminergiques sous-tend au moins partiellement cette forme d'**apprentissage** et que l'activité phasique contribue au conditionnement (Stuber et al., 2008, 2012).

#### b. La signalisation de l'erreur de prédiction de la récompense

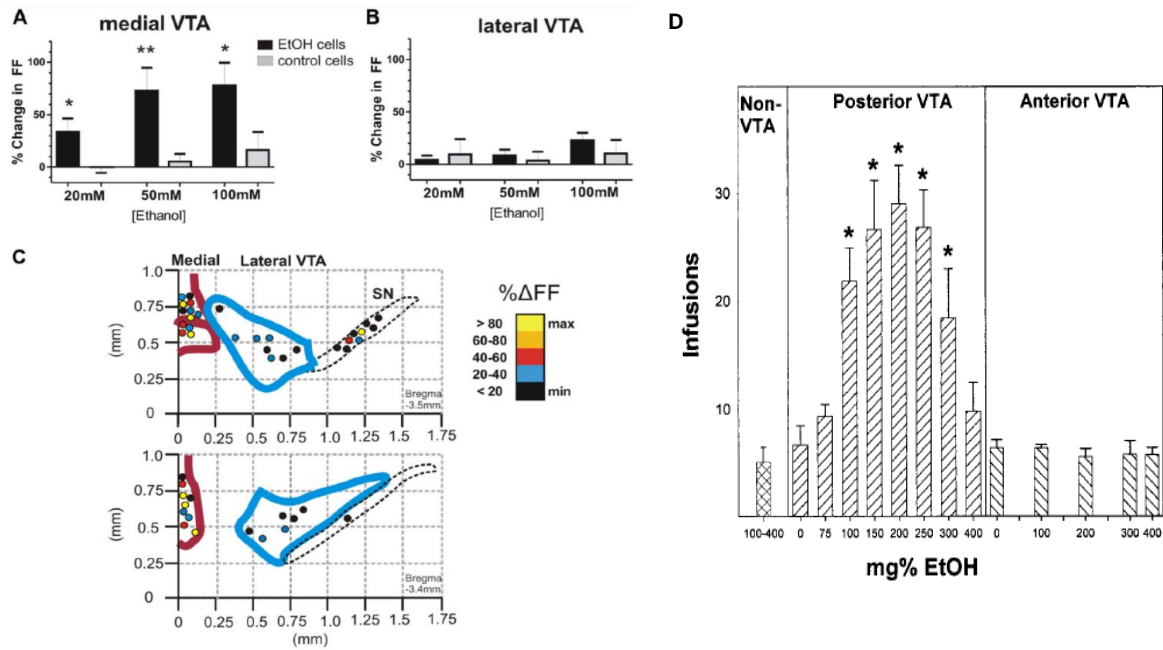
La libération de DA par les neurones de l'ATV sous-tend également l'**erreur de prédiction de récompense (EPR)**, lorsque qu'un indice contextuel (neutre) qui a été apparié de manière répétée à la prise de récompense n'est plus suivi par la délivrance de celle-ci (Schultz, 2016). En effet, après l'apprentissage d'une association entre un stimulus neutre et une récompense, les neurones dopaminergiques de l'ATV présentent une augmentation d'activité lors de la présence seule du stimulus neutre et lors de l'obtention inattendue de la récompense, mais ils ne réagissent pas lorsque la récompense prédite avec certitude est reçue, et présentent même une baisse de leur activité lorsqu'une récompense prédite est omise (Bayer & Glimcher, 2005; Schultz, 2016). Le signal d'erreur de prédiction est proportionnel à la quantité de récompense reçue (Fiorillo et al., 2003), et est également sensible aux **aspects temporels** de la réception, puisqu'une récompense retardée engendre une baisse d'activité au moment attendu, suivie d'une augmentation d'activité lorsqu'elle est finalement délivrée (Hollerman & Schultz, 1998). Les neurones dopaminergiques sont également sensibles à la **probabilité d'obtention** de la récompense, ce qui leur permet d'encoder une erreur de prédiction fine : leur activité augmente linéairement avec la probabilité au moment du stimulus prédictif, et est inversement proportionnelle à cette probabilité au moment de la réception de la récompense (Fiorillo et al., 2003). Ce mécanisme d'EPR est interprété comme l'implémentation d'un mécanisme d'apprentissage par renforcement au sein des neurones dopaminergiques. La DA est donc impliquée dans l'**apprentissage** et la **sélection de l'action** apportant une récompense optimale. D'après une étude récente, le codage de l'EPR serait sous-tendu par les neurones dopaminergiques localisés dans la partie médiane de l'ATV (Cai et al., 2020).

#### c. Les effets de l'alcool

La consommation d'alcool augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV (activité tonique -> phasique), ce qui a pour conséquence d'augmenter la libération de DA dans le NAC et la transmission d'un signal récompensant/de plaisir. Cette libération de DA a été démontré chez l'humain (Boileau et al., 2003) comme chez

le rongeur (Melendez et al., 2002). Lors d'enregistrements électrophysiologiques sur tranches de cerveau, les neurones de l'ATV sont spontanément actifs. L'application aigue de concentrations d'alcool comprises entre 20 et 200 mM sur ces tranches augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV (Didone et al., 2014; Juarez et al., 2017; Mrejeru et al., 2015), et la libération de DA dans le NAc (Yorgason et al., 2014). Les neurones dopaminergiques présentant la plus forte réponse à l'alcool semblent majoritairement localisés dans la **partie médiane de l'ATV**, comme illustré sur la **figure 5A-C**. L'élévation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques induite par l'alcool s'explique par différents mécanismes, dont la diminution du tonus inhibiteur qu'exercent les neurones GABAergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, la libération d'opioïdes endogènes ou encore une action directe mais encore non identifiée sur les neurones dopaminergiques (Nestler et al., 2009).

L'injection d'agonistes dopaminergiques, le blocage pharmacologique des récepteurs dopaminergiques, la destruction des neurones dopaminergiques ou une lésion du NAc réduit l'auto-administration d'alcool chez le rongeur (Dyr et al., 1993; Ng & George, 1994; Silvestre et al., 1996). Le rat s'auto-administre de l'alcool directement dans l'ATV (Ikemoto, 2006), et de manière plus robuste dans la **partie postérieure de l'ATV** comme illustré sur la **figure 5D** (Rodd, 2004; Rodd-Henricks et al., 2000). Les neurones dopaminergiques de l'ATV jouent donc un rôle crucial dans les effets récompensants et renforçants de l'alcool. Les neurones dopaminergiques de la portion latérale de l'ATV, mais pas médiane, semble également jouer un rôle fondamental dans la rechute de la consommation d'alcool induite par un contexte associé à l'alcool (Y. Liu et al., 2020).



**Figure 5. Hétérogénéité médio-latérale et antéro-postérieure de la réponse à l'alcool dans l'ATV.** Les cellules dopaminergiques médianes et latérales de l'ATV, enregistrées sur des tranches de cerveaux de souris, diffèrent de par leur réponse à l'alcool. **(A)** Dans l'ATV médiane, l'augmentation moyenne de la fréquence de décharge (FF pour « firing frequency ») avec alcool (barres noires) est de  $34 \pm 13$  % à 20 mM, de  $73 \pm 22$  % à 50 mM et de  $78 \pm 22$  % à 100 mM ( $n=19$ ). Ces changements étaient significatifs ( $p < 0,05$  à 20 et 100 mM,  $p < 0,01$  à 50 mM EtOH) par rapport aux neurones contrôles de l'ATV médiane sans alcool (barres grises). **(B)** Dans l'ATV latérale, l'augmentation moyenne de la FF avec alcool est de  $4 \pm 4$  % à 20 mM, de  $8 \pm 6$  % à 50 mM et de  $23 \pm 7$  % à 100 mM ( $n=11$ ). Ces changements ne sont pas significatifs par rapport aux neurones contrôles sans alcool (barres grises). **(C)** Localisation des cellules DA enregistrées dans l'ATV et la SN. En haut : Une tranche caudale (bregma  $-3,5$  mm). En bas : Une tranche plus rostrale (bregma  $-3,4$  mm). L'échelle de couleurs représente le pourcentage de variation de la FF avec l'alcool à 50 mM. Figure 5A-C extraite de (Mrejeru et al., 2015) **(D)** Histogrammes dose-réponse représentant le nombre moyen d'infusions d'alcool auto-administrées par des rats mâles, en fonction de la concentration en alcool (exprimée en mg%) et du site d'infusion (hors de l'ATV, dans la partie postérieure de l'ATV ou dans la partie antérieure de l'ATV). Les astérisques indiquent que le nombre d'infusions d'alcool auto-administrées est significativement supérieur ( $p < 0,05$ ) au nombre d'infusions de la solution contrôle (aCSF). Les rats s'auto-administrent de l'alcool préférentiellement dans la partie postérieure de l'ATV. Figure 5D extraite de (Rodd, 2004). **Abbréviations:** FF, fréquence de décharge; VTA, aire tegmentale ventrale.

---

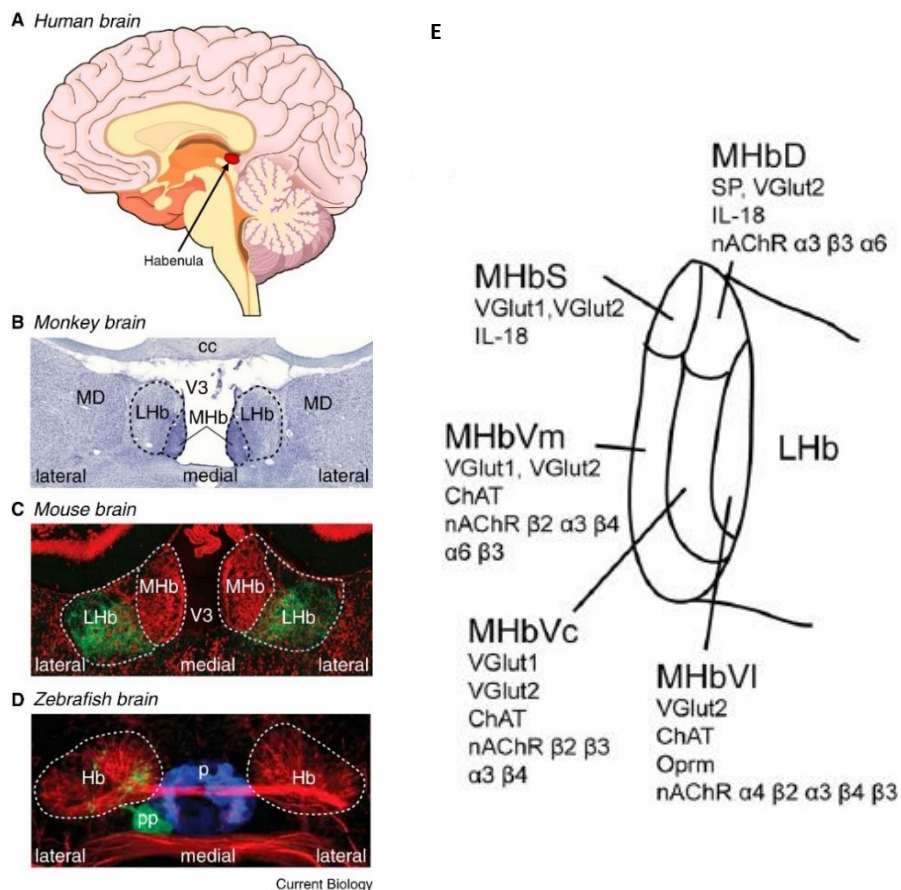
L'ATV riche en neurones dopaminergiques est donc non seulement impliquée dans les propriétés addictives de l'alcool, mais elle est également nécessaire à l'expression de ses effets récompensants et renforçants. D'autres effets de l'alcool, de type aversifs et négatifs associés à son sevrage, sont associés à l'activité d'autres structures incluant la voie habénulo-interpédonculaire reliant l'**habénula médiane (MHb)** au **noyau interpédonculaire (IPN)**. Cette voie de signalisation majeure, décrite ci-après, transmet des signaux de la partie limbique antérieure aux parties mésencéphalique et postérieure du cerveau (Bianco & Wilson, 2009; Fakhoury, 2018).

### III- Implication de la voie habénulo-interpédonculaire

#### 1. Anatomie de l'habénula « oubliée » : partie médiane (MHb)

##### a. Cytoarchitecture de la MHb

L'**habénula** est une région appartenant à l'épithalamus et est divisée en deux sous-régions latérale et médiane (**Figure 6**). Au cours de ces dernières années, la partie latérale de l'habénula (LHb) a été considérablement étudiée pour son rôle dans la régulation des états affectifs, et potentiellement dans la pathogénèse de troubles psychiatriques comme la dépression (Y. Yang et al., 2018). A l'inverse, sa partie médiane (MHb), anatomiquement et histologiquement distincte, demeure très peu connue. La **MHb** est elle-même sous-divisée en une région dorsale contenant des neurones excitateurs exprimant la **substance P** (MHbD) et en une région ventrale dense en neurones cholinergiques libérant **acétylcholine** (ACh) et **glutamate** (MHbV ; (Aizawa et al., 2012; Ren et al., 2011). Il est connu que la **MHbD** reçoit des afférences provenant du noyau lit de la commissure antérieure et innerve la portion externe du **noyau interpédonculaire (IPN)**. La **MHbV** reçoit des afférences du septum triangulaire et projette sur la portion centrale de l'IPN (Herkenham & Nauta, 1977). La MHb peut être subdivisée en d'avantage de sous-noyaux (**Figure 6E**), jusqu'à 5 sur la base de l'expression en neurotransmetteurs et autres marqueurs comme la mélatonine et l'interleukine-18 (Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2014), avec : le dorsal (**MHbD**), le supérieur (**MHbS**), le ventro-central (**MHbVc**), le ventro-médian (**MHbVm**) et le ventro-latéral (**MHbVI**). Néanmoins, leur identification étant relativement récente, les fonctions et connections respectives de chacun de ces sous-noyaux demeurent à ce jour mal connues.

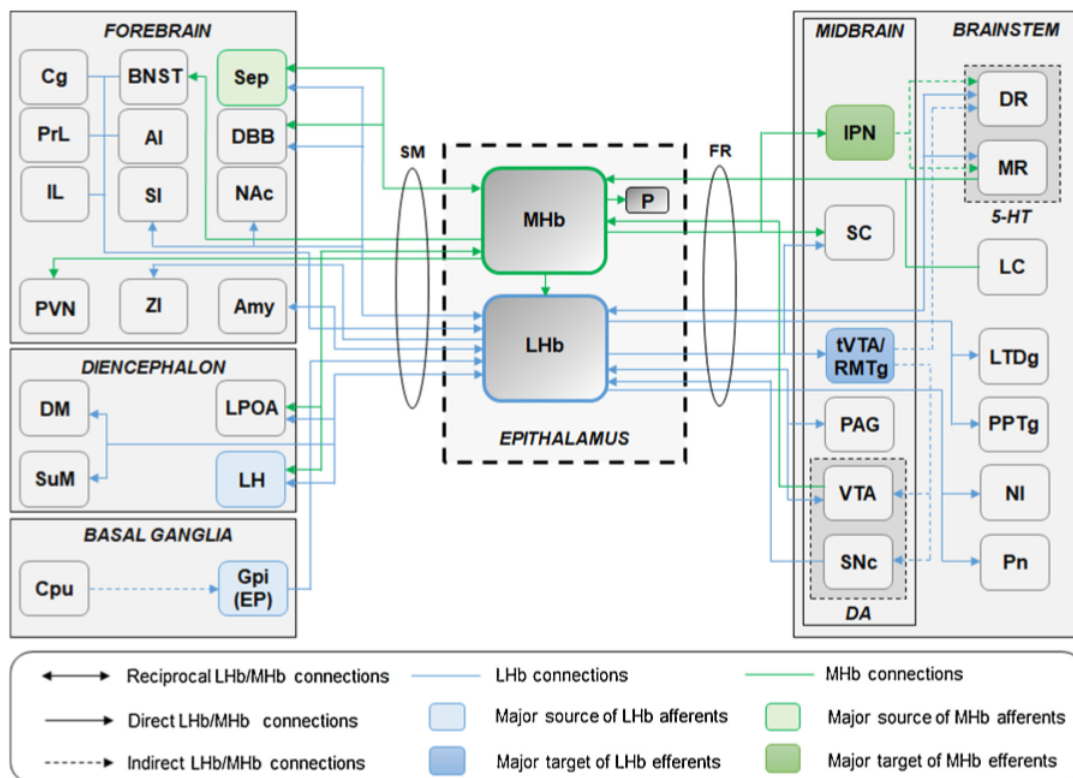


**Figure 6. Localisation de l'habénula et anatomie de l'habénula médiane (MHb).** (A) Vue sagittale d'un cerveau humain indiquant l'emplacement de l'habénula. (B) Vue coronale d'un cerveau de macaque rhésus : les sections colorées par Nissl montrent la division entre l'habénula latérale (LHb) et l'habénula médiale (MHb) sous le corps calleux (cc) et à côté du thalamus médio-dorsal (MD). V3, troisième ventricule. (C) Vue coronale d'un cerveau de souris C57BL6/J: section montrant la division entre la LHb et la MHb. (D) Vue coronale d'un cerveau de poisson zèbre : section montrant l'Hb en rouge. Figure 5A-D extraite de (Namboodiri et al., 2016). (E) Représentation schématique des 5 sous-noyaux de la MHb et des marqueurs exprimés. Figure extraite de (Antolin-Fontes et al., 2015). **Abréviations:** cc, corps calleux; ChAT, choline acétyltransférase; IL-18, interleukine 18; LHb, habénula latérale; MD, thalamus médio-dorsal; MHb, habénula médiane; nAChR, récepteur cholinergique nicotinique; Oprm, récepteur opioïdérique  $\mu$ ; p, glande pinéale; pp, glande parapinéale; MHbD, noyau dorsal de la MHb; MHbS, noyau supérieur de la MHb; MHbVc, noyau ventro-central de la MHb; MHbVI, noyau ventro-latéral de la MHb; MHbVm, noyau ventro-médian de la MHb; SP, substance P; V3, 3<sup>ème</sup> ventricule; VGlut1/2, transporteurs vésiculaires du glutamate 1/2.

### b. Afférences de la MHb

Comme schématisé en **Figure 7**, la MHb reçoit des afférences de nombreuses autres structures telles que le noyau raphé médian (Conrad et al., 1974; Lecourtier & Kelly, 2007; Sutherland, 1982), le noyau septofimbral, l'aire préoptique, le noyau basal de Meynert (Groenewegen et al., 1986; Herkenham & Nauta, 1977), le noyau de la bandelette diagonale,

le noyau septal médian (Qin & Luo, 2009), le locus coeruleus et le ganglion cervical supérieur (Gottesfeld, 1983). De manière intéressante, la MHb reçoit également des afférences du NAc (Sutherland, 1982) et de l'ATV (Herkenham & Nauta, 1977; Phillipson & Pycock, 1982).



**Figure 7. Connexions afférentes et efférentes de l'habénula.** Illustration des connexions majeures de la MHb (en vert) et de la LHb (en bleu), décrites chez les modèles précliniques mammifères par (Fakhoury, 2018). **Abréviations:** 5-HT, sérotonine; AI, insula antérieure; Amy, amygdale; BNST, noyau lit de la strie terminale; Cg, cortex cingulaire; Cpu, noyau caudé-putamen; DA, dopamine; DBB, Bande diagonale de Broca; DM, noyau hypothalamique dorsomédian; EP, noyau entopédunculaire; FR, fasciculus retroflexus; Gpi, segment interne du globus pallidus; IL, cortex infralimbique; IPN, noyau interpédonculaire; LC, locus coeruleus; LH, hypothalamus latéral; LHb, habénula latérale; LPOA, aire préoptique latérale; LTDg, noyau tegmental latéro-dorsal; MHb, habénula médiane; NAc, noyau accumbens; NI, noyau incertus; P, glande pinéale; PAG, substance grise périaqueducale; Pn, formation réticulée pontique; PPTg, noyau tegmental pédonculopontin; PrL, cortex prélimbique; PVN, noyau paraventriculaire; RMTg, noyau tegmental rostromédian; SC, colliculus supérieur; Sep, septum; SI, substance innommée de Reichert; SM, strie médullaire; SNc, substance noire pars compacta; SuM, aire supramammillaire de l'hypothalamus; tVTA, queue de l'ATV. ATV, aire tegmentale ventrale; ZI, zona incerta.

### a. Efférences de la MHb

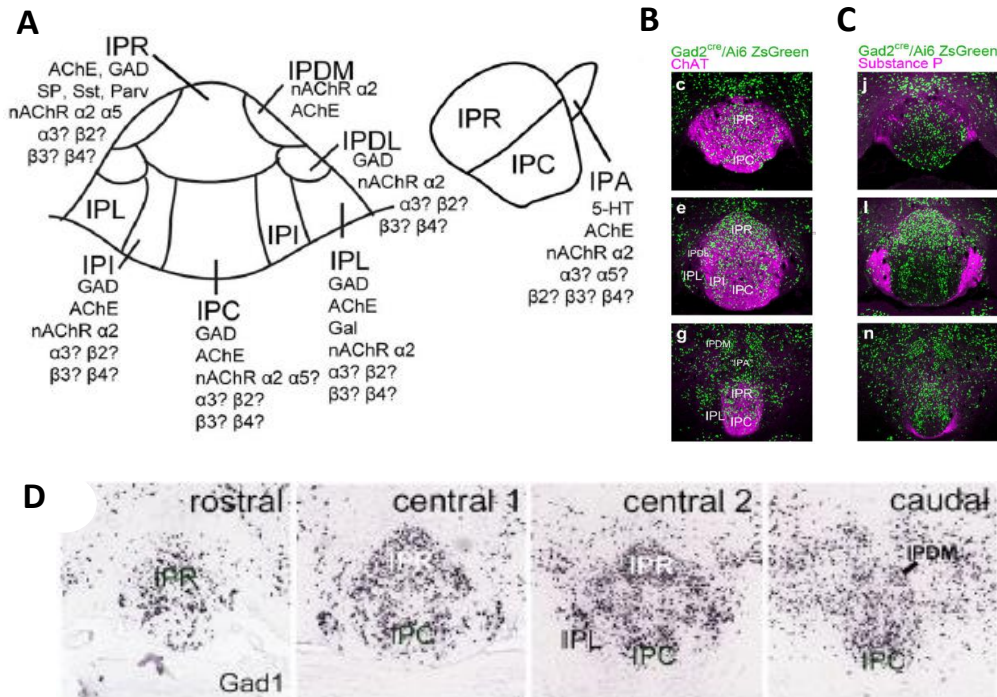
Certaines études suggèrent que la MHb projette sur le corps pinéal (Guglielmotti & Cristino, 2006; Rønnekleiv & Møller, 1979), envoi des efférences éparses sur l'ATV (Claudio Cuello et al., 1978) et des "boutons en passant" étendus sur la LHb (Kim & Chang, 2005). Cependant, la MHb envoie ses projections les plus denses, cholinergiques et



glutamatergiques, sur l'IPN mésencéphalique via le **fasiculus retroflexus (FR ; Herkenham & Nauta, 1979)**.

## 2. Anatomie du noyau interpédonculaire : IPN

### a. Cytoarchitecture de l'IPN



**Figure 8. Anatomie de l'IPN.** (A) Représentation schématique des 7 sous-noyaux de l'IPN et des marqueurs exprimés, d'après (Antolin-Fontes et al., 2015). (B-C) Sections coronales d'IPN de souris (de haut en bas, situées à -3.4, -3.7, et -3.9 mm du bregma) montrant la localisation des neurones GABAergiques (en vert) et des terminaisons cholinergiques (en rose, B) ou des terminaisons substance P (en rose, C) de la MHb. Marquages obtenus par immunofluorescence chez des souris transgéniques exprimant un marqueur de fluorescence dans les neurones GABAergiques. (D) Sections coronales d'IPN de souris (de gauche à droite, situées à -3.3, -3.5, -3.7 et -3.9 mm du bregma) montrant l'expression du GABA dans l'IPN (par hybridation in situ de GAD1). Figures 8B-D extraites de (Quina et al., 2017). **Abbréviations:** 5-HT, sérotonine; AChE, acetylcholinestérase; ChAT, choline acétyltransférase; GAD/Gad, glutamate décarboxylase; Gal, galanine; IPA, noyau apical de l'IPN; IPC, noyau central de l'IPN; IPDL, noyau dorso-latéral de l'IPN; IPDM, noyau dorso-médian de l'IPN; IPI, noyau intermédiaire de l'IPN; IPL, noyau latéral de l'IPN; IPN, noyau interpédonculaire; IPR, noyau rostral de l'IPN; nAChR, récepteur cholinergique nicotinique; parv, parvalbumine; SP, substance P; sst, somatostatine.

L'IPN, cible principale de la MHb, est également une structure complexe composée de 7 sous-noyaux schématisés en **Figure 8A** (Groenewegen et al., 1986; Hamill & Lenn, 1984; B. J. Morley, 1986) avec : l'apical (**IPA**), le rostral (**IPR**), le central (**IPC**), l'intermédiaire (**IPI**), le

latéral (**IPL**), le dorsolatéral (**IPDL**) et le dorsomédian (**IPDM**). L'IPN est majoritairement composé de neurones GABAergiques (Hsu et al., 2013; Quina et al., 2017; Ren et al., 2011).

#### b. Afférences de l'IPN

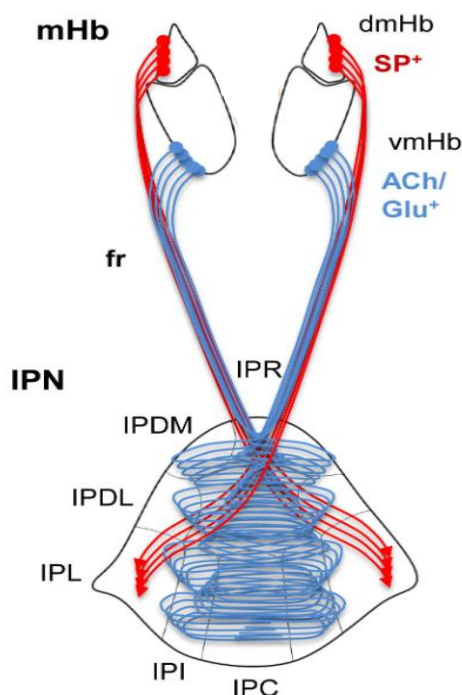
Comme schématisé en **Figure 10**, l'IPN reçoit des afférences en provenance du CPF médian (Takagishi & Chiba, 1991), des noyaux du raphé (Conrad et al., 1974), du noyau tegmental dorsal (DTg), du noyau incertus (Hamill & Jacobowitz, 1984), des noyaux hypothalamiques et supramammillaire (R. A. Contestabile & Flumerfelt, 1981; Hamill & Jacobowitz, 1984), du noyau préoptique (Shibata et al., 1986) et de la substance innominata (Vertes & Fass, 1988). D'après des études fonctionnelles plus récentes, la portion caudale de l'IPN recevrait également des projections dopaminergiques en provenance de l'ATV (DeGroot et al., 2020; Molas, Zhao-Shea, et al., 2017).

Mais la source majeure des innervations de l'IPN provient de la MHb (B. J. Morley, 1986). Comme brièvement mentionner précédemment, les projections de la MHb ciblent l'IPN selon une **organisation topographique** représentée en **Figure 9**, avec :

- MHbD — glutamate / substance P → IPL et IPR (A. Contestabile et al., 1987; Lima et al., 2017)
- MHbV — glutamate / ACh → IPC et IPI (A. Contestabile et al., 1987; Lima et al., 2017)
- MHbVm — glutamate / ACh → IPC, IPI (Shih et al., 2014)
- MHbVc — glutamate / ACh → IPR, IPC, IPI (Shih et al., 2014)
- MHbVI — glutamate → IPR, IPDM (Shih et al., 2014)

Outre l'organisation topographique, le circuit MHb-IPN est également caractérisé par le rôle excitateur du GABA. Les neurones cholinergiques habénulaires sont riches en récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. En raison de l'absence du transporteur KCC2 (K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>), les récepteurs GABA<sub>A</sub> ont un rôle excitateur (Koppensteiner et al., 2017). Les récepteurs présynaptiques GABA<sub>B</sub> dérivés de la MHbV sous-tendent également des effets excitateurs puisqu'ils favorisent la libération de glutamate dans l'IPN en amplifiant l'entrée présynaptique de Ca<sup>2+</sup> via les canaux Cav<sub>2.3</sub>, et ce sous l'activation du GABA libéré par les neurones GABAergiques de l'IPN (J. Zhang et al., 2016). Il s'agit ainsi d'une activation rétrograde des récepteurs GABA<sub>B</sub> qui accentue la libération de glutamate (Koppensteiner et al., 2017). Il est également connu que les neurones de la MHb projetant sur l'IPN ont spontanément une activité pacemaker tonique sous le contrôle des rythmes circadiens (Gorlich et al., 2013). La fréquence de décharge spontanée

des neurones est plus élevée le jour que la nuit (probablement en raison de l'expression d'un gène circadien ; Zhao H et Rusak B, 2005 ; Sakhi K et coll., 2014).

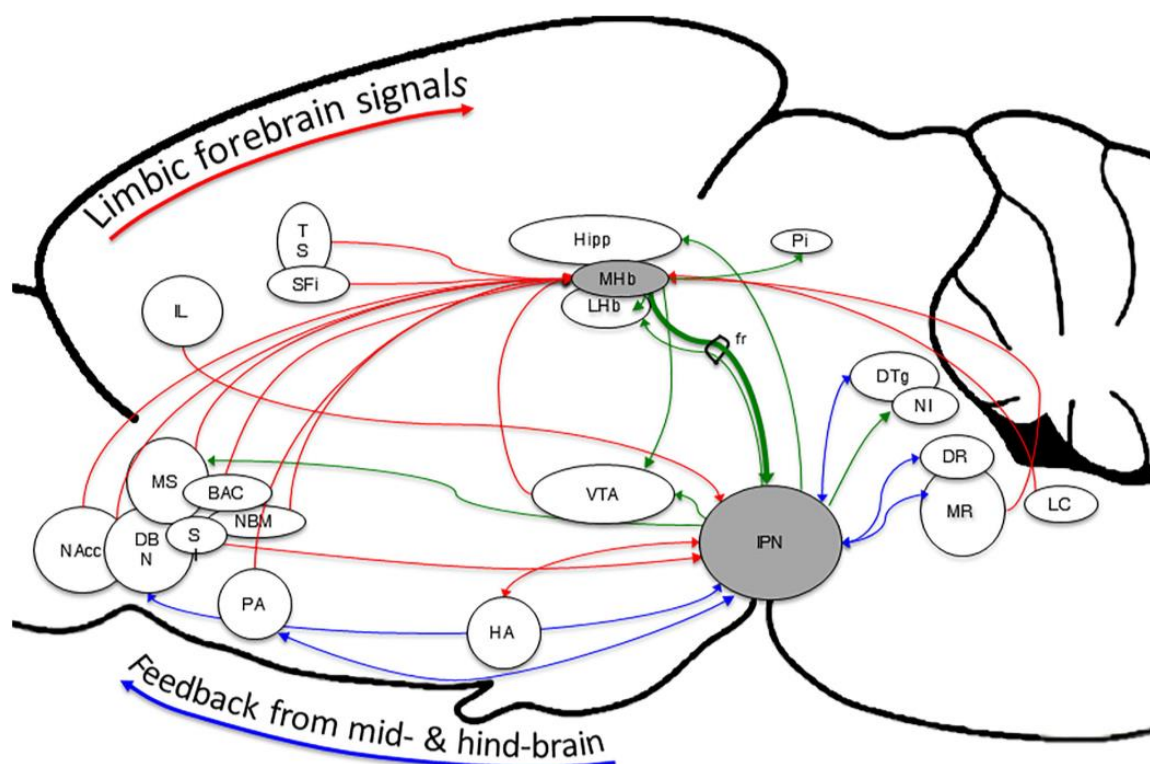


**Figure 9. Organisation topographique du circuit MHB-IPN.** Les faisceaux d'axones des neurones MHB s'assemblent pour former le fr (fasciculus retroflexus) et terminent de manière ipsilatérale dans l'IPN. Les efférences SP+ (substance P, en rouge) de la MHB dorsale (dmHb) innervent la partie la plus latérale de l'IPN, tandis que les efférences ACh/Glu+ (cholinergiques/glutamatergiques, en bleu) de la MHB ventrale (vmHb) innervent les régions centrales de l'IPN. Figure extraite de (Molas, DeGroot, et al., 2017). **Abréviations:** ACh, acétylcholine; dmHb, habénula médiane dorsale; fr, fasciculus retroflexus; Glu, glutamate; IPC, noyau interpédonculaire central; IPDL, noyau interpédonculaire dorsolatéral; IPDM, noyau interpédonculaire dorsomédian; IPI, noyau interpédonculaire intermédiaire; IPL, noyau interpédonculaire latéral; IPR, noyau interpédonculaire rostral; SP, substance P.

### c. Efférences de l'IPN

Comme illustré en **Figure 10**, l'IPN envoie des efférences sur une très large variété de structures cérébrales appartenant notamment au circuit cérébral de la récompense, telles que l'ATV (Hayakawa et al., 1981; B. J. Morley, 1986), l'HPC (Baisden, 1979; Sherafat et al., 2020; Shibata & Suzuki, 1984; Wyss et al., 1979), le septum (Hayakawa et al., 1981; B. J. Morley, 1986) et l'hypothalamus latéral (Kemali & Guglielmotti, 1982; Massopust & Thompson, 1962; B. J. Morley, 1986). Des données indiquent également l'existence de projections allant de l'IPN aux noyaux du raphé dorsal et médian (Behzadi et al., 1990; Groenewegen et al., 1986), au LDTg (Groenewegen et al., 1986; Hamill & Jacobowitz, 1984), à la LHb (Massopust &

Thompson, 1962; B. J. Morley, 1986), à l'aire préoptique et au noyau de la bandelette diagonale (Hayakawa et al., 1981; B. J. Morley, 1986).



**Figure 10. Connexions afférentes et efférentes de la voie Mhb-IPN.** Représentation schématique extraite de (McLaughlin et al., 2017) montrant la voie Mhb-IPN qui relie le cerveau antérieur limbique au mésencéphale et au cerveau postérieur. La Mhb reçoit des entrées afférentes d'une grande variété de structures limbiques du cerveau antérieur, et l'IPN envoie des projections efférentes à une variété de structures du mésencéphale et du cerveau postérieur impliquées dans la neurophysiologie sous-jacente de différents troubles psychiatriques liés à l'addiction et à l'humeur. Les lignes rouges indiquent les projections afférentes à la Mhb ou à l'IPN, et les lignes vertes représentent leurs efférences. **Abréviations:** BAC, noyau lit de la commissure antérieure; DR, noyau dorsal du raphé; DTg, noyau tegmental dorsal; fr, fasciculus retroflexus; HA, noyaux hypothalamiques; Hipp, hippocampe; IL, cortex préfrontal médian infralimbique; IPN, noyau interpédonculaire; LC, locus coeruleus; LHb, habénula latérale; Mhb, habénula médiane; MR, noyau médian du raphé; MS, septum médian; NAcc, noyau accumbens; NBM, noyau basal de Meynert; NI, nucleus incertus; PA, aire préoptique; Pi, corps pinéal; SFi, noyau septo-fimbrial; SI, substantia innominata; TS, septum triangulaire; VTA, aire tegmentale ventrale.

### 3. Rôles de la voie Mhb-IPN

#### a. Le contrôle comportemental et les fonctions exécutives

Chez la souris, l'ablation génétique des neurones de la Mhb induit un **phénotype impulsif, compulsif** et également **hyperactif** durant le début de la phase nocturne, avec des

**déficits de la mémoire spatiale**, une **mauvaise adaptation aux environnements nouveaux**, une **aversion à l'effort**, et une légère **augmentation du niveau d'anxiété** (Kobayashi et al., 2013). La voie MHb-IPN semble donc jouer un rôle crucial dans le contrôle inhibiteur et certaines fonctions exécutives.

#### b. Motivation et état hédonique

Des études chez la souris indiquent que la voie MHbD-IPN pourrait également être impliquée dans la régulation de la **motivation** et de l'**état hédonique** (Hsu et al., 2014). Des souris présentant des lésions au niveau de la MHbD montrent de mauvaises performances dans les comportements locomoteurs basés sur la motivation, tels que la course volontaire sur roue et l'accélération sur Rotarod, mais ne présentent que des anomalies mineures de la démarche et de l'équilibre, et aucun déficit locomoteur. Ces souris présentent également des **déficits de préférence pour le saccharose**, mais aucun déficit dans le test de nage forcée, deux mesures des phénotypes liés à la dépression chez les rongeurs. Aussi, l'activation optogénétique de la MHbD soutient l'autostimulation intra crâniale (montrant que l'activité de la MHbD est intrinsèquement renforçante), tandis que l'inhibition optogénétique des sorties de la MHbD est aversive (Hsu et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la voie MHbD-IPN fait partie d'un circuit intrinsèque de **renforcement**.

#### c. L'anxiété et la dépression

Des études suggèrent que la voie MHb-IPN joue un rôle critique dans la régulation de l'**anxiété** et de la **mémoire aversive** (Lee et al., 2019; Mathuru & Jesuthasan, 2013). Chez le poisson zèbre par exemple, la lésion de la MHb augmente la réponse de peur conditionnée en réponse à un choc électrique apparié avec une lumière rouge (Agetsuma et al., 2010). Chez la souris, l'ablation directe des neurones cholinergiques de la MHbV et l'inactivation génétique des récepteurs GABA<sub>B</sub> présents sur les neurones cholinergiques (dont l'activation accentue la libération de glutamate excitateur ; cf III.2.b) augmente l'expression de la **peur conditionnée** (J. Zhang et al., 2016). D'autres études ont confirmé que l'intensité du contrôle excitateur sur l'IPN est inversement corrélée au comportement d'expression de peur (Soria-Gómez et al., 2015; Yamaguchi et al., 2013). Koppensteiner et al., 2017 ont également constaté que le conditionnement de peur supprime la potentialisation activité-dépendante des synapses glutamatergiques de la MHb-IPN, tandis que l'extinction de peur restaure ce déficit de

plasticité ; suggérant l'implication de la plasticité synaptique MHb-IPN dans la régulation des comportements aversifs (Koppensteiner et al., 2017).

Dans les modèles animaux de **dépression** majeure, la MHb et l'IPN présentent une augmentation de leur activité métabolique (Shumake et al., 2003). Chez des rats exposés à un stress chronique modéré et imprévisible, la lésion de la MHb corrige les comportements de type anédoniques et réduit significativement l'hyperactivité métabolique de l'IPN (Xu et al., 2018). Yoo et al., 2021 ont récemment démontré que la régulation de la sécrétion des neuropeptides de la voie MHb-IPN (notamment sous-tendue par CAPS2, activateur de sécrétion calcium-dépendant) joue un rôle crucial dans le développement de comportements dépressifs. L'étude post-mortem de cerveaux de patients atteints de dépression majeure et de dépression bipolaire révèle une réduction significative du volume de la MHb chez les patients dépressifs, avec une réduction du nombre de neurones (Ranft et al., 2010).

#### d. ... et concernant l'alcool ?

La littérature suggère que l'activité du circuit MHb-IPN module le comportement de consommation d'alcool, ses effets, ainsi que les symptômes liés à son sevrage. Le neuropeptide Y a été identifié en 2002 comme régulateur de la prise d'alcool, avec des souris knock-out (mâles et femelles) dépourvues du récepteur Y1 consommant significativement plus d'alcool que leurs congénères non mutées (Thiele et al., 2002). Deux ans plus tard, l'étude de Hwang et coll., révèle que les rats avec une forte préférence pour l'alcool présentent une absence d'ARNm du neuropeptide Y dans la MHb, tandis que les rats « non préférants » ont un signal ARNm pour le neuropeptide Y (Hwang et al., 2004).

Plus récemment, Perez et coll., ont démontré en 2015 que le blocage de récepteurs cholinergiques nicotiques dans le circuit MHb-IPN est suffisant pour précipiter le **syndrome de sevrage alcoolique**. En effet, l'injection intrapéritonéale d'un antagoniste non spécifique du récepteur cholinergique nicotique, la mécamylamine, est capable de précipiter un syndrome de sevrage chez des souris exposées de façon chronique à l'alcool. Or ces symptômes de sevrage sont également présents lorsque la mécamylamine est injectée directement dans la MHb ou dans l'IPN, mais pas dans l'ATV ou l'HPC (Perez et al., 2015). De plus, le sevrage alcoolique chez des souris présentant des critères d'addiction entraîne une réorganisation particulière de l'architecture fonctionnelle du cerveau, récemment modélisée chez les mâles par Kimbrough et coll. (Kimbrough et al., 2020). Et d'après leurs résultats, l'IPN

est une des régions centrales de ce réseau spécifiquement réorganisé par le sevrage chez les sujets aux comportements addictifs ; ce qui soutient d'autant plus son implication dans les comportements associés à la consommation d'alcool et à son sevrage (Kimbrough et al., 2020).

## IV- Interaction entre ATV, MHb et IPN : la voie mésointerpédonculaire

### 1. Neuroanatomie du circuit ATV-MHb-IPN

L'ATV et la voie MHb-IPN sont ainsi toutes deux impliquées dans les propriétés récompensantes et aversives de l'alcool, mais les possibles interactions entre ces structures ont été peu étudiées. L'ATV reçoit des afférences en provenance de la MHb (Claudio Cuello et al., 1978) et de l'IPN (Hayakawa et al., 1981; B. J. Morley, 1986), et projette sur la MHb (Herkenham & Nauta, 1977; Phillipson & Pycocock, 1982). Néanmoins, le rôle de ces connexions n'a pas encore été caractérisé. Des études fonctionnelles récentes supportent en plus l'existence d'une voie mésointerpédonculaire basée sur des projections dopaminergiques de l'ATV innervant la partie caudale de l'IPN (DeGroot et al., 2020; Molas, Zhao-Shea, et al., 2017). Ces études, présentées ci-après, indiquent que le circuit MHb-IPN-ATV serait impliqué dans la signalisation de la familiarité et de l'expression de la préférence pour la nouveauté, ainsi que dans l'expression des comportements anxieux.

### 2. Signalisation de la nouveauté versus familiarité

Les travaux de Molas S et al. (2017) ont démontré, chez la souris, que l'activité des neurones GABAergiques de l'IPN est contrôlée par les neurones cholinergiques-glutamatergiques habénulaires et les neurones dopaminergiques de l'ATV, l'ensemble formant un **circuit de signalisation de la familiarité et de l'expression de la préférence pour la nouveauté** (Molas, Zhao-Shea, et al., 2017). Les résultats clefs de cette étude sont présentés ci-après en 4 points :

- **IPN et familiarité.** La capacité de détecter et de réagir à la nouveauté, qui s'oppose à la familiarité, implique la mémoire de reconnaissance et l'activation du système de la récompense : les neurones dopaminergiques mésencéphaliques de l'ATV sont fortement activés en présence de stimuli nouveaux et faiblement activés lorsque les stimuli deviennent familiers (Bunzeck & Düzel, 2006; Gunaydin et al., 2014; Krebs et al., 2011). Molas et coll. 2017 ont en plus démontré que l'activité neuronale globale de l'IPN

augmente progressivement après de multiples expositions à un même stimulus, c'est-à-dire à mesure que le stimulus devient familier, mais diminue lors d'interactions avec un stimulus nouveau. Par des interventions optogénétiques, ils démontrent en plus que l'activation des neurones GABAergiques de l'IPN inhibe l'exploration d'un stimulus pourtant nouveau (mimant la familiarité), tandis que leur inhibition augmente l'exploration des stimuli familiers sans affecter l'exploration d'un nouveau stimulus. Ainsi, lorsqu'un choix est possible entre stimuli nouveaux ou familiers (que ce soit des congénères, des objets ou des contextes), l'IPN est activé en réponse au stimulus familier, transmet un signal de familiarité et agit comme un frein nécessaire et suffisant pour réduire son exploration et contrôler la préférence pour la nouveauté. L'IPN contrôle la valence de la motivation envers la familiarité, ce qui est différent de la discrimination des stimuli nouveaux versus familiers probablement médiée par les aires corticales et hippocampiques (Ho et al., 2015; Okuyama et al., 2016).

- **Voie MHb/IPN et familiarité.** Les auteurs démontrent en plus que la MHb agit en amont de l'IPN pour sous-tendre les réponses basées sur la familiarité : la stimulation ou l'inhibition dans l'IPN des terminaisons axonales excitatrices cholinergiques-glutamatergiques de la MHb contrôle bidirectionnellement la préférence pour la nouveauté de façon similaire à l'activation ou l'inhibition directe des neurones GABAergiques de l'IPN. Ainsi, le circuit MHb→IPN pourrait contribuer au réseau cholinergique impliqué dans l'évaluation des informations nouvelles versus familières (Bunzeck et al., 2014; Eckart et al., 2016; Ranganath & Rainer, 2003).
- **ATV→IPN et nouveauté.** Pour aller plus loin, l'étude de Molas et coll., fournit une preuve fonctionnelle que les neurones dopaminergiques de l'ATV, spécifiquement, innervent l'IPN et modulent l'activité neuronale de l'IPN pour contrôler les interactions nouvelles versus familières, et ce via l'activation des neurones de l'IPN exprimant les récepteurs D1. Alors que la familiarité augmente l'activité générale de l'IPN, une sous-population restreinte de neurones de l'IPN dopaminoceptifs est activée par des stimuli nouveaux, et l'activation sélective des entrées dopaminergiques ATV→IPN augmente spécifiquement l'exploration d'un stimulus social familier (mimant la nouveauté). Cet effet est bloqué par l'infusion intra-IPN d'un antagoniste du récepteur D1.
- **Circuit MHb-IPN-ATV et préférence pour la nouveauté.** Ces données suggèrent que l'IPN contrôle la préférence pour la nouveauté via deux entrées distinctes : (1) le signal de familiarité provient de la MHb qui active les neurones GABAergiques de l'IPN pour réduire la saillance motivationnelle une fois que les stimuli nouveaux deviennent familiers,



réduisant ainsi leur exploration; (2) le signal de nouveauté provient des neurones dopaminergiques de l'ATV qui activent une population de neurones dopaminoceptifs dans l'IPN, pour réduire l'activité des neurones de l'IPN codant la familiarité, augmentant ainsi la saillance et l'exploration envers les stimuli nouveaux.

### 3. Les comportements anxieux

A l'appui de l'existence de projections dopaminergiques ATV→IPN, DeGroot et coll., 2020 démontrent l'existence d'une **libération endogène de DA dans l'IPN** (DeGroot et al., 2020). Ils démontrent également que l'inhibition de cette libération intra-IPN de DA, via l'inhibition optogénétique des entrées dopaminergiques ATV→IPN, réduit l'exploration des bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM pour « elevated plus maze ») et l'exploration du centre dans le test de l'espace ouvert (OF pour « open-field»), ce qui est indicateur d'une augmentation du niveau d'anxiété. A l'inverse, l'activation de ces entrées augmente le temps d'exploration des bras ouverts de l'EPM et celui du centre dans l'OF. **Le signal dopaminergique intra-IPN contribue donc potentiellement au contrôle du niveau d'anxiété via l'anxiolyse.** Néanmoins, les tests de l'EPM et de l'OF sont basés sur deux motivations opposées : l'évitement et la recherche de nouveauté. Les souris sont donc amenées à la fois à explorer les bras ouverts de l'EPM ou du centre de l'OF, parce que ce sont des zones nouvelles, mais aussi à éviter ces zones car elles sont élevées ou ouvertes et sans protection contre la prédation. Or comme présenté dans le paragraphe précédent, l'IPN est impliqué dans la signalisation de la familiarité, réduisant la motivation à explorer la **nouveauté**. Et de façon intéressantes, des études ont également impliquées la voie MHb-IPN dans des comportements d'**évitement et d'aversion**, notamment à la nicotine (Fowler & Kenny, 2014; Wolfman et al., 2018). Donc le signal transmit par les projections dopaminergiques ATV→IPN peut soit réduire le comportement d'évitement permettant une diminution de l'expression de comportements anxieux, soit augmenter la motivation à explorer la nouveauté. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer comment l'IPN intègre les signaux associés à l'anxiété et à la nouveauté pour contrôler le comportement exploratoire. D'après leurs données anatomiques de traçage rétrograde, DeGroot et coll., 2020 révèlent plus spécifiquement qu'une sous-population de **neurones dopaminergiques du PN** de l'ATV projette sur la **portion caudale de l'IPN**. Et l'activation des entrées dopaminergiques de l'IPN caudal diminue les comportements anxieux en stimulant

une sous-population de **neurones dopaminoceptifs exprimant le récepteur D1** (d'après des expériences basées sur l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs D1).

---

Alors que la voie ATV-NAc riche en neurones dopaminergiques sous-tend la motivation accrue pour la nouveauté, les propriétés renforçantes et l'état affectif positif induit par l'alcool, la voie MHb-IPN sous-tend plutôt la réduction de motivation pour la familiarité, ainsi que l'aversion à l'alcool et l'état affectif négatif induit par le sevrage alcoolique. Ces deux circuits interagissent afin d'adapter le comportement en fonction de la situation. Néanmoins tous les individus expérimentant les effets récompensants de l'alcool ne vont pas systématiquement développer un TUAL ; d'après les données épidémiologiques présentées ci-haut, seule une portion des individus exposés à l'alcool, estimée à environ un consommateur sur dix, développe un TUAL. Aussi, l'expérimentation d'un syndrome de sevrage n'explique pas l'initiation et le maintien de la consommation chronique d'alcool qui en est à l'origine, ni la rechute alcoolique pouvant survenir après plusieurs années d'abstinence. Les mécanismes sous-tendant l'émergence, le développement et le maintien des TUALs restent encore mal compris et font l'objet de recherches extensives.

La partie II de cette thèse fait état des **théories** actuellement proposées pour expliquer les mécanismes neurobiologiques des TUALs, des outils/modèles déployés en vue de les **étudier** et des outils/thérapies actuellement disponibles en vue de les **soigner**.

## Partie II : Diagnostiquer, soigner et élaborer de nouveaux traitements contre les TUALs

### I- Les troubles de l'usage d'alcool : une pathologie complexe

#### 1. Le trouble de l'usage d'alcool

##### a. De l'usage récréatif à l'addiction, les théories

Le trouble de l'usage d'alcool est une condition **progressive**, qui implique au moins 6 phases : l'**initiation** (usage expérimental), l'**acquisition** (usage récréatif), l'**escalade** (usage abusif), la **dépendance** et l'**addiction** (maintien de l'usage abusif), le **sevrage** (abstinence), et la **rechute** (rétablissement de l'usage abusif). La phase d'acquisition implique l'engagement avec l'alcool, lorsque la personne ou l'animal éprouve les aspects récompensants associés à son ingestion et à la stimulation de la voie mésocorticolimbique précédemment décrite. Certaines personnes ne progressent jamais au-delà de ce point, en continuant de consommer occasionnellement de l'alcool ou en cessant complètement d'en consommer. Concernant la transition vers/entre les phases suivantes, il existe au moins 5 grandes théories établies à partir de données cliniques et précliniques :

(1) La théorie du « **renforcement positif-renforcement négatif** » (G. F. Koob & Bloom, 1988) propose que le maintien de la consommation est d'abord associé au plaisir procuré par l'alcool (renforcement positif impliquant la voie ATV-NAc) ; avec une consommation chronique, ce renforcement s'émousse progressivement et la consommation est par la suite maintenue en vue de soulager les effets désagréables ressentis lors du sevrage (renforcement négatif impliquant notamment la voie MHb-IPN).

(2) La théorie de la « **sensibilisation motivationnelle** » (Robinson & Berridge, 1993) propose que l'addiction n'est pas due à un effet récompensant croissant de l'alcool mais plutôt à une motivation croissante d'en consommer (notamment liée à la tolérance inverse ou sensibilisation ; cf Partie I, I.1.c). Cette théorie permet d'expliquer pourquoi la consommation devient incontrôlable et compulsive.

(3) La théorie des « **processus opposants** » (Solomon & Corbit, 1974) ou de « **l'allostasie hédonique** » (G. Koob, 2001a, 2001b) explique que la stimulation chronique des neurones

dopaminergiques de l'ATV associée à l'effet récompensant (mais aussi d'autres systèmes de neurotransmission) entraîne des processus de neuro-adaptations qui viennent contrer cette stimulation (Hirth et al., 2016). Ainsi, le système finit par être régulé à la baisse jusqu'à atteindre un nouvel état d'équilibre plus bas générant un état émotionnel négatif (une dysphorie, anxiété, irritabilité). Certains processus opposants sont notamment démasqués par l'hyperexcitabilité du sevrage alcoolique avec possiblement des crises convulsives et un delirium tremens.

(4) La théorie des « **apprentissages aberrants ou de l'automatisme** » (Dickinson et al., 2002; Everitt & Robbins, 2005, 2016) propose que l'usage d'alcool devient un automatisme, non motivé par un but, et qu'un apprentissage associatif augmente la valeur incitatrice de l'alcool et des stimuli associés (cf Partie I, II.3.a). Initialement motivé par un objectif social (« faire comme les autres ») ou de recherche des effets aigus de l'alcool (désinhibition, euphorie), le comportement de consommation devient par la suite inflexible. Cette théorie suggère l'intervention préalable du striatum ventral avec le NAc puis celle du striatum dorsal (Corbit et al., 2012). Plusieurs critères diagnostiques des TUALs sont cohérents avec ce concept d'habitude, comme la persistance de l'usage d'alcool même lorsqu'il n'est plus récompensant et en dépit des conséquences négatives, la forte réactivité aux stimuli associés à l'alcool, et la perte de contrôle volontaire.

(5) Enfin le « **déficit de contrôle inhibiteur** » (Baler & Volkow, 2006; Everitt & Robbins, 2016; Lüscher et al., 2020) explique comment les sujets perdent le contrôle sur la consommation avec l'hypoactivité des régions corticales frontales impliquées dans les fonctions exécutives, la planification et l'évaluation des conséquences d'une action.

Ces théories se recoupent, sont complémentaires, et sont perpétuellement **réévaluées** (Baker et al., 2004; Redish et al., 2008). A titre d'exemple, bien que les habitudes et automatismes soient omniprésents dans toutes les formes d'addictions et que la littérature sur les rongeurs converge pour montrer que l'exposition à la drogue favorise bien habitudes et automatismes, leur contribution dans la transition vers l'addiction reste un sujet de débat. La relation entre abus de drogue et habitudes demeure controversée chez l'humain, avec des résultats mitigés et des divergences significatives (Hogarth, 2020; Hogarth & Hardy, 2018). Vandaele et Ahmed (2021), proposent de nouvelles perspectives sur le rôle des habitudes et des choix dans l'addiction (Vandaele & Ahmed, 2021). Enfin, il faut mentionner qu'une hyperactivité striatale et un déficit hippocampique ont été décrits chez l'animal comme chez l'homme suite à une

consommation chronique de drogues (Baudonnat et al., 2011, 2017; Bohbot et al., 2013). Ces observations suggèrent que l'usage de drogues ne favorise pas seulement la formation des associations entre indices et effets, mais perturbe durablement les interactions normales entre les systèmes d'apprentissage en facilitant de façon inflexible les stratégies associatives au détriment des stratégies spatiales (Tochon et al., soumis à eLife en octobre 2021).

#### b. Les critères d'addiction

A mesure que les théories et les connaissances autour des addictions évoluent, les termes, définitions et critères diagnostiques sont également réévalués. Depuis 1952, le **Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM)** fournit des critères diagnostiques pour un large éventail de conditions dont les TUALs, et permet l'élaboration d'un langage commun à l'ensemble de la communauté clinique et de recherche. Il s'agit d'un outil de travail périodiquement révisé qui vise à **aider les cliniciens à comprendre et à diagnostiquer les TUALs**, et qui sert de **référence pour les recherches épidémiologiques et expérimentales**. L'utilisation de termes précis et d'un langage commun sont primordiaux pour le développement de la **recherche translationnelle** autour des TUALs (L. A. Ray et al., 2018). En 2013 a été publiée la 5<sup>ème</sup> édition du DSM (**DSM-5**). Cette classification signe la disparition du diagnostic catégoriel par niveaux des TUALs, au profit d'une **classification dimensionnelle** permettant une évaluation plus fine et plus personnalisée du sujet. Le DSM-IV décrivait deux troubles distincts, l'abus d'alcool et la dépendance à l'alcool, avec des critères spécifiques pour chacun ; le DSM-5 intègre ces deux troubles en un seul trouble appelé trouble de l'usage d'alcool (TUAL) avec des sous-classifications. Ce diagnostic est désormais évalué par **11 aspects cliniques**, qui, pour la majorité d'entre eux, reprennent les anciens critères DSM-IV d'abus et de dépendance (**Figure 11**). Mais à présent, ces axes cliniques sont considérés indépendamment les uns des autres, comme des spécificités cliniques du TUAL permettant d'en donner une approche descriptive plus précise et plus personnalisée (Hasin et al., 2013). Une mesure de la sévérité du TUAL peut s'obtenir par la simple addition du nombre de dimensions présentes, soit TUAL « **léger** » (2 ou 3 dimensions), « **modéré** » (4 ou 5 dimensions), ou « **sévère** » (plus de 5 dimensions). De plus, le DSM-5 intègre au diagnostic de TUAL le critère de « **craving** » désignant une envie irrésistible de consommer une substance ou d'exécuter un comportement gratifiant alors qu'on ne le veut pas à ce moment-là (Auriacombe, 2016).

	<b>Critères</b>	<b>Descriptions</b>
1	<b>Incapacité à respecter les limites de prise (dose et temps)</b>	L'alcool est souvent consommé en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu
2	<b>Difficultés d'arrêt ou de diminution</b>	Il y a un désir persistant, ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler la consommation d'alcool
3	<b>Aspect envahissant de la consommation</b>	Beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir l'alcool, à utiliser de l'alcool ou à récupérer de ses effets
4	<b>Craving</b>	Envie impérieuse, fort désir ou besoin pressant de consommer de l'alcool
5	<b>Consommation régulière entraînant une incapacité à assumer ces obligations professionnelles</b>	Consommation répétée d'alcool conduisant à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison
6	<b>Incapacité à arrêter ou réduire en dépit des conséquences sociales</b>	Consommation continue d'alcool malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de l'alcool
7	<b>Impact social des consommations</b>	Des activités sociales, professionnelles ou de loisirs importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'usage de l'alcool
8	<b>Consommation régulière entraînant des comportements de mise en danger</b>	Consommation répétée d'alcool dans des situations où cela peut être physiquement dangereux
9	<b>Incapacité à arrêter ou réduire en dépit des conséquences médicales</b>	L'usage d'alcool est poursuivi bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par l'alcool
10	<b>Tolérance</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Besoin de quantités notablement plus fortes d'alcool pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré</li> <li>- Effet notablement diminué en cas de l'usage continu de la même quantité d'alcool</li> </ul>
11	<b>Sevrage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Syndrome de sevrage caractéristique de l'alcool</li> <li>- L'alcool (ou une substance très proche, telle qu'une benzodiazépine) est pris pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage</li> </ul>

**Figure 11.** Critères diagnostic du TUAL d'après le DSM-5. Le TUAL est caractérisé par la présence d'au moins deux des 11 aspects cliniques ci-dessus, au cours d'une période de 12 mois.

Cette nouvelle classification devrait favoriser un **repérage plus précoce** des consommations problématiques et favoriser des **prises en charges un peu plus personnalisées**. Mais une telle ambition nécessite aussi le développement de traitements et de protocoles de prise en charge spécifiques à chaque dimension de TUAL, et à chaque niveau de sévérité.

D'autres outils sont à disposition pour repérer les TUALs, comme le questionnaire **AUDIT** (« **Alcohol Use Disorder Identification Test** ») mis au point par l'OMS. Il s'agit d'un questionnaire à 10 items dont chacun est coté de 0 à 4. Les principaux items reprennent une partie des critères DSM-5. Un dépistage systématique ou un suivi peuvent être mis en place en routine à l'aide de l'AUDIT ou de sa version simplifiée à 3 items (AUDIT-C). Plus rapide, l'AUDIT est toutefois moins précis que les critères dimensionnels et pronostics détaillés dans le DSM-5.

## 2. Prise en charge de la dépendance et traitements contre les TUALs

### a. Gestion du syndrome de sevrage alcoolique

Une fois le diagnostic de TUAL établi, sa prise en charge est généralement basée sur une stratégie d'initiation et de maintien de l'abstinence. La gestion du syndrome de sevrage associé à l'arrêt de la consommation d'alcool est la première étape. La prise en charge médicale du syndrome de sevrage alcoolique peut avoir lieu en ambulatoire ou, lorsque cela est cliniquement indiqué, en milieu hospitalier. Dans certains cas, une surveillance clinique peut suffire, généralement accompagnée de soins de soutien pour l'**hydratation** et la supplémentation en **électrolytes** et en **thiamines**. Pour les patients ayant besoin d'un traitement pharmacologique, les **benzodiazépines** (par exemple, le **diazépam**, le **chlordiazépoxyde**, le **lorazépam**, l'**oxazépam** et le **midazolam**) sont les médicaments les plus couramment utilisés pour traiter le syndrome de sevrage alcoolique. Les benzodiazépines agissent en renforçant l'effet du neurotransmetteur GABA sur le récepteur GABA<sub>A</sub>. Les benzodiazépines représentent le traitement de référence, car elles constituent la seule classe de médicaments qui non seulement réduit la gravité du syndrome de sevrage alcoolique, mais réduit également le risque de crises de sevrage et/ou de delirium tremens. En raison du risque d'abus de benzodiazépines et du risque de surdosage, si le traitement des benzodiazépines pour le syndrome de sevrage alcoolique est géré en ambulatoire, une surveillance attentive est nécessaire, en particulier lorsqu'elle est associée à de l'alcool et/ou à des médicaments à base d'opioïdes (Votaw et al., 2019).

## b. Thérapies pharmacologiques approuvées

Le maintien de l'abstinence est ensuite généralement soutenu par des thérapies pharmacologiques, dont au niveau mondial, cinq molécules sont approuvées à cet effet. Le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques est un processus long et coûteux. Avant d'être approuvé pour une utilisation dans la pratique clinique, un nouveau composé prêt à être testé sur l'humain est évalué via 4 phases impliquant un nombre croissant de volontaires. La phase 1 évalue d'abord son innocuité ; la phase 2 évalue son efficacité (avec recherche de la dose optimale) et ses effets secondaires ; et la phase 3, généralement menées dans plusieurs centres, est axée sur l'efficacité du composé (par rapport à des traitements existants ou un placebo) ainsi que son innocuité. S'il est approuvé, le médicament est toujours surveillé, via une surveillance post-commercialisation (phase 4 de pharmacovigilance). Actuellement, seuls trois médicaments sont approuvés par la **FDA** (« Food and Drug Administration ») aux États-Unis, pour une utilisation contre les TUALs :

(1) Le **disulfirame** est un **inhibiteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase**. La voie la plus courante dans le métabolisme de l'alcool est l'oxydation de l'alcool via l'ADH qui métabolise l'alcool en acétaldéhyde, et l'ALDH, qui convertit l'acétaldéhyde en acétate. Le disulfirame entraîne une inhibition irréversible de l'ALDH et une accumulation d'acétaldéhyde, une substance hautement toxique à l'origine de nombreux symptômes désagréables connexes, comprenant tachycardies, maux de tête, nausées et vomissements. De cette façon, l'administration de disulfirame associée à de l'alcool provoque une réaction aversive. Bien que des mécanismes supplémentaires (par exemple, l'inhibition de la dopamine  $\beta$ -hydroxylase) puissent également jouer un rôle, le blocage de l'activité de l'ALDH représente le principal mécanisme d'action du disulfirame.

(2) L'**acamprosate**, en agissant comme **agoniste des récepteurs GABA**, faciliterait la récupération de la transmission GABAergique (régulée à la baisse lors du sevrage) et modulerait également l'hyperactivité glutamatergique (induite par le sevrage) via son **action inhibitrice sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate** (cf Partie I.I.2.c ; Rösner et al., 2010; Witkiewitz et al., 2012). Mais les mécanismes exacts de l'action de l'acamprosate ne sont pas encore entièrement compris. De nombreuses données indiquent que l'acamprosate serait plus efficace pour promouvoir l'abstinence et prévenir les rechutes chez les patients déjà désintoxiqués que pour aider les individus à réduire leur consommation d'alcool; donc plutôt comme une aide pharmacologique dans le traitement des patients abstinents (Maisel et al.,



2013). L'effet secondaire le plus courant avec l'acamprosate est la diarrhée, et d'autres moins fréquents pourraient inclure nausées, vomissements, maux d'estomac, maux de tête et étourdissements.

(3) La **naltrexone** est un **antagoniste des récepteurs opiacés  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$**  (avec une forte affinité pour les  $\mu$ ). Elle réduit l'envie d'alcool et elle semble plus efficace pour réduire la consommation excessive d'alcool que pour soutenir l'abstinence (Kranzler et al., 2004; Maisel et al., 2013; Pettinati et al., 2011). Les effets secondaires courants de la naltrexone peuvent inclure nausées, maux de tête, étourdissements, problèmes de sommeil et un éventuel risque d'hépatotoxicité (ne doit par conséquent pas être utilisé chez les patients atteints d'hépatite aiguë ou d'insuffisance hépatique).

En Europe, le disulfurame, l'acomprosate et la naltrexone, ainsi que deux autres médicaments sont approuvés par la **EMA** (« European Medicines Agency ») :

(4) Le **nalméfène**, pharmacologiquement similaire à la naltrexone mais avec une demi-vie plus longue, est un **antagoniste des récepteurs opiacés  $\mu$  et  $\delta$**  et un **agoniste partielle des récepteurs opiacés  $\kappa$**  (Mann et al., 2016). Des méta-analyses indiquent que le nalméfène est efficace pour réduire le nombre de jours de consommation excessive d'alcool et la consommation totale d'alcool (Mann et al., 2016; Palpacuer et al., 2018; Soyka et al., 2016). Il est plutôt choisi en cas de souhait de retour à une consommation contrôlée (et non d'abstinence). Ses effets secondaires sont similaires à ceux de la naltrexone. Une méta-analyse indirecte de ces deux médicaments conclue que le nalméfène est potentiellement plus efficace que la naltrexone (Soyka et al., 2016; Swift, 2013).

(5) Enfin le **baclofène**, un **agoniste des récepteurs GABA<sub>B</sub>** (à l'origine utilisé pour traiter les spasmes musculaires) a été approuvé pour le traitement des TUALs en France en 2018. Il est utilisé pour réduire la consommation d'alcool, en complément d'un suivi psychosocial, après échec des autres traitements. Le baclofène perturberait les effets d'une dose initiale d'amorçage d'alcool sur le *craving* et la consommation excessive d'alcool subséquente (Farokhnia et al., 2021). Les méta-analyses et les revues systématiques examinant l'efficacité du baclofène ont donné des résultats mitigés (Leggio et al., 2010; Minozzi et al., 2018; Palpacuer et al., 2018) et le choix de la dose reste un sujet controversé; cependant, des données suggèrent que le baclofène pourrait être utile dans le traitement des TUALs chez les personnes atteintes de pathologies hépatiques (Addolorato et al., 2007; K. C. Morley et al.,

2018). L'hétérogénéité substantielle dans la pharmacocinétique du baclofène chez différentes personnes atteintes de TUAL pourrait expliquer la variabilité de son efficacité d'une étude à l'autre.

#### c. Thérapies pharmacologiques non approuvées

Au moins quatre autres médicaments testés chez l'humain mais non autorisés pour le traitement des TUALs semblent prometteurs. En premier lieu, le **topiramate** (un anticonvulsivant) permettrait d'initier l'abstinence (ou d'en réduire les dommages) chez des patients encore consommateurs, plutôt que de simplement prévenir les rechutes chez des patients déjà désintoxiqués (Johnson, 2007; Kenna et al., 2009). Mais ses effets secondaires d'ordres cognitifs et mnésiques sont préoccupants. Aussi, l'efficacité du topiramate dans le traitement des TUALs, sa tolérance et son innocuité semblent modérés par un polymorphisme mononucléotidique fonctionnel (rs2832407) du gène codant pour une sous-unité du récepteur GluK1 (Kranzler et al., 2014). D'autres études basées sur une approche pharmacogénétique suggèrent que l'**ondansétron**, un antagoniste 5-HT3 utilisé comme anti nauséux, pourrait être efficace pour traiter les TUALs chez les patients porteurs de variants des gènes codant pour le transporteur 5-HTT et le récepteur 5-HT3 (Johnson, 2007; Kenna et al., 2009). Un autre anticonvulsivant, la **gabapentine** a montré des résultats prometteurs dans plusieurs études chez l'humain (Anton et al., 2009; Mason et al., 2009), bien qu'un essai plus récent avec une formulation à libération prolongée du médicament n'ait pas trouvé d'effet supérieur de la gabapentine par rapport à celui d'un placebo (Falk et al., 2018). Enfin, la **varénicline** un agoniste partiel du récepteur cholinergique nicotinique utilisé dans le sevrage tabagique, pourrait être efficace pour traiter les TUALs (Bejczy et al., 2015; Litten et al., 2017) chez les buveurs sévères masculins (O'Malley et al., 2018) et chez les patients masculins et féminins présentant des troubles comorbides de l'usage d'alcool et de nicotine (Falk et al., 2015).

#### d. Thérapies comportementales et psychologiques

En parallèle, un large éventail de traitements comportementaux et psychologiques sont disponibles pour soutenir les objectifs d'abstinence ou réduire la consommation d'alcool (Imel et al., 2008; Witkiewitz, 2011; Witkiewitz et al., 2019), dont :

(1) Les **interventions brèves**, principalement basées sur des **entretiens motivationnels**, qui peuvent inclure l'auto-surveillance de la consommation d'alcool et la sensibilisation aux

situations à risque, avec une formation à des techniques cognitives et comportementales pour y faire face. Elles peuvent également inclure la formation à des compétences de vie plus large autour de la communication et de la capacité d'adaptation.

(2) Les **approches de conditionnements opérants** qui sont basées sur la gestion des contingences avec renforcement positif encourageant l'abstinence et renforcement communautaire.

(3) Les thérapies **cognitivo-comportementales** qui consistent à former le patient, et parfois aussi son entourage, à des techniques d'adaptation et de prévention des rechutes. Les traitements de réduction des méfaits incluant la formation guidée sur la maîtrise de soi et la consommation contrôlée, ont réussi à soutenir des objectifs de réduction de la consommation d'alcool.

(4) Les interventions fondées sur l'**acceptation et la pleine conscience** sont de plus en plus utilisées pour cibler les TUALs et montrent des preuves d'efficacité dans divers contextes et formats (même brefs ; Wilson et al., 2017). Généralement dispensées en groupe, ces interventions consistent à sensibiliser au moment présent, à développer une approche sans jugement de soi et des autres, et à accepter les expériences du moment présent.

Les thérapies comportementales et psychologiques améliorent, voir apparaissent aussi efficaces que les options pharmacologiques actuelles (Anton et al., 2006; Hennessy et al., 2019; Magill & Ray, 2009). Et de façon importante, il a été démontré que la participation et l'engagement à des **groupes de soutien mutuel** sont significativement associés à une plus grande efficacité du traitement des TUALs (Kelly et al., 2017; Magill et al., 2015).

Des **interventions sur le web ou mobiles** intégrant les principes de ces différentes thérapies, ont démontré leur efficacité dans les essais initiaux (Gustafson et al., 2014; Kazemi et al., 2017; Kiluk et al., 2016). Le NIAAA a par exemple mis au point l'intervention informatisée « Take Control », comprenant certains aspects de l'entrevue motivationnelle et de la formation aux capacités d'adaptation, tout en fournissant un soutien psychosocial (Devine et al., 2016). Le développement de nouvelles technologies mobiles pourraient fournir une thérapie et un soutien en temps quasi réel (Bouvard et al., 2018). Par exemple, un appareil mobile pourrait potentiellement signaler une situation à haut risque et aider à la prévenir, d'après l'emplacement géographique (près d'un débit de boissons préféré) et la fréquence cardiaque (augmentation de la fréquence cardiaque à l'approche de l'établissement). De plus, les

progrès dans la technologie de détection de l'alcool (exemple : capteurs transdermiques d'alcool) pourraient fournir une rétroaction en temps réel sur les niveaux de consommation chez les personnes qui tentent de réduire.

#### e. Thérapies potentielles basées sur la neuromodulation

Les techniques de neuromodulation pourraient aussi constituer de nouvelles options thérapeutiques contre les TUALs. Ces techniques consistent à cibler directement des régions cérébrales et des processus cognitifs spécifiques, via des électrodes implantées chirurgicalement (**stimulation cérébrale profonde**), des courants électriques ou des champs magnétiques appliqués au cuir chevelu (**stimulation transcrânienne** électrique et magnétique, respectivement), ou une modulation individuelle auto-générée par rétroaction (**neuro feedback**). Mais les preuves en faveur de leur efficacité contre les TUALs sont actuellement incertaines (Luigjes et al., 2019) et le ciblage d'une région neuronale spécifique pourrait surtout s'avérer insuffisant pour traiter un trouble aussi complexe et hétérogène.

---

Comme présenté ci-dessus, plusieurs options thérapeutiques sont à disposition pour traiter les TUALs. Néanmoins, même si celles-ci se sont avérées positives chez certains, leur efficacité reste modeste et il n'existe aujourd'hui aucun traitement véritablement efficace pour tous les patients. La forte hétérogénéité observée dans la réponse à un traitement donné pourrait s'expliquer par la forte hétérogénéité dans l'étiologie même des TUALs (Litten et al., 2015b). La définition de la pathologie a elle-même évolué pour s'y adapter : on parle de « troubles », au pluriel, de l'usage d'alcool. Pourtant, l'élaboration et le développement des traitements en général ne prennent pas encore suffisamment en compte l'hétérogénéité de l'étiologie et du maintien des TUALs, et par conséquent, de nombreux traitements contre l'alcool peuvent ne pas être applicables à tous les sous-types de buveurs pathologiques.

### **3. Facteurs de vulnérabilité au développement de TUAL**

Un TUAL est une condition **multifactorielle**, c'est-à-dire le résultat d'une interaction entre plusieurs facteurs prédisposants, pouvant être internes (génétiques, métaboliques) ou externes (environnementaux, sociaux, sociétaux). C'est pourquoi seule une portion des individus exposés à l'alcool développent un TUAL, et c'est aussi pourquoi selon les

combinaisons de facteurs et le poids relatif de chacun, que différentes formes de TUALs répondant différemment aux traitements peuvent émerger (Eddie et al., 2015).

a. Facteurs de tolérance

La résistance face aux effets de l'alcool fait partie des facteurs pouvant faciliter le développement d'un TUAL. En effet, les individus capables de boire d'importantes quantités d'alcool sans en ressentir ou en exhiber les effets (troubles de la coordination motrice, ou désinhibition par exemple) ne possèdent pas de frein physiologique à l'augmentation de leur consommation d'alcool. On parle de **tolérance** à l'alcool ou de **LR** pour « **Low level of response to alcohol** ».

b. Facteurs psychodynamiques ou psychiatriques

L'**âge d'initiation** précoce à la consommation d'alcool est fortement associé au risque de développer un TUAL à l'âge adulte (D. A. Dawson et al., 2008). L'adolescence est une période clé pour le développement et la maturation des structures cortico-frontales impliquées dans les fonctions exécutives incluant motivation, planification, prise de décision et flexibilité comportementale. Or l'**altération des fonctions exécutives** est, comme discuté précédemment, une propriété clé dans la progression vers l'addiction. Les patients atteints de TUALs présentent d'importants déficits au niveau des fonctions exécutives et une forte altération de la flexibilité cognitive (Crews & Boettiger, 2009; Jokisch et al., 2014).

La **recherche de sensations** peut constituer l'un des facteurs favorisants essentiels des premières alcoolisations, notamment chez les plus jeunes, incitant aux expériences toxiques et à leur répétition (T. A. Wills et al., 1994). La recherche de sensation est souvent combinée à la prise de risque et à l'impulsivité (Hamilton et al., 2014). L'**impulsivité**, définie par la tendance à réaliser des actions prématurées, mal planifiées et indûment risquées (Potenza & De Wit, 2010) est aussi une indication comorbide courante dans l'addiction (Herman & Duka, 2019; Kreek et al., 2005). Le contrôle comportemental, qui est une dimension particulière de l'impulsivité, contribue à l'autorégulation des comportements liés à la récompense (Jupp & Dalley, 2014).

L'**anxiété** et les **états dépressifs** sont aussi des facteurs prédisposants et comorbides aux TUALS (Ipser et al., 2015). Les personnes fortement anxieuses peuvent consommer l'alcool pour ses propriétés anxiolytiques, en tant que stratégie d'adaptation pour soulager un état affectif de détresse (Khantzian, 2013). Cette forme d'automédication émotionnelle peut sous-

tendre l'initiation de la consommation d'alcool, des états subjectifs sous-jacents du craving et la poursuite de la consommation comme moyen d'atténuer les symptômes de sevrage.

L'importance de ces différents prédisposants semble varier selon le **sexe**, rappelant **l'importance d'étudier systématiquement et de manière indépendante des sujets masculins et féminins**, que ce soit dans les études cliniques ou précliniques. Les adolescentes déclarent boire de l'alcool pour soulager un état dépressif ou de détresse psychologique, tandis que la consommation d'alcool chez les adolescents semble davantage liée à la prise de risque et aux comportements impulsifs (Kuntsche & Müller, 2012). Et de façon intéressante, à l'âge adulte, les femmes subissent des conséquences émotionnelles et physiques plus néfastes, comprenant instabilité émotionnelle, dépression et anxiété, que les hommes qui se livrent à une consommation excessive d'alcool (Patrick et al., 2020).

#### c. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux tels que la **mise à disposition** de l'alcool, la **pression sociale** de l'entourage et de la société (famille, amis, travail, stress, médias, internet) et les **conflits** familiaux, professionnels ou d'autorité, contribuent également au développement des TUALs (Kendler, 1995; Schuckit, 1998). A titre d'exemple, l'actuelle lutte contre la pandémie mondiale de Coronavirus 2019 (COVID-19) causée par le virus SARS-CoV-2 (coronavirus 2 du syndrome respiratoire sévère aigu) confère pour beaucoup d'individus un environnement économique et psychosocial particulièrement stressant, marqué de pertes d'emplois, d'insécurité financières, d'isolement, de distanciation sociale et incertitude quant au développement futur. Cet environnement semble propice au développement de TUALs ou à la rechute alcoolique (Yazdi et al., 2020), particulièrement chez des individus sensibles au stress et à l'anxiété.

#### d. Facteurs génétiques

Les études familiales, de jumeaux et d'adoption ont fournis des preuves robustes quant à la contribution des facteurs génétiques dans la vulnérabilité aux TUALs. La **combinaison de plusieurs facteurs génétiques interviendrait pour environ 50% du développement du TUAL et leur interaction avec les autres facteurs comme environnementaux contribuerait aux 50% restants** (Guerrini et al., 2014; Kendler et al., 2010; Schuckit, 1999; Verhulst et al., 2015). D'autant plus que les caractéristiques et traits de personnalité à risque présentés ci-haut, et d'autres comme des facteurs métaboliques,

peuvent être influencés par la génétique. Par exemple, dans certaines populations asiatiques et juives, une variation génétique de l'alcool et aldéhyde déshydrogénase (respectivement : ADH et ALDH, enzymes responsables du métabolisme de l'alcool), empêche la consommation excessive d'alcool en raison de l'accumulation rapide du métabolite toxique acétaldéhyde responsable des rougeurs, des palpitations, des nausées et des vomissements (Neumark et al., 2004). Autre exemple, les variants génétiques qui augmentent la fonction de la monoamine oxydase (MAO) confèrent une résistance contre les troubles de la conduite et les comportements antisociaux, autres précurseurs comportementaux fréquents de l'addiction à l'alcool (Fergusson et al., 2011).

---

Une meilleure compréhension de l'étiologie des TUALs et sa prise en considération pourrait permettre de créer des traitements plus adaptés aux différentes formes de TUALs. Néanmoins, pour différentes raisons discutées ci-après, il est particulièrement difficile d'étudier, chez l'humain, la contribution relative de chacun de ces facteurs et de leurs interactions dans le développement d'un TUAL. Il est également compliqué de suivre le développement ou l'évolution des comportements addictifs, et d'en étudier les mécanismes neurobiologiques sous-jacents. Les modèles précliniques animaux, auxquels nous devons la majorité de nos connaissances concernant les mécanismes neurobiologiques et neurocomportementaux sous-tendant les effets de l'alcool (Everitt et al., 2018), demeurent ainsi primordiaux pour progresser dans la compréhension de l'étiologie des TUALs et dans l'identification de cibles thérapeutiques efficaces pour tous.

## II- Modèles précliniques des mécanismes neurobiologiques impliqués dans les troubles de l'usage d'alcool

### **1. Importance des modèles précliniques animaux**

#### **a. Tout (ou presque) est sous contrôle ...**

Un modèle animal consiste à représenter, de manière simplifiée, une situation expérimentale dans une espèce animale, dans le but d'étudier des phénomènes plus complexes qui se produisent dans une autre espèce (dans notre cas chez l'humain). Evidemment, les modèles animaux peuvent manquer de nombreux aspects du TUAL humain,

mais il est possible de **contrôler leur histoire génétique et environnementale** pour rechercher des théories scientifiques difficiles à aborder dans les études humaines, en raison de considérations logistiques et éthiques. Des liens de **causalité** peuvent ainsi être établis entre des caractéristiques comportementales, génétiques physiologiques et la consommation d'alcool (Parker et al., 2020), et il est possible de comparer des individus **avant et après** une exposition à l'alcool. Il est alors plus facile d'étudier la contribution relative des facteurs de vulnérabilité, et de leur interaction, dans le développement de TUALs, ainsi que les mécanismes sous-jacents associés à chaque situation.

Chez les rongeurs et plus particulièrement chez les souris, la génétique est bien caractérisée et il est possible de réaliser, de manière tout à fait contrôlée, des manipulations génétiques complexes et de générer des lignées **transgéniques**. Leur anatomie et leur physiologie sont également **bien caractérisées**, ce qui facilite la lecture des changements de comportement ou de caractéristiques associés à une manipulation. Ils présentent de nombreux autres avantages : ils sont petits, s'adaptent bien et sont faciles à loger et à entretenir. Le contrôle aisé de leurs **paramètres environnementaux** contribue à une faible variabilité et donc à une **plus grande fiabilité intra-individuelle des mesures**, et facilite également l'évaluation de la **reproductibilité** de résultats. Ils se reproduisent également rapidement et ont une courte durée de vie de deux à trois ans, de sorte que **plusieurs générations** de rongeurs peuvent être observées dans un laps de temps relativement court. La plupart des souris et des rats utilisés sont consanguins de sorte que, à part les différences entre les sexes, ils sont **génétiquement très similaires**, ce qui contribue à une plus **grande fiabilité interindividuelle** des mesures et facilite également l'évaluation de la **reproductibilité** de résultats. Les souris et les rats sont également relativement peu coûteux et peuvent être achetés auprès de producteurs commerciaux qui élèvent des rongeurs spécifiquement pour la recherche. D'après la fondation pour la recherche biomédicale, 95% des animaux de laboratoire sont des souris et des rats. Pour toutes ces raisons, et plus particulièrement, pour la maîtrise de leur génétique, cette étude a été menée sur des **modèles précliniques murins**.

#### b. Critères de validité

La pertinence d'un modèle animal est jugée sur la base de trois critères dits de validité :

- La validité **théorique/conceptuelle** (ou « construct validity ») fait référence à la similarité par rapport aux facteurs déclenchants et l'étiologie de la condition/du comportement modélisé(e).



- La validité **d'apparence** (ou « face validity ») fait référence aux similitudes phénoménologiques et pathophysiologiques (mêmes symptômes dans le cas d'une pathologie).
- Validité **prédictive** (ou « predictive validity ») fait référence à la réversibilité des troubles créés, à la capacité de prévenir et de corriger les comportements/symptômes à l'aide de traitements ayant démontré leur efficacité en clinique humaine.

## 2. Modèles d'auto-administration volontaire d'alcool chez le rongeur

En raison de leur bonne validité conceptuelle et de leur validité d'apparence intéressante par rapport à la consommation humaine, les procédures basées sur l'auto-administration volontaire sont largement utilisées dans la recherche préclinique sur les addictions aux drogues et l'étude de leurs propriétés renforçantes (Green & Grahame, 2008). Evidemment, comment et pourquoi la drogue testée est consommée varie nettement entre un individu humain évoluant dans son environnement sociétal et un sujet expérimental non humain dans une configuration limitée de laboratoire. Néanmoins, les réactions neurochimiques et circuits neuronaux impliqués dans la génération, la sélection et la mise en œuvre de ces schémas comportementaux sont considérés comme similaires entre ces situations. La consommation volontaire d'alcool chez le rongeur peut ainsi être étudiée en laboratoire à l'aide de modèles d'auto-administration volontaire dits opérants ou non opérants dont les plus communément utilisés sont présentés ci-après d'après d'excellentes revues les catégorisant et les discutant (Fritz & Boehm, 2016; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Shippenberg, 2017; Spanagel, 2017; Tabakoff, 2000).

### a. Modèles non opérants

Les modèles non opérants font références aux procédures d'auto-administration **orales** où les rongeurs ont deux biberons à leur disposition (l'un contenant une solution aqueuse d'alcool et l'autre contenant de l'eau) et peuvent ainsi boire (ou ne pas boire) autant d'alcool qu'ils le souhaitent, lorsqu'ils le souhaitent : il s'agit du paradigme du « **two-bottle choice** » ou **2BC** (Huynh et al., 2019). Les modèles non opérants présentent ainsi, en plus de leur **simplicité technique**, des validités de d'apparence et conceptuelle pour modéliser la consommation humaine. Ils ont également permis l'identification de traitements pharmacologiques prévenant la consommation excessive d'alcool, confirmant leur validité de prédiction (Hubbell et al., 1991; Spanagel & Ziegler, 1997; Volpicelli, 1992). Les

variables dépendantes associées à ce paradigme sont la quantité d'alcool pur consommée (exprimée en g d'alcool/Kg de souris/intervalle de temps), sa préférence relative à l'eau et le volume total de fluide consommé. Des équipements plus complexes tels que les « *lickometers* » et autres appareils similaires couplés aux biberons, permettent aussi d'analyser la dynamique temporelle et donc de manière plus précise la **microstructure** de la consommation d'alcool (Dhaher et al., 2012; Vengeliene et al., 2013).

La **concentration** en alcool de la solution mise à disposition est par exemple un paramètre majeur. Des solutions excessivement concentrées présentent un goût aversif et ne sont pas consommées par les rongeurs. A l'inverse, les solutions trop faiblement concentrées ( $\leq 4\%$ ) ne sont pas pertinentes car les niveaux cérébraux d'alcool qui en résultent sont négligeables (le volume total de fluide ingéré étant limité par des contraintes physiologiques). Les solutions aux concentrations en alcool comprises entre 10 et 20% sont considérées comme standards pour la consommation chez le rongeur. Mais le goût de ces solutions étant déjà fortement prononcé, plusieurs interventions préalables ont été proposées pour qu'elles soient spontanément consommées : la présentation de concentrations croissantes, l'ajout d'agents de saveur comme le sucrose ou le saccharose (qui peuvent être progressivement retirés ou non), ou l'inclusion d'une période d'exposition forcée à l'alcool (exposition intermittente à des vapeurs d'alcool, ou remplacement de l'eau de boisson par une solution alcoolisée). La familiarisation à l'alcool par ajout de sucrose/saccharose n'altère à priori pas la validité d'apparence car les humains boivent souvent des cocktails alcoolisés sucrés avant de progresser vers des alcools plus forts. Néanmoins plusieurs études récentes supportent que la familiarisation préalable par ajout de saccharine n'est pas nécessaire pour l'acquisition de l'auto-administration d'alcool chez le rat, et pourrait même diminuer la consolidation mnésique des indices associés à l'alcool (Augier et al., 2014; Puaud et al., 2018).

La courbe dose-réponse de la consommation d'alcool varie néanmoins entre les différentes lignées de rongeurs. L'utilisation de lignées présentant une **appétence innée** pour l'alcool, comme la C57BL/6J (Rhodes et al., 2007; Yoneyama et al., 2008), ou de lignées **sélectivement élevées** pour consommer de grands volumes d'alcool (Crabbe et al., 2011; Jensen et al., 2021), peut faciliter le développement de l'auto-administration orale d'alcool à des volumes pharmacologiquement pertinents (H. C. Becker & Ron, 2014).

L'**accessibilité temporelle** à l'alcool est également un paramètre majeur affectant la consommation d'alcool (H. C. Becker & Ron, 2014); celle-ci est par exemple largement plus

élevée en cas d'accès **restreint** à une courte durée (15min, Flores-Bonilla et al., 2021) ou d'accès **intermittent** (accès sur 24h, à intervalle de 24h, (Hwa et al., 2011; Kimbrough et al., 2017; Melendez, 2011; Rosenwasser et al., 2013; Simms et al., 2008; Smutek et al., 2014) mais (Crabbe et al., 2012). Ces accès restreints et/ou intermittents présentent en plus l'avantage de produire des motifs de consommation potentiellement plus proches de ceux de la consommation humaine que l'accès continu. De plus, les approches intermittentes assurent une obtention relativement **rapide** de résultats avec un comportement stable de consommation d'alcool après seulement 2 à 5 semaines. L'accès restreint à une courte période de temps est un meilleur moyen pour modéliser le « binge drinking » (Fritz & Boehm, 2016). Rhodes et coll., 2005 ont développé un paradigme appelé « **Drinking In the Dark** » ou **DID**, dans lequel les rongeurs ont accès pendant seulement 2 à 4h par jour à un biberon unique contenant une solution aqueuse d'alcool à 20%, et ce 3h après le début de la phase nocturne (Holgate et al., 2017; Huynh et al., 2019; Rhodes et al., 2005; Thiele et al., 2014; Thiele & Navarro, 2014). Dans ce protocole, des lignées comme la C57BL6/J s'hyper-alcoolisent volontairement et rapidement, jusqu'à atteindre de manière fiable une intoxication alcoolique, avec sédation et incoordination motrice qui caractérisent le « binge drinking ». Certains animaux le font de manière « modérée » (alcoolémie de 0.8g/litre) et d'autres de manière plus sévère (alcoolémie de 2.0g/litre).

Le principal inconvénient de l'auto-administration orale non opérante était la nécessité d'isoler les rongeurs pendant la période d'auto-administration afin de simplifier la mesure de consommation d'alcool et des comportements associés. Mais de nouveaux dispositifs émergents permettent d'analyser, dans une cage collective équipées de capteurs, le comportement individuel de chacun de ces occupants (préalablement équipés de puces). Par exemple, le système **IntelliCage** a déjà été utilisé pour étudier le comportement individuel de consommation d'alcool chez des animaux hébergés collectivement (Iman et al., 2021; Parkitna et al., 2013; Radwanska & Kaczmarek, 2012; Smutek et al., 2014). Similairement, le système **Live Mouse Tracker** est un dispositif de tracking sophistiqué permettant également d'analyser le comportement individuel de souris en cage collective ; mais il n'a à ce jour (et à ma connaissance) jamais été déployé pour étudier la consommation d'alcool (de Chaumont et al., 2019).

## b. Modèles basés sur un conditionnement opérant

Les effets renforçants de l'alcool peuvent être démontrés dans des modèles basés sur le conditionnement opérant où les rongeurs s'auto-administrent volontairement de l'alcool en pressant un levier ou en plaçant leur nez dans une ouverture. Dans ce paradigme d'auto-administration, la **quantité de travail** (nombre d'appuis sur le levier ou de coup de nez) que l'animal fournit pour gagner l'accès à une quantité donnée d'alcool indique donc la **force du renforcement** induit par l'alcool. L'auto-administration opérante présente une grande fiabilité et une bonne validité prédictive. Le principal désavantage de ce paradigme est le temps généralement long nécessaire aux animaux pour acquérir et maintenir une réponse opérante stable.

Les procédures d'auto-administration opérantes sont communément réalisées dans des « **boîtes opérantes** » ou « boîtes de skinner » commercialement disponibles. Ces boîtes sont ainsi équipées d'un ou plusieurs *manipulandi* (**levier**, « **nose-poke** ») transmettant la réponse opérante et d'un ou plusieurs dispositif(s) délivrant l'alcool. Des modules additionnels peuvent être ajoutés afin de programmer l'occurrence d'autres événements (son, lumière) utilisés comme **stimuli discriminatifs** et/ou **renforcements secondaires**. Le programme de renforcement le plus communément utilisé dans ces études est le **ratio fixe RF**, suivi du **ratio progressif RP** (June & Gilpin, 2010). Avec un programme RF, le renforcement est délivré chaque fois qu'un nombre de réponse pré sélectionné, généralement 1 (RF1), est complété. En revanche, avec un programme RP, le nombre de réponse requis pour obtenir le renforcement augmente selon une progression prédéfinie, généralement arithmétique. L'augmentation progressive du ratio peut être introduite à travers plusieurs sessions ou au cours d'une seule session. Dans un programme RP intra-session, l'index de performance est le taux de réponse le plus élevé accompli pour obtenir une seule unité de renforcement : le « **point de rupture** ».

Les modèles opérants ne sont pas associés à une **voie d'administration** spécifique ; l'alcool peut par exemple être délivré par voie intraveineuse, intra crâniale, intra gastrique ou orale. Les voies intra gastrique et intraveineuse permettent de s'affranchir de l'influence du goût et de l'odeur, comme la voie intra crâniale qui permet en plus de minimiser l'impact des facteurs associés au métabolisme périphérique. La voie intra crâniale présente également l'avantage de permettre l'étude de l'implication de régions cérébrales spécifiques dans les effets récompensants de l'alcool. Dans le cas de la voie orale, le nombre d'unités délivrées ne

correspond pas forcément au nombre d'unités consommées, donc des mesures additionnelles comme l'alcoolémie sont appréciées. Comme pour l'auto-administration non opérante, la **concentration** en alcool de la solution administrée est un paramètre majeur. Faire varier la concentration en alcool de 2.5% à 60%, après développement d'une consommation excessive d'alcool, génère chez le rat une courbe dose-réponse typique en forme de U inversé (Carnicella et al., 2011). Les auteurs ont démontrés que les rats ajustent leur réponse au changement de concentration d'alcool afin d'obtenir un niveau constant de consommation (en g/Kg) et d'alcoolémie, ce qui suggèrent que leur comportement opérant est motivé par l'obtention d'un effet pharmacologique spécifique de l'alcool (Carnicella et al., 2011).

Comme dans les modèles non opérants, l'**accessibilité temporelle** est un paramètre majeur affectant la quantité consommée et la motivation dans les modèles opérants. Jeanblanc J et coll. ont récemment proposé un nouveau modèle de « binge drinking » combinant accès restreint (15 min) et auto-administration opérante (FR3 avec levier ; Jeanblanc et al., 2019). Par rapport au paradigme DID classique, ce modèle de « binge drinking » permet l'étude des processus motivationnels et une intoxication plus rapide (Jeanblanc, Rolland, et al., 2019).

L'**automatisation** de ces procédures permet de réduire l'intervention humaine et d'augmenter l'index de reproductibilité. En revanche, l'utilisation de procédures opérantes, parfois complexes, fait intervenir à la fois des **capacités motrices** (en cas de levier) et des **capacités d'apprentissage** qui doivent être correctement contrôlées pour ne pas biaiser l'interprétation des résultats. Par exemple, l'acte moteur d'appui sur le levier semble constituer, à lui seul, une activité renforçante pour les souris (Spanagel & Sanchis-Segura, 2003).

### c. Modèles basés sur la préférence de place conditionnée (PPC)

Un autre paradigme utilisé pour étudier les effets renforçants de l'alcool est la préférence de place conditionnée où les animaux apprennent à associer un **contexte** particulier (stimulus conditionné, SC) avec une **exposition passive** à l'alcool (stimulus inconditionné, SI). Le SI va donc être en mesure d'induire un comportement d'approche ou d'évitement en fonction de la nature du SC ; par exemple une solution d'alcool à concentration optimale induit généralement un comportement d'approche envers le contexte associé, alors qu'une solution d'alcool trop fortement concentrée induit plutôt un comportement

d'évitement. Ce paradigme souligne les forts effets des stimuli conditionnés associés aux drogues addictives et fournit une mesure indirecte de l'effet récompensant d'une drogue.

La préférence de place conditionnée pour l'alcool peut être établie dans des **boîtes à deux ou trois compartiments ou des labyrinthes aux formes variables** (par exemple, rectangulaire, en Y, en T ou en V).

Différents protocoles peuvent être utilisés, mais de façon générale l'un des compartiments est associé à l'administration d'alcool et un autre est associé à l'administration d'une solution contrôle (voir à aucune administration). Après un apprentissage basé sur l'association répétée de l'alcool et de sa solution contrôle avec leurs compartiments respectifs, le rongeur est, au moment du test, libre de se déplacer à travers les deux compartiments. Le temps relatif passé dans le compartiment associé à l'alcool est utilisé comme indicateur de **préférence**. Dans les procédures à trois compartiments, le troisième peut être utilisé comme compartiment de départ ou comme compartiment contrôle évaluant les interférences associées à la nouveauté. Dans toutes les configurations, le compartiment associé à l'administration d'alcool doit être choisi aléatoirement et contrebalancé afin d'éviter les biais de préférence/d'évitement initiaux pour un compartiment (indépendants de l'administration).

Comme pour les procédures opérantes, la **voie d'administration** peut varier mais elle doit garantir l'obtention rapide de concentrations cérébrales d'alcool élevées.

La préférence de place conditionnée permet d'informer sur la **valence émotionnelle de** l'alcool (récompensante/aversive selon sa capacité à induire un comportement d'approche/évitement), mais elle fournit moins d'informations sur la force de son renforcement.

### **3. Modélisations des caractéristiques de l'addiction chez le rongeur**

De nombreux modèles permettent ainsi d'étudier l'auto-administration volontaire d'alcool et d'évaluer ces propriétés renforçantes directement chez les animaux de laboratoire. Mais l'addiction à l'alcool n'est pas une conséquence systématique de la consommation d'alcool, bien que cette dernière soit nécessaire au développement de la première. La consommation d'alcool est considérée comme un comportement « normal » tandis que l'addiction est considérée comme un comportement pathologique. Plusieurs revues récentes présentent des modèles animaux de caractéristiques particulières de l'addiction (Belin-

Rauscent et al., 2016, p.; Lüscher et al., 2020), dont les 5 plus communes sont : (1) **l'escalade de la consommation**; (2) la **motivation croissante pour la drogue/sa recherche compulsive** ; (3) la **préférence pour la drogue** parmi d'autres options récompensantes; (4) le maintien de la consommation **en dépit des conséquences négatives** ; et (5) **l'incubation/rechute**. Certaines méthodes ont également proposé d'induire plusieurs de ces caractéristiques chez l'animal (Ahmed, 2012; Belin-Rauscent et al., 2016; Deroche-Gamonet et al., 2004; Piazza & Deroche-Gamonet, 2013; Planeta, 2013).

a. Escalade de la consommation

Une caractéristique déterminante majeure de l'addiction est l'augmentation ou « l'escalade » de la consommation de drogue se développant avec l'exposition prolongée à celle-ci (Edwards & Koob, 2013). Une escalade de la consommation d'alcool peut être observée chez les rongeurs à l'aide de différents modèles d'**auto-administration volontaire** d'alcool présentés ci-haut, comme l'accès intermittent ou le DID.

b. Recherche motivée voir compulsive

Les toxicomanes développent une préoccupation croissante pour la consommation de drogue et consacrent ainsi de plus en plus de temps et d'énergie pour accéder à cette consommation. La recherche de drogue est, au fil du temps, de plus en plus contrôlée par des stimuli associés à la drogue et peut même se séparer des propriétés récompensantes de la drogue qui diminuent progressivement en raison du développement de la tolérance (Robinson & Berridge, 1993). Cette motivation peut ainsi aboutir à un besoin irrésistible et incontrôlable de réaliser un comportement (même irrationnel) : on parle de compulsion. Cet aspect de la recherche motivée voir compulsive de drogues est étudié chez les animaux à l'aide des **modèles d'auto-administration opérants** ou de **préférence de place conditionnée** (PPC ; moins informative sur l'aspect compulsif). La recherche de drogue pendant des périodes où elle n'est pas disponible ou lorsque sa disponibilité n'est pas signalée, ou encore l'augmentation du « point de rupture » dans un modèle opérant à RP sont utilisées comme indicateurs de recherche compulsive (Allain et al., 2015; Giuliano et al., 2018; Hopf & Lesscher, 2014; Venniro et al., 2016).

### c. Maintien en dépit des conséquences négatives

Une autre caractéristique majeure de l'addiction est le maintien de la consommation de drogue en dépit des conséquences négatives. Il s'agit d'une autre forme de compulsion. Celle-ci est modélisée chez le rongeur par la prise persistante de drogue malgré une **punition contingente** telle que des **chocs électriques** (Halladay et al., 2017) ou encore l'ajout d'**agents de saveurs aversifs** dans la drogue, comme la quinine directement ajoutée dans les solutions d'alcool (Sneddon et al., 2019). A titre d'exemple, après une alcoolisation volontaire chronique de 8 mois (Hopf & Lesscher, 2014), ou intermittente de 3 mois (Hopf et al., 2010), les rats maintiennent leur consommation d'alcool en dépit de l'ajout de quinine. Et les modèles de consommation d'alcool associés à un choc électrique chez les rats à haute préférence pour l'alcool démontrent que la punition diminue de manière contexte-dépendante l'auto-administration subséquente d'alcool (Marchant et al., 2013) mais que certains rats maintiennent leur consommation en dépit des chocs électriques (Seif et al., 2013). Le CPF, et plus précisément sa partie ventromédiane, semble jouer un rôle clef dans la régulation à la baisse de l'auto-administration d'alcool associée à une punition (Halladay et al., 2020).

### d. Préférence par rapport à d'autres récompenses

L'addiction est également caractérisée par un choix accru pour la drogue par rapport à d'autres récompenses (généralement plus « saines »). Lorsqu'une récompense hautement palatable comme une solution sucrée est proposée en parallèle de la drogue étudiée, la majorité des animaux diminuent volontairement leur prise de drogue en faveur de la **récompense alternative** (Caprioli et al., 2015). Néanmoins, il a été démontré pour la cocaïne et plus récemment l'alcool, qu'une faible proportion de rongeurs (environ 15%) choisit la cocaïne/l'alcool plutôt que la solution sucrée alternative (alcool : Augier et al., 2018; cocaïne : Vanhille et al., 2015). Augier et coll., démontrent en plus que ces 15% de rats préférant l'alcool présentent d'autres comportements de types addictifs comme une motivation plus élevée pour obtenir l'alcool (augmentation du point de rupture dans un RP) et le maintien de la consommation en dépit de punitions (chocs électriques et ajout de quinine). Ces données sont pertinentes avec la faible proportion de consommateurs humains évoluant vers des comportements addictifs.



#### e. Incubation/rechute

Même après une abstinence prolongée, les toxicomanes montrent une forte propension à rechuter et l'augmentation du craving induit par des stimuli associés à la drogue, appelée « incubation », pourrait jouer un rôle fondamental dans ce processus (H. C. Becker, 2014; P. Li et al., 2015). Ces aspects déterminant de l'addiction sont couramment modélisés chez les animaux (Marchant et al., 2019; Martin-Fardon & Weiss, 2012) à l'aide de deux approches différentes :

(1) L'**extinction-réinstauration** (Katner, 1999). Dans le paradigme de l'extinction-réinstauration, les animaux subissent une série de séances d'extinction après une période d'auto-administration de la drogue ; il en résulte une baisse progressive de la réponse. Après l'extinction, la réponse à la drogue est rétablie par un stimulus stressant, de faibles doses d'amorçage de la drogue ou par la présentation d'indices associés initialement à la drogue (Bossert et al., 2013; Lê et al., 1998). Les circuits neuronaux de réintégration ont été largement cartographiés et comprennent des structures associées au système dopaminergique mésocorticolimbique comme l'amygdale et le CPF (Keistler et al., 2017).

(2) L'**abstinence-rechute** (Vengeliene et al., 2014; Villarín Pildaín et al., 2013). Dans les procédures d'abstinence-rechute, les animaux sont soumis à une période d'abstinence forcée après une période prolongée d'auto-administration de la drogue. Par la suite, ils sont à nouveau exposés et testés à l'auto-administration. La rechute induite par l'abstinence dépend potentiellement du striatum dorso-latéral.

---

Il est ainsi possible de modéliser et d'étudier différentes dimensions et étapes du développement des TUALs, et plus de 50 ans de progrès dans la recherche sur l'auto-administration d'alcool dans ces modèles ont permis la compréhension des bases moléculaires et cellulaires des effets renforçants de l'alcool et l'identification de circuits neuronaux impliqués dans la recherche d'alcool et dans la rechute (Everitt et al., 2018). Cependant, il existe encore un écart important entre les recherches cliniques et précliniques, qui contribue à l'échec de la mise au point de nouveaux traitements efficaces. Notamment, les facteurs de vulnérabilité aux TUALs qui sont de plus étudiés en clinique sont encore relativement peu pris en compte dans les études précliniques, tout comme l'hétérogénéité interindividuelle dans le développement des comportements addictifs. Pourtant, leur prise en compte pourrait permettre l'élaboration de modèles précliniques spécifiques à différentes formes de TUALs (étiologiquement sous-tendues par des combinaisons distinctes de facteurs), et ainsi aider à identifier et à corriger d'avantages de mécanismes neuropharmacologiques et moléculaires sous-tendant l'addiction à l'alcool.

Dans la partie III ci-après, est présentée la sous-unité  $\alpha 5$  du récepteur cholinergique nicotinique ( $\alpha 5$ -nAChR), fortement exprimée dans les voies mésocorticolimbique et habénulo-interpédonculaire décrites en partie I, et dont les variations génétiques ont récemment été identifiées comme facteur de risque aux TUALs.

## Partie III : Implication des récepteurs nicotiques des voies mésocorticolimbiques et habénulo-interpédonculaire dans la vulnérabilité à l'alcool-dépendance

### I- Récepteurs nicotiques des voies mésocorticolimbique et habénulo-interpédonculaire

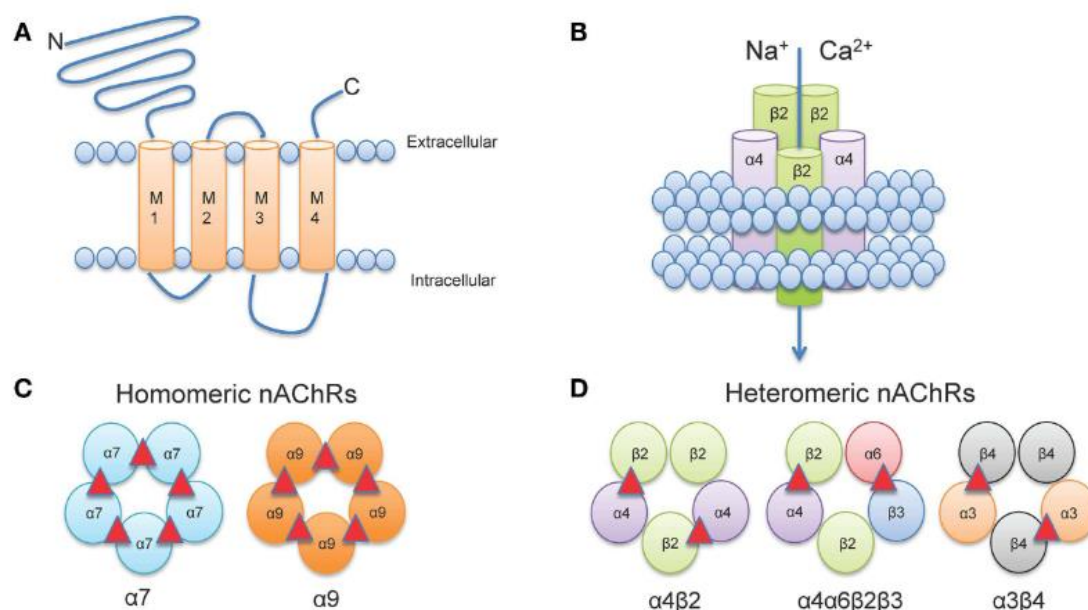
#### 1. Présentation générale des récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChRs)

##### a. Structure

Les récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChRs) illustrés en **Figure 12** sont des canaux ioniques pentamériques ligand-dépendants : c'est-à-dire qu'ils sont composés de **5 sous-unités**, qui sont 5 protéines, organisées autour d'un **pore central** permettant les échanges ioniques après **activation par un ligand** spécifique (Albuquerque et al., 2009; E. Cooper et al., 1991; Morales-Perez et al., 2016), comme l'acétylcholine (ACh, agoniste endogène) ou la nicotine (agoniste exogène).

Dans le système nerveux mammifère et notamment humain, il existe 8 sous-unités alpha ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ) et 3 sous-unités beta ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ), chacune étant une protéine codée par un gène spécifique. Une 9ème sous-unité alpha, la sous-unité  $\alpha 8$ , a été identifiée dans des espèces aviaires mais n'a jamais été trouvée chez les humains et les autres mammifères (Gotti et al., 2006; Millar & Gotti, 2009). Comme décrit en **Figure 12**, ces sous-unités sont toutes composées d'une **extrémité N-terminale extracellulaire**, de **4 segments transmembranaires (de M1 à M4)**, d'une **boucle intracellulaire variable entre M3 et M4**, et d'une **extrémité C-terminale extracellulaire** (Corringer et al., 2000). C'est la présence d'une paire Cys-Cys près du début du segment transmembranaire M1 qui détermine la classification d'une sous-unité comme alpha ; celles qui ne possèdent pas cette paire Cys-Cys sont classées beta (Changeux & Edelstein, 1998; Corringer et al., 2012; Le Novère & Changeux, 1995). La longue boucle cytoplasmique entre M3 et M4 est le domaine qui diverge le plus entre les 12 sous-unités nAChRs existantes. L'extrémité N-terminale extracellulaire contient le domaine de liaison de l'ACh qui forme une poche hydrophobe localisée entre les sous-unités adjacentes du récepteur assemblé. Le segment M2 des 5 sous-unités assemblées en un récepteur forme

le pore conducteur du canal, et les régions dans la boucle intracellulaire M2 contribuent à la sélectivité cationique et à la conductivité du canal (Corringier et al., 2000).



**Figure 12. Structure des nAChRs.** (A) Topologie membranaire d'une sous-unité neuronale nAChR. Chaque sous-unité nAChR contient quatre domaines transmembranaires (M1-M4), une terminaison extracellulaire amino et carboxy, et une boucle intracellulaire M3-M4 proéminente de longueur variable. (B) Cinq sous-unités co-assemblées pour former un récepteur fonctionnel. (C) Les récepteurs homomériques sont constitués uniquement de sous-unités  $\alpha$  et ont généralement une faible affinité pour les agonistes. À ce jour, seules les sous-unités  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$  des mammifères (non représentées) peuvent former des homomères fonctionnels. (D) La majorité des nAChRs à haute affinité sont hétéromères et consistent en une combinaison de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les sites de liaison ACh sont représentés sous forme de triangles rouges. Figure extraite de la revue (Hendrickson et al., 2013).

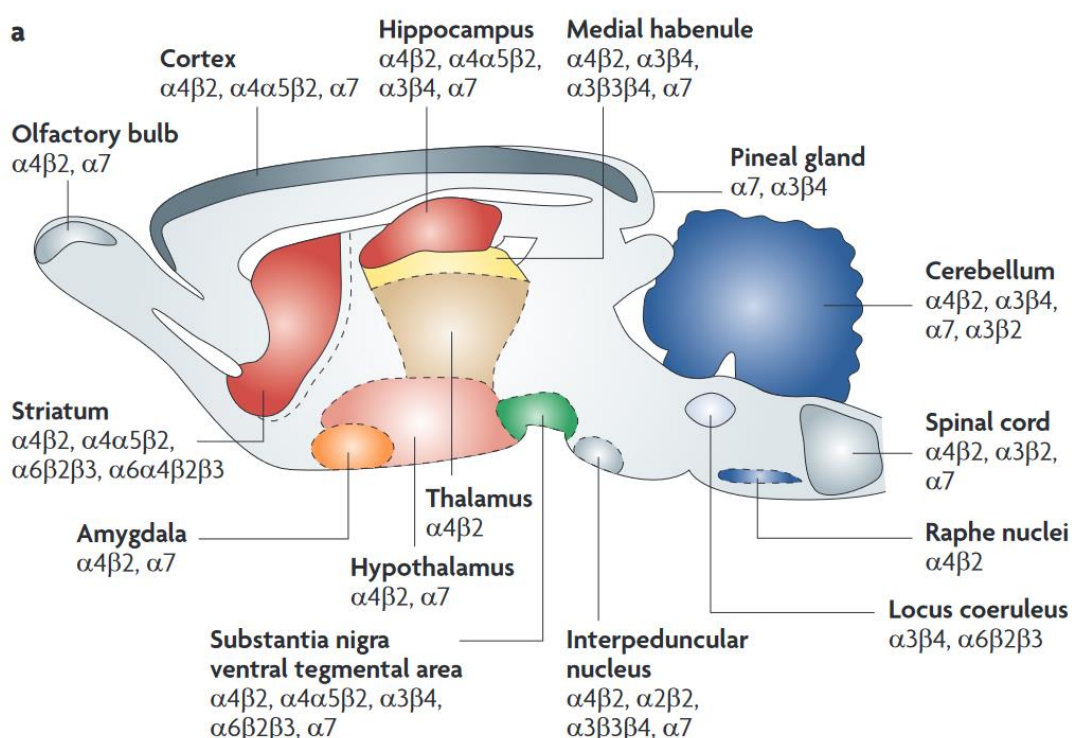
**Abréviations:**  $Ca^{2+}$ , ion calcique;  $Na^+$ , ion sodique.

Ces différentes sous-unités peuvent s'assembler en différentes combinaisons pentamériques de nAChRs, soit de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (structure hétéropentamérique), soit uniquement de sous-unités  $\alpha 7$  ou  $\alpha 8$  ou  $\alpha 9$  (structure homopentamérique ; Gotti et al., 2006, 2009; McGehee et al., 1995). Dans la nomenclature des nAChRs, un **astérisque** (exemple :  $\alpha 4\beta 2^*$ ) indique que d'autres sous-unités que celle(s) indiquée(s) peuvent être présentes et peut ainsi être lu dans le cas de  $\alpha 4\beta 2^*$  comme « nAChRs contenant (entre autres) des sous-unités  $\alpha 4$  et  $\beta 2$  ». Les récepteurs hétéropentamériques n'ont a priori que deux sites de liaison situés entre des paires voisines de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Gotti et al., 2006; Taly et al., 2009; Zoli et al., 2018), mais des sites de liaison peu conventionnels ont récemment été signalés (J. Wang & Lindstrom, 2018). La combinaison et la stœchiométrie des sous-unités nAChRs déterminent ensuite la

cinétique des états conformationnels, la sélectivité de la perméabilité cationiques, les affinités pharmacologiques et la localisation de chaque sous-type de nAChRs (Dani & Bertrand, 2007; Gotti et al., 2009; M. Picciotto et al., 2008; Quick & Lester, 2002; J. Wang & Lindstrom, 2018; Zoli et al., 2018), ce qui rend les nAChRs hétéropentamériques très complexes.

### b. Localisation

Les nAChRs sont présents dans le SNC mais aussi dans le système nerveux périphérique (SNP), ainsi que dans les jonctions neuromusculaires squelettiques. Au niveau du SNC, les nAChRs sont exprimés dans presque toutes les régions cérébrales (**Figure 13**).



**Figure 13. Expression des sous-unités du nAChR dans le SNC.** Ce schéma extrait de (Taly et al., 2009) représente la distribution et l'assemblage des différentes sous-unités du nAChR dans un cerveau de rat (vue sagittale, rostrale→caudale).

Les hétéropentamères les plus abondants sont ceux contenant les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\beta 2$ ; ils représentent plus de 90% des récepteurs nAChRs présents dans le cerveau des rongeurs (Albuquerque et al., 2009). Cependant, la sous-unité  $\beta 2$  est moins omniprésente dans le cerveau humain (Paterson & Nordberg, 2000). Les  $\alpha 4\beta 2$ \*nAChRs sont largement distribués dans diverses régions cérébrales, y compris dans le système dopaminergique mésocorticolimbique (Gotti et al., 2007, 2009; Perry et al., 2002; Zoli et al., 2002).

Les homopentamères les plus fréquents sont ceux faits de sous-unités  $\alpha 7$ . Ils sont aussi densément exprimés dans le cerveau, et exprimés de manière prédominante dans l'HPC, le cortex et les régions limbiques sous-corticales (Gotti et al., 2007, 2009).

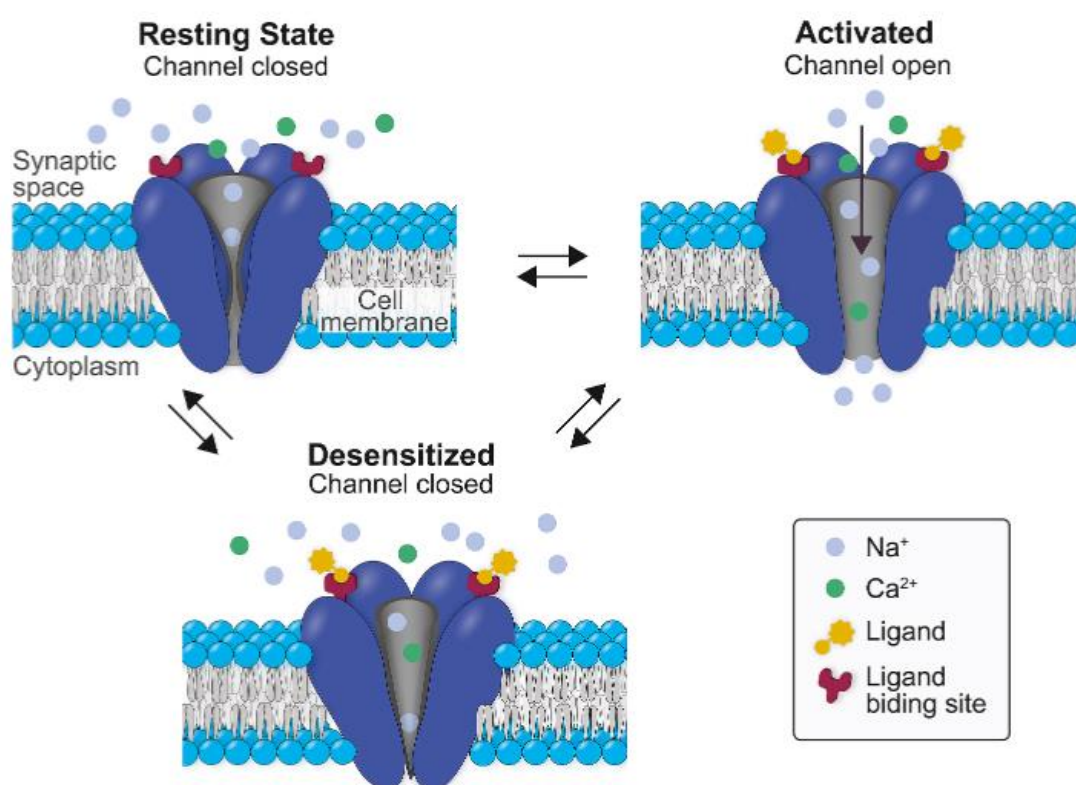
### c. Fonction

Du point de vue mécanistique, les nAChRs existent sous trois états conformationnels résumés en **Figure 14** : (1) fermés ou au repos ; (2) ouverts ou actifs ; et (3) désensibilisés. En condition de repos, le canal du nAChR demeure **fermé (état 1)**. En revanche, la fixation d'un agoniste comme l'ACh sur le nAChR (en général via deux sites de fixation entre des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  pour les hétéropentamères ou via cinq sites pour les homopentamères) provoque un changement de conformation du récepteur qui engendre **l'ouverture du canal** durant quelques millisecondes (**état 2**). Le canal alors ouvert, peut : soit se refermer et retourner à un état de repos (état 1) ; soit, lorsque la stimulation est prolongée, passer par un **état de désensibilisation** au cours duquel il ne réagit plus à l'ACh ou aux autres agonistes (**état 3** ; Dani & Bertrand, 2007). Les sous-types hétéropentamériques comme  $\alpha 4\beta 2^*$  ou  $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs se désensibilisent lentement lorsqu'ils sont exposés à de faibles concentrations de nicotine, tandis que les homopentamériques comme  $\alpha 7^*$ nAChRs sont beaucoup moins sensibles à la désensibilisation à une faible concentration de nicotine (Wooltorton et al., 2003). Lorsqu'ils sont ouverts, les nAChRs permettent le passage des cations sodiques, calciques et potassiques selon leurs gradients électrochimiques (**l'entrée de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et la sortie de  $\text{K}^+$** ), qui entraînent ensuite l'activation de différentes **cascades moléculaires** impliquées notamment dans la mémoire, l'addiction, le développement et le maintien cellulaire (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004; Gotti et al., 2006).

Les nAChRs sont exprimés au niveau du **soma**, des **dendrites** et des **axones** neuronaux (Livingstone & Wonnacott, 2009). Ils sont présents au niveau **post-synaptique** où ils peuvent directement moduler l'excitabilité neuronale, mais aussi au niveau **présynaptique** où ils peuvent également faciliter la libération  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de neurotransmetteurs, soit indirectement via la dépolarisation membranaire causée par l'influx de  $\text{Na}^+$  (et l'activation subséquente des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants), soit directement via l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le canal (Albuquerque et al., 2009; Henderson & Lester, 2015; McGehee et al., 1995; Nashmi & Lester, 2007). Les nAChRs ont plus précisément été démontrés comme impliqués dans la régulation de la libération d'ACh (Wilkie et al., 1993), de dopamine (S. Grady et al.,

1992), de glutamate (Alkondon & Pereira, 1997), de GABA (Aracri et al., 2010) et de NE (Clarke & Reuben, 1996).

En plus de leurs propriétés ionotropiques, les nAChRs sous-tendraient également la signalisation des protéines G via leur boucle cytoplasmique, comme l'ont largement examiné (Kabbani et al., 2013). La majorité des recherches à cet égard se sont concentrées sur les  $\alpha 7$ \*nAChRs et ont constatées que ceux-ci peuvent activer la signalisation métabotropique médiée par  $G\alpha_q$  via un groupe de liaison à la protéine G au niveau de la boucle M3-M4 de la sous-unité  $\alpha 7$  (King et al., 2015). Fait intéressant, les sous-unités  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 2$  semblent également capables de lier les protéines  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  (Fischer et al., 2005).



**Figure 14.** Représentation didactique des trois principaux états fonctionnels du nAChR. À l'état de repos (en haut à gauche), les sites de liaison de l'ACh sont inoccupés et le canal fermé, empêchant le passage des cations à travers la membrane plasmique. À l'état ouvert ou activé (en haut à droite), le canal est ouvert et constitue un pore membranaire permettant le passage des cations. À l'état désensibilisé (en bas), les sites de liaison de l'ACh sont (généralement) occupés, mais le pore est fermé et non conducteur. Figure extraite de (Wittenberg et al., 2020). **Abréviations:**  $Ca^{2+}$ , ion calcique;  $Na^+$ , ion sodique.

## 2. Récepteurs nAChRs du système dopaminergique mésocorticolimbique

### a. Anatomie de la transmission cholinergique dans l'ATV

L'ATV contient des projections cholinergiques afférentes originaires du **noyau tegmental pédonculopontin (PPTg** pour « pedunculo pontine tegmental nucleus ») et du **noyau tegmental latérodorsal (LDTg** pour « laterodorsal tegmental nucleus » ; (Dautan et al., 2016; Oakman et al., 1995; C. Zhang et al., 2018), représentées en **Figure 15**. Ces fibres cholinergiques innervent des subdivisions et des populations neuronales distinctes de l'ATV.

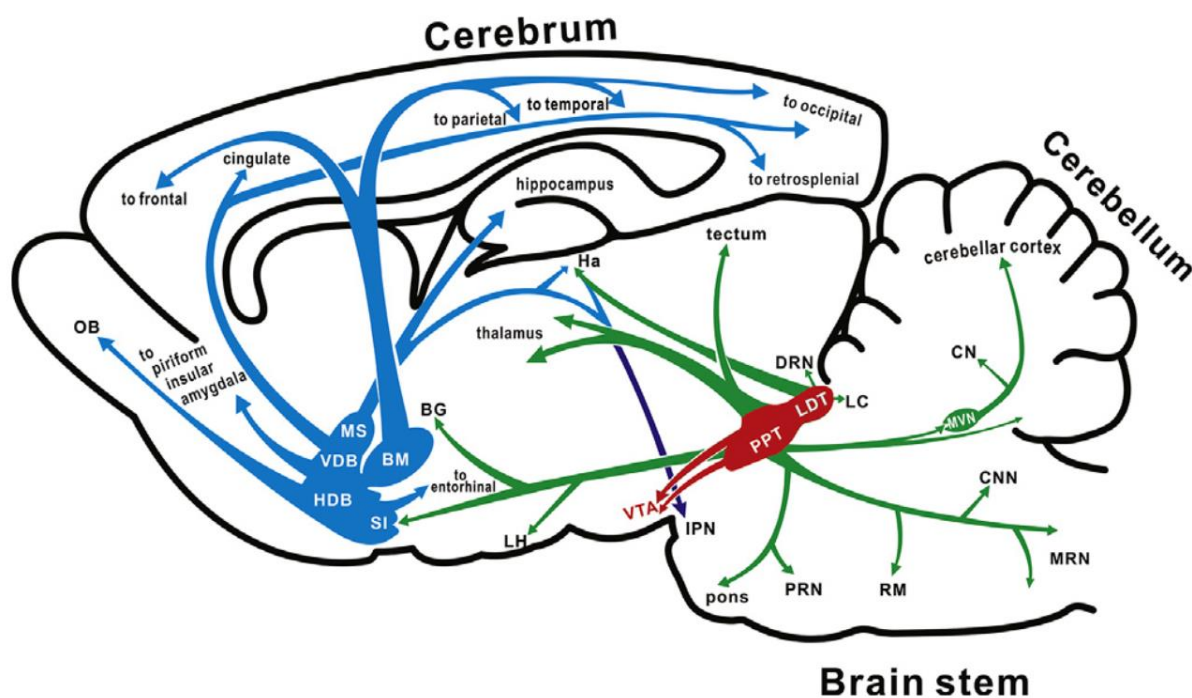
Les neurones cholinergiques du LDTg innervent préférentiellement les **neurones dopaminergiques de l'ATV projetant sur le NAc** (Dautan et al., 2016). Et les axones de ces derniers envoient également un grand nombre de collatérales sur des neurones non-dopaminergiques (principalement GABAergiques) de l'ATV (Dautan et al., 2016). L'activation des entrées du LDTg induit une forte excitation des neurones dopaminergiques projetant sur le NAc et une inhibition sélective des neurones non dopaminergiques projetant sur le NAc (Dautan et al., 2016). Les neurones cholinergiques du LDTg peuvent ainsi moduler la libération de DA striatale en contrôlant les modes de déclenchement des neurones DA qui projettent vers le cœur du NAc, ainsi que les régions striatales médiales et le thalamus (Dautan et al., 2016).

Les neurones cholinergiques du PPTg projettent sur toutes les sous-régions de l'ATV. Leurs terminaisons innervent les **neurones dopaminergiques méso-accumbaux et méso-corticaux**. La stimulation des entrées du PPTg augmente la décharge phasique des neurones dopaminergiques et accentue ainsi la libération de DA dans le NAc, mais à l'inverse inhibe les populations non dopaminergiques, principalement GABAergiques (Dautan et al., 2016; Omelchenko & Sesack, 2006).

La modulation cholinergique sur les neurones dopaminergiques peut ainsi faciliter directement ou indirectement la transition entre des motifs de décharge tonique et phasique ou alors interrompre un motif de décharge phasique, et par conséquent affecter la libération subséquente de DA et les comportements associés (Solecki et al., 2013). Celle-ci est sous-tendue par l'expression intra-ATV de **nAChRs (Figure 16)**. La distribution des nAChRs dans l'ATV a été démontrée au niveau pré, post et extra-synaptique (Livingstone & Wonnacott, 2009). L'ATV est densément innervée par des entrées synaptiques contenant des nAChRs, incluant les afférences cholinergiques et GABAergiques des noyaux PPTg et LDTg, mais aussi



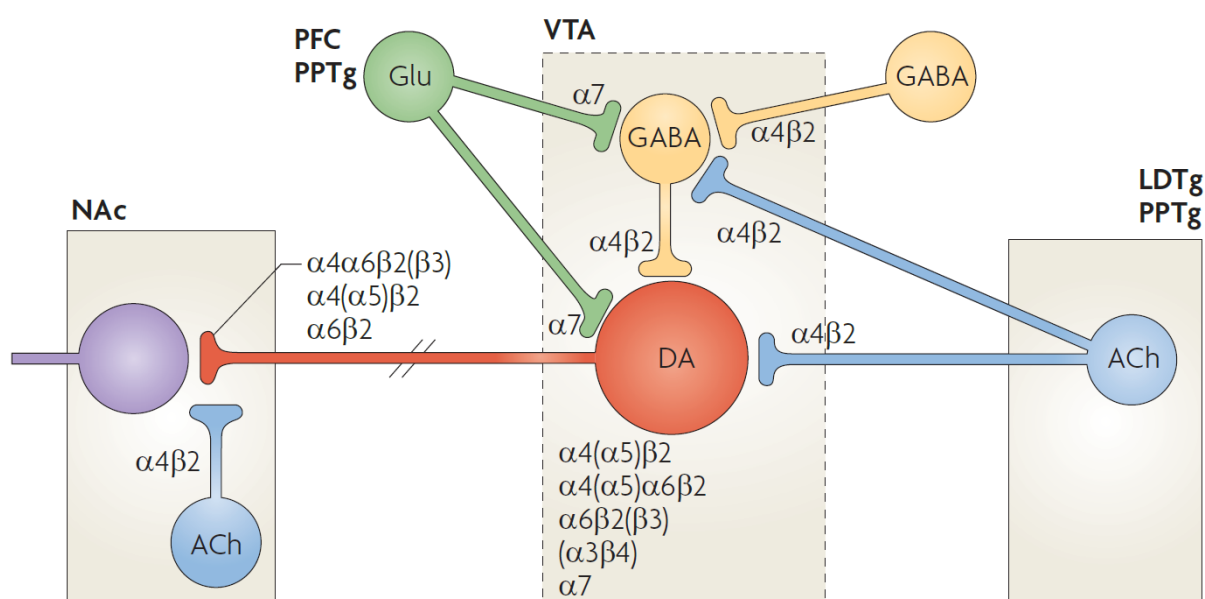
les afférences glutamatergiques du CPF (Champtiaux et al., 2003; Gotti et al., 2007; Mansvelder et al., 2002). De plus, les nAChRs sont fortement exprimés dans les neurones dopaminergiques et GABAergiques de l'ATV en plus des terminaisons dopaminergiques dans le NAc, et leur profil d'expression varie selon le sous-type (Hendrickson et al., 2013).



**Figure 15. Innervation cholinergique de l'ATV.** Représentation schématique du système cholinergique central dans une vue sagittale de cerveau de rat. Les neurones cholinergiques du SNC sont fortement limités au cerveau antérieur basal et au mésencéphale, tandis que les fibres cholinergiques innervent presque toutes les régions du cerveau. Le cerveau antérieur basal comprend le septum médian, les bras vertical et horizontal de la bande diagonale, le noyau basal de Meynert et la substantia innominata, qui envoient des projections cholinergiques vers le télencéphale (en bleu). Le mésencéphale comprend le LDTg, le PPTg et le noyau vestibulaire médian, et innerve presque toutes les autres régions du cerveau (en vert). Les afférences cholinergiques de l'ATV proviennent du PPTg et du LDTg (en rouge). Figure extraite de (C. Zhang et al., 2018). **Abréviations:** MS, septum médian; VDB, the bras vertical de la bande diagonale; HDB, bras horizontal de la bande diagonale; BM, noyau basale de Meynert; SI, substantia innominata; LDTg, noyau tegmental latérodorsal; PPTg, noyau tegmental pédonculo-pontin; MVN, noyau vestibulaire médian; VTA, aire tegmentale ventrale; OB, bulbe olfactif; Ha, habénula; BG, ganglions de la base; LH, hypothalamus latéral; IPN, noyau interpédonculaire; PRN, noyau réticulé pontin; RM, noyau magnus du raphé; MRN, noyau réticulé médullaire; CNN, noyaux des nerfs crâniens; LC, the locus coeruleus; DRN, noyau dorsal du raphé.

Les sous-types contenant les **sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha 6$**  sont très fortement exprimés au niveau des neurones dopaminergiques (région somatodendritique) et des terminaisons GABAergiques les innervant (Champtiaux et al., 2003; Ngolab et al., 2015). La **sous-unité  $\alpha 7$**  est aussi largement

exprimée sur les neurones dopaminergiques, sur les terminaisons glutamatergiques et certaines cellules gliales (Corradi & Bouzat, 2016; Maex et al., 2014). La **sous-unité  $\beta 2$**  est exprimée dans les neurones dopaminergiques et les terminaisons glutamatergiques et GABAergiques (Azam et al., 2007). Les **sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 3$**  sont aussi exprimées sur les neurones dopaminergiques (Morel et al., 2014a). Les neurones dopaminergiques de l'ATV expriment simultanément plusieurs sous-types de nAChRs avec néanmoins un sous-type prédominant déterminant sa spécificité fonctionnelle (K. Yang et al., 2009). Les fibres cholinergiques et les nAChRs peuvent ainsi sous-tendre de manière flexible la modulation cholinergique des afférences et des sorties dopaminergiques de l'ATV (**Figure 16**), et les sorties comportementales associées.



**Figure 16.** Les récepteurs nAChRs contrôlent la connectivité afférente et éfferente des neurones dopaminergiques de l'ATV. Les neurones dopaminergiques (DA, en rouge) de l'aire tegmentale ventrale (ici VTA), reçoivent deux principaux types d'entrées excitatrices : tout d'abord des neurones cholinergiques (ACh, en bleu) des noyaux tegmentaux latérodorsal (LDTg) et pédonculopontin (PPTg); et deuxièmement, des neurones glutamatergiques (Glu, en vert) de diverses sources, y compris du cortex préfrontal (PFC) et du PPTg. Les neurones dopaminergiques reçoivent également des entrées inhibitrices GABAergiques (en jaune) et envoient des projections axonales au noyau accumbens (NAC), où ils reçoivent des entrées d'interneurones cholinergiques intrinsèques (ACh, en bleu). **Abréviations:** ACh, acétylcholine; DA, dopamine; Glu, glutamate; LDTg, noyau tegmental latérodorsal; NAc, noyau accumbens; PFC, cortex préfrontal; PPTg, noyau tegmental pédonculopontin; VTA, aire tegmentale ventrale.

b. Modulation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV par les nAChRs

L'ACh et les nAChRs modulent directement l'activité des neurones dopaminergiques (revues : de Kloet et al., 2015; Xiao et al., 2020; C. Zhang et al., 2018). La présence d'ACh ou d'agonistes des nAChRs entraîne une dépolarisation et le déclenchement d'une fréquence de décharge phasique dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (Dautan et al., 2016; Morel et al., 2014a). Et l'excitation médiée par les nAChRs persiste en présence de tétrodontoxine, démontrant une importante composante postsynaptique (Calabresi et al., 1989). A l'inverse, l'infusion intra-ATV d'un antagoniste des nAChRs (mécamylamine) entraîne une atténuation de la libération phasique de DA dans le NAc (Solecki et al., 2013).

La modulation cholinergique de la libération de DA par l'ATV est dépendante du sous-type de nAChRs. Les sous-types contenant  **$\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  ou  $\alpha 6$  modulent directement la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques** (M. R. Picciotto et al., 2012; M. R. Picciotto & Kenny, 2013; Salminen et al., 2004; Wonnacott et al., 2000), et l'activation des  **$\alpha 7$ \*nAChRs augmente la transmission glutamatergique** promouvant la libération de DA (Berry et al., 2019; Maex et al., 2014; M. R. Picciotto et al., 2012). Les  **$\alpha 4\beta 2$ \*nAChRs présents sur les boutons GABAergiques modulent la libération de GABA** qui affecte ensuite l'efflux de dopamine, et les  **$\alpha 3\beta 4$ \*nAChRs sur les terminaisons cholinergiques régulent la libération d'ACh** qui module ensuite la transmission dopaminergique (M. R. Picciotto et al., 2012). La sous-unité  $\alpha 5$  apparaît comme essentielle à l'assemblage de la sous-unité  $\alpha 4$  et sa fonction dans l'ATV (Chatterjee et al., 2013).

c. Rôles des nAChRs dans les effets renforçants de la nicotine

En modulant directement ou indirectement l'activité des neurones dopaminergiques mésocorticolimbiques, les nAChRs de l'ATV jouent ainsi un rôle essentiel dans les effets récompensants et renforçants de leur agoniste exogène : la nicotine. La nicotine affecte le système cérébral de la récompense en se fixant sur les nAChRs exprimés sur les neurones dopaminergiques de l'ATV et en augmentant la libération subséquente de DA dans les aires cibles telles que le NAc ; événement clef dans la transmission du signal récompensant et dans l'initiation du renforcement. Comme résumé dans les revues (L. Wills & Kenny, 2021; Wittenberg et al., 2020), la nicotine augmente la libération intra-NAc de DA via une action combinée sur différents nAChRs de l'ATV : (1) en activant directement les neurones

dopaminergiques via les  $\alpha 4/\alpha 6\beta 2$ \*nAChRs présents à leurs surfaces (Dani & Bertrand, 2007; Mao et al., 2011; Maskos et al., 2005; Pons et al., 2008; Tapper et al., 2004); (2) en diminuant l'inhibition des neurones dopaminergiques via la désensibilisation des  $\alpha 4\beta 2$ \*nAChRs sur les neurones inhibiteurs GABAergiques (Grieder et al., 2019; Mansvelder et al., 2002); (3) en augmentant indirectement la stimulation des neurones dopaminergiques via l'activation des  $\alpha 7$ \*nAChRs présynaptiques sur les terminaisons glutamatergiques (Mansvelder et al., 2002; Pidoplichko, 2004).

Il a par exemple été établi que les  $\alpha 4/\alpha 6\beta 2$ \*nAChRs sont suffisants pour sous-tendre l'auto-administration de nicotine chez la souris (Maskos et al., 2005; Pons et al., 2008).

### **3. Récepteurs nAChRs de la voie cholinergique habénulo-interpédonculaire**

#### **a. Rôle dans les effets négatifs et aversifs du sevrage nicotinique**

Alors que les effets motivationnels positifs de la nicotine sont principalement sous-tendus par l'activation de la voie dopaminergique mésolimbique, les effets motivationnels négatifs du sevrage de la nicotine semblent médiés par la voie MHb-IPN (McLaughlin et al., 2017; Pang et al., 2016; Wittenberg et al., 2020). Cette dernière exprime densément presque tous les sous-types neuronaux de nAChRs (S. R. Grady et al., 2009; Marks et al., 1992). Chez des souris exposées de manière chronique à la nicotine, l'injection de mécamylamine dans la MHb ou l'IPN est suffisante pour précipiter les symptômes de sevrage nicotinique (Damaj et al., 2003; De Biasi & Salas, 2008; Malin & Goyarzu, 2009; Matos-Ocasio et al., 2021a; Salas, 2004; Salas et al., 2009). Et les souris dépourvues des sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 4$ -nAChR (les plus densément exprimées dans la voie MHb-IPN) présentent des réponses de sevrage réduites (Salas, 2004; Salas et al., 2009). D'autres études ont par la suite démontré que la signalisation habénulaire cholinergique est nécessaire pour le sevrage de la nicotine (Frahm et al., 2015), que l'activation optogénétique des neurones GABAergiques de l'IPN est suffisante pour provoquer des symptômes de sevrage (Zhao-Shea et al., 2013), et que l'augmentation de l'activité des nAChRs dans la MHb sous-tend les symptômes anxieux du sevrage de la nicotine (Pang et al., 2016; Zhao-Shea et al., 2015). Il semble même que différentes sous-régions de la MHb et de l'IPN soient impliquées dans différents aspects du syndrome de sevrage de la nicotine (Matos-Ocasio et al., 2021a; Shih et al., 2014).

## b. Rôle dans les propriétés aversives de la nicotine

Outre les effets aversifs du sevrage nicotinique, les récepteurs nAChRs de la MHb semblent intervenir dans le contrôle de l'auto-administration de nicotine. Les souris transgéniques surexprimant  $\beta 4^*$ nAChRs (« Tabac ») montrent une sensibilité accrue aux propriétés aversives de la nicotine et, par conséquent, une diminution du comportement de consommation de nicotine et une forte aversion de place conditionnée pour de faibles doses de nicotine (Frahm et al., 2011). A l'inverse, nous avons récemment démontré que l'absence de  $\beta 4^*$ nAChRs fonctionnels entraîne une augmentation de l'auto-administration de nicotine à forte dose et que la réexpression de  $\beta 4^*$ nAChRs spécifiquement dans la voie MHb-IPN est suffisante pour corriger ce déficit (Husson et al., 2020).

## II- Récepteurs nicotiniques et effets de l'alcool

### 1. Les nAChRs : une cible commune à l'alcool et à la nicotine

#### a. Comorbidité entre les addictions à l'alcool et à la nicotine

L'alcool et la nicotine font partis des drogues les plus consommées dans le monde et les plus communément co-abusées. Approximativement, 80 à 90% des alcoolo-dépendants fument des cigarettes (Falk, 2006; T.-K. Li et al., 2007) et approximativement 60% des fumeurs consomment des quantités considérables d'alcool (Batel et al., 1995; DiFranza & Guerrera, 1990; York & Hirsch, 1995). L'alcoolisme a été estimé 10 à 14 fois plus fréquent chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (DiFranza & Guerrera, 1990; York & Hirsch, 1995). Un début précoce de tabagisme chez les adolescents prédit aussi le développement de problèmes liés à l'alcool dans la vie adulte (Grant, 1998; Riala et al., 2004). La quantité d'alcool consommée et le degré de dépendance à l'alcool sont positivement corrélés avec la quantité fumée de tabac (Barrett et al., 2006; Room, 2004). A l'inverse, arrêter de fumer réduit la consommation d'alcool (McKee & Weinberger, 2013; Mitchell et al., 2012). Les études épidémiologiques récentes suggèrent que jusqu'à 92% des personnes souffrant de troubles liés à la consommation de nicotine répondent également aux critères des troubles liés à la consommation d'alcool (Van Skike et al., 2016).

Les données animales montrent également que l'administration chronique de nicotine augmente l'auto-administration d'alcool (Clark et al., 2001; Lê et al., 1998). La co exposition à

l'alcool et à la nicotine chez le rat augmente l'escalade de la consommation d'alcool par rapport à une exposition à l'alcool seul (Leão et al., 2015). Elle augmente également la consommation compulsive d'alcool, et ces effets sont bloqués par la mécamylamine (Leão et al., 2015).

#### b. Interactions entre nAChRs et alcool

La nicotine se lie avec une forte affinité aux nAChRs et provoque un changement conformationnel dans le récepteur qui induit un état ouvert ou « actif », permettant le flux de cations selon leurs gradients électrochimiques à travers le canal (Changeux & Edelstein, 1998). L'alcool module également l'activité des nAChRs, non pas en tant qu'agoniste direct, mais plutôt en tant que **modulateur allostérique** (Abdel-Magid, 2015), stabilisant probablement des conformations de canaux spécifiques (Forman & Zhou, 1999; Hendrickson et al., 2013; Zuo et al., 2004). Comme pour la nicotine, les effets de l'alcool sur les nAChRs dépendent de la composition en sous-unités du récepteur et de la dose d'alcool testée. Par exemple, l'alcool à faible dose agit comme un modulateur allostérique positif des récepteurs  $\alpha 6^*nAChRs$ , mais pas des  $\alpha 3\beta 4^*$ ,  $\alpha 4\beta 2^*$  ou  $\alpha 7^*nAChRs$  (Gao et al., 2019). Une même concentration d'alcool potentialise les récepteurs  $\alpha 4\beta 2^*nAChRs$ , mais inhibe les  $\alpha 3\beta 2^*nAChRs$  (Zuo et al., 2002).

La désensibilisation rapide des nAChRs se produit en présence de nicotine et ce processus jouerait un rôle important dans la modulation des niveaux de DA dans le système mésolimbique. Une accumulation de données suggèrent que l'alcool modifie l'équilibre entre l'activation et la désensibilisation des nAChRs causé par la nicotine, ce qui pourrait induire des adaptations contribuant à la forte incidence de leur co-utilisation. Aussi, l'administration systémique d'alcool et de nicotine semble avoir un effet additif sur la libération de DA dans le NAc (Tizabi et al., 2007). L'infusion intra-ATV de nicotine combinée à de l'alcool systémique potentialise la libération accumbale de DA. Une étude plus récente suggère que l'effet additif de l'alcool et de la nicotine sur les niveaux de DA implique des nAChRs contenant les sous-unités  $\beta 2$  et  $\beta 4$  (Tolu et al., 2017).

#### c. Impact des nAChRs sur la consommation d'alcool

Aujourd'hui il est largement reconnu que les nAChRs du système dopaminergique mésocorticolimbique sont impliqués dans la régulation du comportement de consommation d'alcool (Feduccia et al., 2012; G. F. Koob & Volkow, 2010, 2016; Miller & Kamens, 2020; Rahman et al., 2015, 2016; Volkow et al., 2019; Volkow & Baler, 2014; Wise & Koob, 2014).

Leur implication a été démontrée à l'aide d'antagonistes dans différents modèles. Après une consommation volontaire d'alcool, la concentration extracellulaire d'ACh dans l'ATV, puis la concentration extracellulaire de DA dans le NAc, sont augmentées chez le rat (Larsson et al., 2002). Le blocage des nAChRs de l'ATV (mais pas du NAc) par la mécamylamine, a pour effet de réduire la consommation d'alcool et de bloquer l'activation des neurones dopaminergiques ainsi que la libération de DA induite par l'alcool dans le NAc. Chez la souris, un traitement systémique à la mécamylamine réduit l'auto-administration volontaire d'alcool dans les paradigmes de 2BC (Farook et al., 2009), de DID (Hendrickson et al., 2009) et de PPC (Bhutada et al., 2012). La mécamylamine semble bloquer l'activation des neurones dopaminergiques de l'ATV (Hendrickson et al., 2009; L. Liu et al., 2013). Aussi, les personnes recevant de la mécamylamine expérimentent, d'après leurs témoignages, une réduction des effets plaisants des boissons alcoolisées (Chi & de Wit, 2003). La varénicline, agoniste partiel des  $\alpha 4\beta 2$ \*nAChRs (mais aussi des  $\alpha 3/\alpha 6\beta 2$ \*,  $\alpha 7$ \*,  $\alpha 3\beta 4$ \*nAChRs) utilisée comme thérapie pharmacologique pour la cessation tabagique, réduit également la consommation d'alcool chez les gros fumeurs. Chez les rats, la varénicline supprime l'auto-administration d'alcool induite par la nicotine (Bito-Onon et al., 2011). De façon similaire, la cytisine dont est dérivée la varénicline, réduit la consommation excessive d'alcool et sa préférence chez le rat et la souris (Bell et al., 2009; Hendrickson et al., 2009; Sajja & Rahman, 2011) et réduit également la préférence et l'escalade de la consommation d'alcool induites par une exposition chronique à la nicotine (Sajja & Rahman, 2012).

#### d. Impact des nAChRs sur le sevrage alcoolique

Toujours chez le rongeur, un prétraitement à la varénicline ou à la cytisine réduit le comportement de rechute à l'alcool après plusieurs cycles d'abstinences forcées (Sajja & Rahman, 2013) et atténue la rechute alcoolique induite par un indice (Wouda et al., 2011). Une autre étude indique plus précisément que les nAChRs du circuit MHb-IPN sont impliqués dans le sevrage alcoolique. À la suite d'un traitement chronique à l'alcool, le blocage des nAChRs de la MHb ou de l'IPN par l'injection locale de mécamylamine induit des symptômes de sevrage chez la souris (Perez et al., 2015). Cette étude a également révélé que la durée et la gravité du sevrage étaient significativement augmentées après la co exposition à l'alcool et à la nicotine par rapport à l'exposition individuelle à l'alcool ou à la nicotine (Perez et al., 2015).

## 2. Implications de gènes codant les nAChRs dans les addictions à l'alcool et à la nicotine

### a. Polymorphismes d'un seul nucléotide du gène CHRNA5

Le gène CHRNA5 codant pour la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR fait partie du cluster de gènes CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 (codant également pour les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 4$  ; **Figure 17**) sur la région q25 du chromosome 15 notée 15q25 (Boulter et al., 1990). Des polymorphismes dans ce cluster de gènes, et dans le gène CHRNA5 spécifiquement, ont été associés à la vulnérabilité aux addictions à l'alcool et à la nicotine (Olfson et al., 2016; J. C. Wang et al., 2009) et à une initiation précoce de la consommation d'alcool et de nicotine (I. Schlaepfer et al., 2008).

### b. Le $\alpha 5$ -SNP D398N rs16969968 du gène CHRNA5

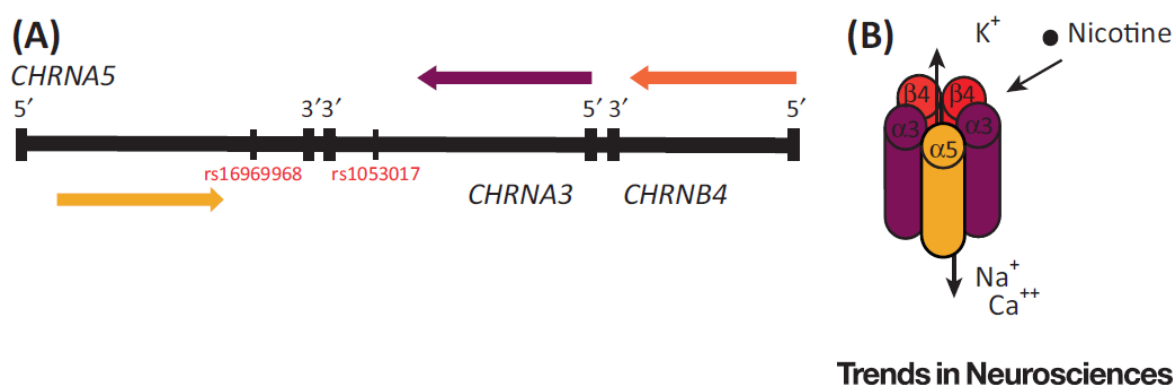
Parmi les polymorphismes du gène CHRNA5 étudiés dans la vulnérabilité à l'addiction, le  **$\alpha 5$ -SNP D398N** aussi appelé **rs16969968** (**Figure 17**), est actuellement le plus documenté. Des études d'associations pangénomiques ont mis en évidence son association avec le développement d'un tabagisme lourd (Berrettini et al., 2008; Saccone et al., 2007) et la survenue précoce du comportement tabagique (Weiss et al., 2008). En revanche, les différentes études examinant l'influence du  $\alpha 5$ -SNP sur les TUALs présentent des conclusions divergentes (Brynildsen & Blendy, 2021; Chen et al., 2009; Choquet et al., 2013; Joslyn et al., 2008; J. C. Wang et al., 2009). Au moins une étude a identifié une association entre le  $\alpha 5$ -SNP et des symptômes du TUAL (Chen et al., 2009), tandis que d'autres n'ont trouvé aucune association (23andMe Research Team et al., 2019; Hällfors et al., 2013; Sherva et al., 2010; J. C. Wang et al., 2009). De plus, l'une des plus grandes études pangénomiques sur les comportements de consommation de nicotine et d'alcool a rapporté une association entre le  $\alpha 5$ -SNP et le tabagisme (cigarettes par jour), mais pas avec la consommation d'alcool (mesurée en boissons par semaine) (23andMe Research Team et al., 2019).

Le  **$\alpha 5$ -SNP rs16969968** est le **polymorphisme d'un seul nucléotide** (SNP) dans le gène **CHRNA5**, qui est une **mutation faux-sens** (non synonyme = qui modifie la séquence protéique) entraînant la substitution de l'aspartate (D) par une asparagine (N) au 398ème acide aminé (**D398N**) de la protéine  $\alpha 5$  résultante ( **$\alpha 5^{D398N}$** ). La présence d'une seule copie allélique du variant D398N augmente le risque de trouble de l'usage du tabac d'environ 30% et fait plus que **doubler le risque** chez les individus portant les deux allèles à risque (Berrettini et al., 2008; Bierut et al., 2008; Kuryatov et al., 2011; J. C. Wang et al., 2009; Ware et al., 2012). Les



individus non porteurs de l'allèle à risque ont tendance à réduire le volume de fumée inhalée par bouffée quand la concentration en nicotine contenue dans la cigarette est augmentée ; mais les porteurs du variant à risque D398N ne le font pas (MacQueen et al., 2014). Ces derniers fument une cigarette de plus et présentent une augmentation moyenne de 138nmol/L dans les niveaux de nicotine pour chaque copie de l'allèle mineur D398N qu'ils portent (Munafò et al., 2012).

La particularité de ce  **$\alpha 5$ -SNP D398N** est sa fréquence particulièrement élevée, estimée à 28% dans la population mondiale et à 35% dans les populations occidentales (Bierut et al., 2008). Il n'a à l'inverse pas ou que très peu été détecté dans les populations africaines, d'Asie de l'est ou américaines natives (Bierut et al., 2008). Et de façon intéressante, les afro-américains ont une plus faible prévalence à l'addiction à la nicotine que les américains européens (Breslau et al., 2001).



Trends in Neurosciences

**Figure 17.** Cluster contenant le gène **CHRNA5** codant pour la sous-unité  **$\alpha 5$ -nAChR**. **(A)** Illustration simplifiée du cluster humain de gènes **CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4** codant pour les sous-unités  **$\alpha 5$ ,  $\alpha 3$  et  $\beta 4$**  du nAChR. Le  **$\alpha 5$ -SNP D398N** (ou mutation **rs16969968**) est indiqué en rouge sur le gène **CHRNA5**. **(B)** Récepteur hétéropentamérique  **$\alpha 5\alpha 3\beta 4^*$ nAChR**. **Abréviations:**  **$K^+$** , ion potassique;  **$Na^+$** , ion sodique;  **$Ca^{2+}$** , ion calcique.

### 3. Récepteurs **$\alpha 5^*$ nAChRs** et comportements associés la consommation d'alcool

#### a. Localisation de la sous-unité $\alpha 5$

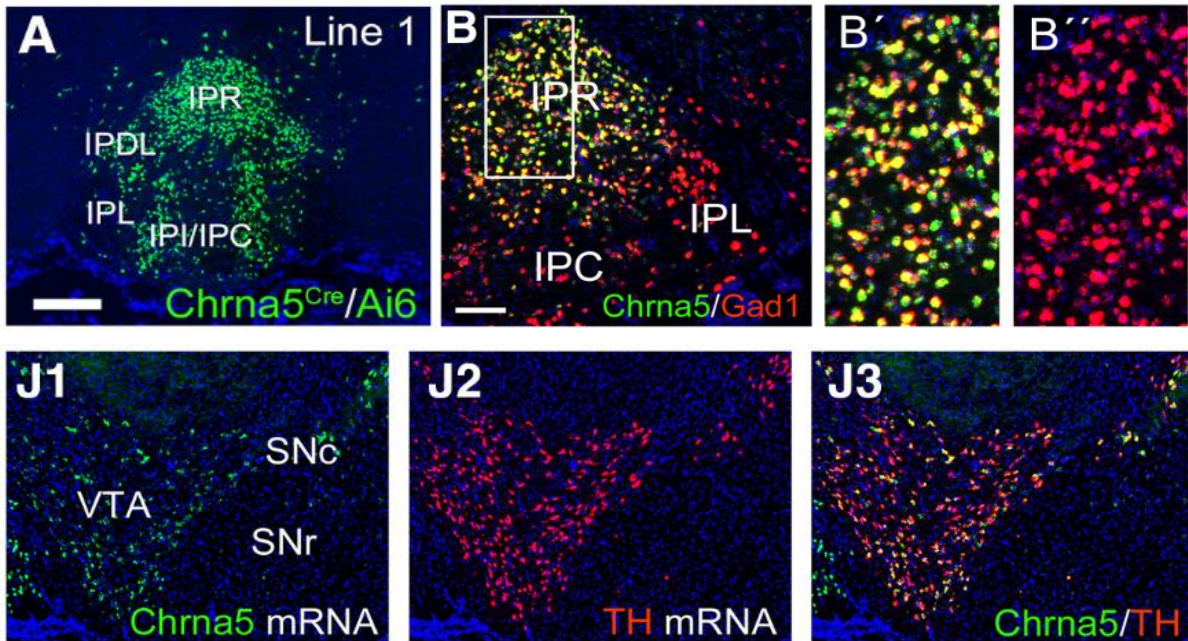
La sous-unité  **$\alpha 5$**  fait partie des sous-unités les moins exprimées au niveau du **SNC** et sa plus forte expression est retrouvée dans la **voie MHb-IPN**. Elle est majoritairement exprimée dans les **neurones GABAergiques de l'IPN**, et principalement au niveau de son sous-noyau **l'IPR (Figure 18A-B)** dans lequel plus de 95% des neurones GABAergiques expriment la sous-unité  **$\alpha 5$**  (Hsu et al., 2013; Morton et al., 2018). Aucune autre région du **SNC** n'a une

densité aussi élevée de nAChRs que la voie MHb-IPN, et aucune autre région n'exprime autant de récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs que l'IPN. Par exemple, l'IPN d'un rat adolescent ou adulte contient  $\sim 350$  fmol de protéine  $\alpha 5$  par mg de protéine totale (Forget et al., 2018; S. R. Grady et al., 2009), et même si la quantité rapportée de récepteurs contenant  $\alpha 5$  diffère d'une étude à l'autre, allant de 23 fmol/mg de protéine (Forget et al., 2018) à 200 fmol/mg de protéine (S. R. Grady et al., 2009), les comparaisons directes entre diverses régions cérébrales confirment que l'IPN de rats et de souris est particulièrement enrichi en  $\alpha 5^*$ nAChRs (Beiranvand et al., 2014; Forget et al., 2018; Xanthos et al., 2015). Dans l'IPN,  $\alpha 5$ -nAChR est associée de manière prédominante avec les sous-unités  **$\alpha 4\beta 2$**  (Beiranvand et al., 2014; S. R. Grady et al., 2009; Morton et al., 2018) alors que dans la MHb elle est associée avec les sous-unités  **$\alpha 3\beta 4$**  (Scholze & Huck, 2020).

Les  $\alpha 5^*$ nAChRs sont aussi fortement exprimés dans l'ATV (**Figure 18J1-3**), à 80% dans les **neurones dopaminergiques** et seulement 20% dans les neurones GABAergiques de l'ATV (Chatterjee et al., 2013; Klink et al., 2001), et plus densément dans la **partie postérieure de l'ATV** (Zhao-Shea et al., 2011b). Dans les neurones dopaminergiques de l'ATV, la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est généralement associée aux sous-unités  **$\alpha 4$**  et  **$\beta 2$**  (Champtiaux et al., 2003).

Mais la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est également présente en quantité moindre dans les interneurones GABAergiques des couches superficielles (I/III) et profondes (VI) du **CPF** (où elle est associée avec entre 11-16% des nAChRs (Bailey et al., 2010; Koukouli et al., 2017; Wada & McKinnon, 1990; Winzer-Serhan & Leslie, 2005), différents types neuronaux de l'**HPC** incluant les interneurones GABA et les cellules pyramidales (associée à 37% des nAChRs ; (Hsu et al., 2013; Mao et al., 2007), dans le **striatum** (associée à 24% des nAChRs ; (Leggio et al., 2010; Mao et al., 2007; Zoli et al., 2002) le **tubercule olfactif**, l'**hypothalamus**, le **thalamus** et le **colliculus inférieur** (Brown et al., 2007; Forget et al., 2018; Xanthos et al., 2015).

La sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est aussi exprimée au niveau du SNP, notamment au niveau des **ganglions autonomes** où elle est co-assemblée avec les sous-unités  **$\alpha 3$**  et  **$\beta 4$** . Elle se trouve aussi dans un grand nombre de cellules non neurales comme les **cellules bronchiales** et **épithéliales**, et les cellules des **glandes surrénales** (humaines et murines: Hone et al., 2015; Wu et al., 2010) impliquées dans la sécrétion de cortisol ou corticostérone qualifié(e) comme l'« hormone du stress ».



**Figure 18.** Expression de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans les neurones GABAergiques de l'IPN et dopaminergiques de l'ATV. (A-B) Sections coronales de cerveau de souris (-3.5 mm du bregma) montrant la co localisation (fluorescence jaune) de la sous-unité  $\alpha 5$  (fluorescence verte) avec les neurones GABAergiques (fluorescence rouge) de l'IPN. Photographies extraites de (Hsu et al., 2013; Morton et al., 2018). (J1-J3) Sections coronales de cerveau de souris (-3.0 mm du bregma) montrant la co localisation (fluorescence jaune) de la sous-unité  $\alpha 5$  (fluorescence verte) avec les neurones dopaminergiques (fluorescence rouge) de l'ATV. Figure extraite de (Morton et al., 2018). **Abréviations:** *Gad1*, glutamate décarboxylase 1; *IPC*, noyau central de l'IPN; *IPDL*, noyau dorsolatéral de l'IPN; *IPI*, noyau intermédiaire de l'IPN; *IPL*, noyau latéral de l'IPN; *IPN*, noyau interpédonculaire; *IPR*, noyau rostral de l'IPN; *SNc*, substance noire pars compacta; *SNr*, substance noire pars reticulata; *TH*, tyrosine hydroxylase; *VTA*, aire tegmentale ventrale.

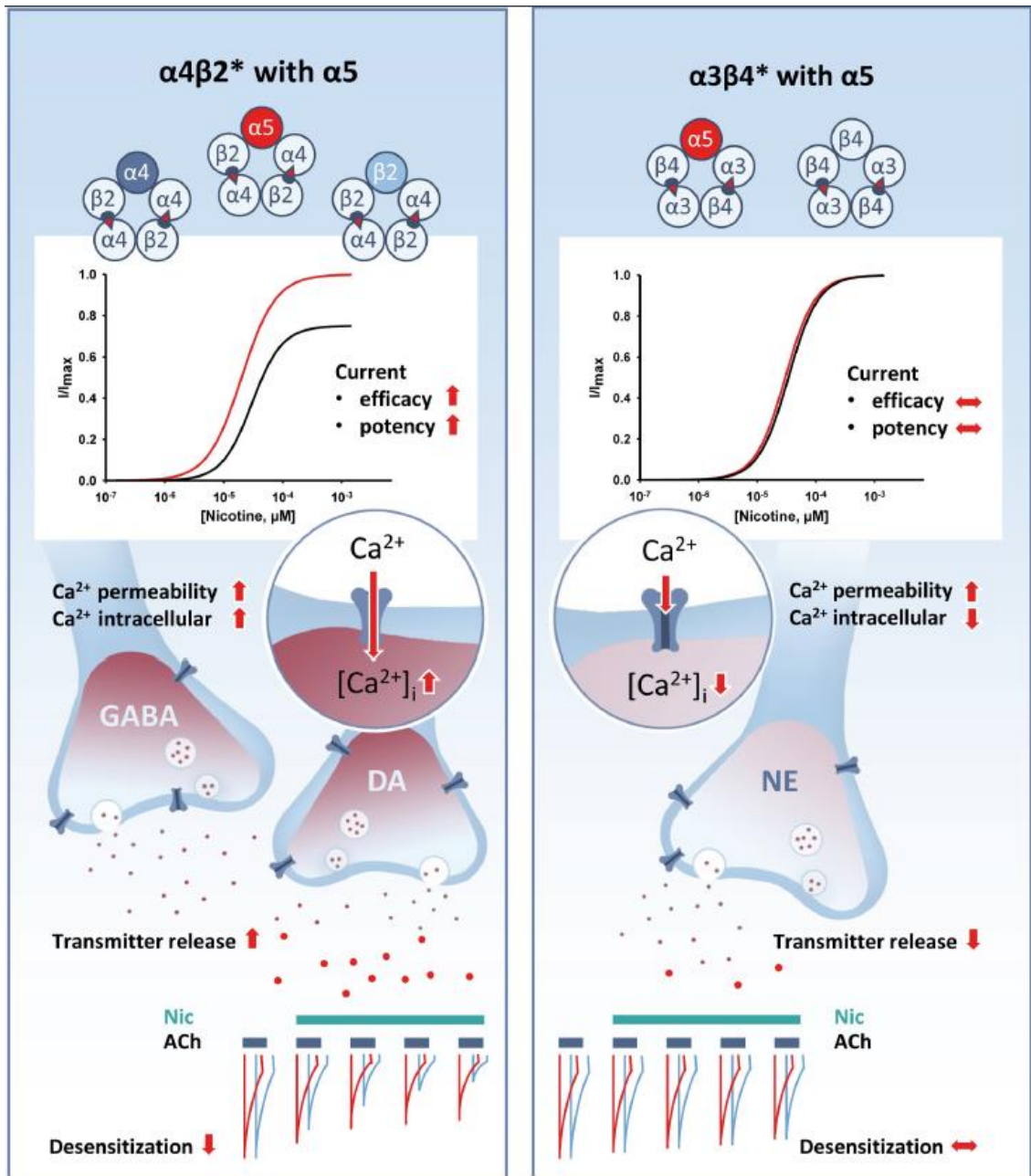
#### b. Structure et fonction de la sous-unité $\alpha 5$

La sous-unité  $\alpha 5$  est qualifiée d'« **accessoire** » car elle ne peut pas former de récepteurs fonctionnels sans se joindre avec les autres sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  essentielles des nAChRs (Ramirez-Latorre et al., 1996; Taly et al., 2009), et ne contribue pas à la formation des sites de liaison de l'ACh. Ainsi  $\alpha 5$ -nAChR forme des pentamères avec des sous-unités  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ , ou  $\alpha 3\beta 2$ , et ensembles ceux-ci constituent 10 à 37% de tous les nAChRs (Baddick & Marks, 2011; Kuryatov et al., 2008). Néanmoins, cette sous-unité accessoire contribue à des sites de liaison allostériques potentiels et à des propriétés distinctes conférées par la grande boucle cytoplasmique entre les troisième et quatrième domaines transmembranaires (c'est-à-dire la boucle M3-M4). Une accumulation de données issues d'études à la fois *in vitro* et *in vivo* et rassemblées dans la revue de (Scholze & Huck, 2020), démontre que l'incorporation de

la sous-unité  $\alpha 5$  dans un récepteur de type  $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$ nAChR améliore sa sensibilité et son efficacité, mais a en revanche des effets mineurs sur les propriétés du récepteur  $\alpha 3\beta 4\alpha 5^*$ nAChR (**Figure 19**).

La présence de  $\alpha 5$  dans un  $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$ nAChR augmente en effet la **perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$** , décale la **courbe dose-réponse des courants induits par un agoniste nicotinique** (ACh ou nicotine) vers la gauche, **augmente l'amplitude des courants** induits et **protège partiellement contre la désensibilisation** (Forget et al., 2018; Jackson et al., 2010; X. Jin et al., 2014; Koukouli et al., 2017; Kuryatov et al., 2008; Morel et al., 2014a; Sciacaluga et al., 2015; Tapia et al., 2007). La sous-unité  $\alpha 5$  incorporée dans les  $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$ nAChRs améliore plus précisément les courants induits par la nicotine dans les **neurones dopaminergiques de l'ATV** (Chatterjee et al., 2013) et **GABAergiques de l'IPR** (Morton et al., 2018), mais pas dans les neurones de la MHbV, et améliore également les courants induits par l'ACh dans les **neurones pyramidaux de la couche corticale VI** (Bailey et al., 2010).

En comparaison avec la présence d'une sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR sauvage, l'incorporation d'une **sous-unité  $\alpha 5^{\text{D398N}}$ -nAChR (porteuse de la mutation rs16969968)** dans un  $\alpha 4\beta 2\alpha 5^{\text{D398N}}$ \*nAChR, diminue la réponse induite par un agoniste nicotinique et donc la capacité des nAChRs contenant  $\alpha 5^{\text{D398N}}$  à transmettre de manière optimale la signalisation cholinergique. Elle diminue la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et augmente la désensibilisation induite par l'ACh sans affecter le niveau d'expression du récepteur (Baddick & Marks, 2011; Bierut et al., 2008; Brown et al., 2007; Kuryatov et al., 2011; Oni et al., 2016; Prevost et al., 2021; Salas et al., 2003). Néanmoins, dans l'ATV, le CPF et l'IPN, des données suggèrent que la sous-unité  $\alpha 5^{\text{D398N}}$  peut remplacer fonctionnellement, de manière partielle seulement, la sous-unité  $\alpha 5$  sauvage (Forget et al., 2018; Koukouli et al., 2017; Morel et al., 2014a; Sciacaluga et al., 2015).



**Figure 19. Propriétés conférées par la sous-unité  $\alpha 5$  au sein du nAChR.** Ce graphique extrait de (Scholze & Huck, 2020) résume les principaux effets de la sous-unité  $\alpha 5$  sur diverses propriétés du récepteur  $\alpha 4\beta 2^*$  ou  $\alpha 3\beta 4^*$ nAChR. Les flèches rouges indiquent le sens des modifications apportées par la présence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR. **Gauche** : l'ajout de la sous-unité  $\alpha 5$  aux récepteurs  $\alpha 4\beta 2^*$ nAChRs augmente l'efficacité du ligand (en haut), augmente la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et la libération du neurotransmetteur (au milieu) et diminue la désensibilisation des récepteurs (en bas). **Droite** : en revanche, l'ajout de la sous-unité  $\alpha 5$  aux récepteurs  $\alpha 3\beta 4^*$ nAChRs n'a aucun effet sur l'efficacité (en haut), augmente la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  tout en diminuant la libération intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et extracellulaire de neurotransmetteurs (au milieu), et n'a pas d'effet significatif sur la désensibilisation des récepteurs (en bas). **Abréviations**: ACh, acétylcholine;  $\text{Ca}^{2+}$ , ion calcique; DA, dopamine; NE, noradrénaline; Nic, nicotine.

Concernant les  $\alpha 3\beta 4\alpha 5^*$ nAChRs en revanche, la présence de  **$\alpha 5$ -nAChR n'améliore pas, voir diminue l'efficacité de la réponse induite par un agoniste nicotinique** (David et al., 2010; Frahm et al., 2011; Fucile et al., 1997; Groot-Kormelink et al., s. d.; Nelson et al., s. d.; C. Ray et al., 2017; Stokes & Papke, 2012). Sa présence augmente la perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et de façon mineur le niveau de désensibilisation (Ciuraszkiewicz et al., 2013; Fischer et al., 2005; Gerzanich et al., 1998; Groot-Kormelink et al., s. d.; Simeone et al., 2019) mais semble diminuer la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par un agoniste nicotinique sans affecter de manière significative le niveau d'expression du récepteur (Tammimäki et al., 2012).

Les propriétés fonctionnelles des récepteurs  $\alpha 3\beta 4\alpha 5^{\text{D398N}}$ \*nAChRs sont similaires à celles des  $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$ nAChRs en terme de sensibilité et d'efficacité (George et al., 2012; Kuryatov et al., 2011; Stokes & Papke, 2012). Néanmoins, la présence de la sous-unité mutée  $\alpha 5^{\text{D398N}}$  dans les  $\alpha 3\beta 4\alpha 5^{\text{D398N}}$ \*nAChRs semble modifier les effets d'inhibiteurs spécifiques de kinases (C. Ray et al., 2017).

### c. L'auto-administration de nicotine

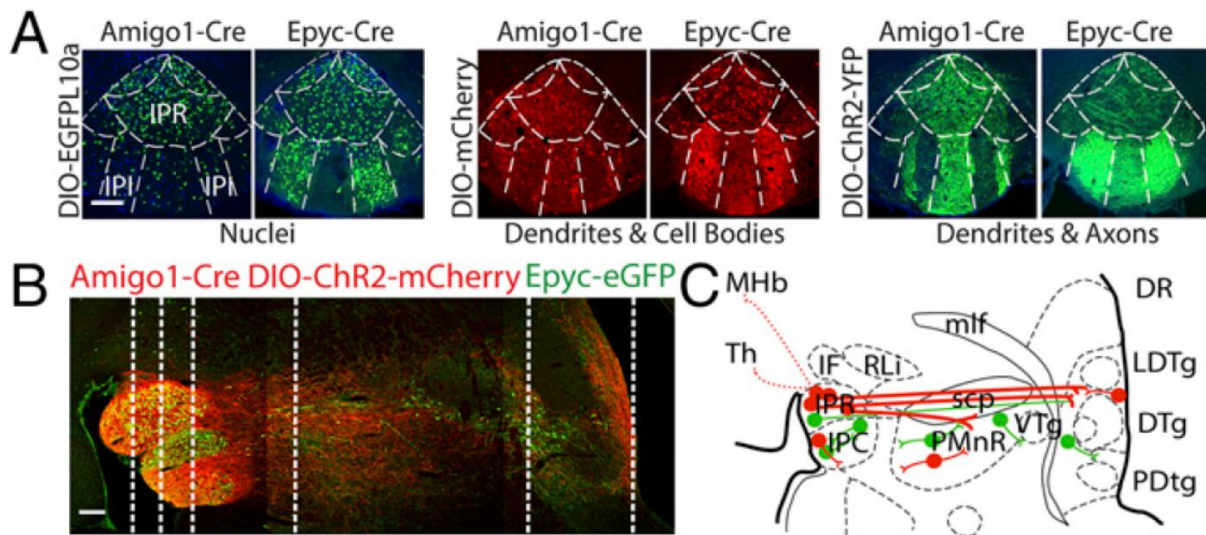
Les études menées sur les souris transgéniques  $\alpha 5$  knock-out ( $\alpha 5\text{KO}$ ) indiquent que l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$  entraîne une préférence de place conditionnée pour des concentrations élevées de nicotine qui ne sont pas récompensantes pour des souris WT (Jackson et al., 2010) et augmente l'auto-administration de solutions fortement concentrées en nicotine (Fowler et al., 2011). De manière intéressante, ce phénotype peut être corrigé chez les souris  $\alpha 5\text{KO}$  par la réexpression virale de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans la voie habénulo-interpédonculaire (Fowler et al., 2011). Conformément aux conclusions de (Fowler et al., 2011), une étude distincte a révélé que l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR augmente non seulement l'auto-administration de solutions de nicotine fortement concentrées, mais augmente également la concentration optimale nécessaire au développement d'une escalade de la consommation de nicotine (Morel et al., 2014a). Des concentrations plus élevées de nicotine sont également nécessaires pour activer les neurones dopaminergiques de l'ATV. A nouveau, le phénotype altéré d'auto-administration de nicotine peut être corrigé par la réexpression virale de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (Morel et al., 2014a).

L'absence de la sous-unité  $\alpha 5$  semble aussi diminuer les signes somatiques du sevrage nicotinique et l'hyperalgésie associée, sans affecter le niveau d'anxiété (Jackson et al., 2010; Salas et al., 2009).

Similairement aux rongeurs dépourvus de la sous-unité  $\alpha 5$ , les rats porteurs du  $\alpha 5$ -SNP et donc de récepteurs mutés  $\alpha 5^{D398N}$ \*nAChRs, consomment significativement plus de nicotine que les rats WT lorsque les solutions les plus concentrées sont proposées et présentent également un « point de rupture » supérieur pour la solution la plus fortement concentrée en nicotine, révélant une plus grande motivation pour la prise de nicotine (Forget et al., 2018). Ces derniers présentent également une plus forte réinstauration du comportement de recherche de nicotine après extinction, en réponse à la nicotine seule ou à la nicotine et au stimulus associé (Forget et al., 2018). Cette plus forte réinstauration induite par la nicotine chez les rats porteurs de  $\alpha 5^{D398N}$ \*nAChRs est associée à une plus forte activité neuronale dans l'hypothalamus latéral et à une plus faible activité neuronale dans l'IPN (Forget et al., 2018).

Ables et al., 2017 ont identifié deux sous-populations de neurones GABAergiques de l'IPN exprimant la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR : les neurones  **$\alpha 5$ -Amigo1** et  **$\alpha 5$ -Epyc** (Ables et al., 2017). Ces neurones sont caractérisés par l'expression de somatostatine (SST) et d'oxyde nitrique synthase (NOS1), beaucoup plus dense dans les  **$\alpha 5$ -Amigo1** que dans les  **$\alpha 5$ -Epyc**. Ces deux populations ont une distribution complémentaire (**Figure 20A**), et reçoivent toutes deux leurs principales afférences de la MHb mais l'une projette localement ( $\alpha 5$ -Epyc) tandis que l'autre ( $\alpha 5$ -Amigo1) envoie de longues projections en direction du raphé, du LDTg et de la MHb (**Figure 20B-C**). Ces chercheurs ont démontré que l'inhibition spécifique des neurones  **$\alpha 5$ -Amigo1**, mais pas celle des neurones  $\alpha 5$ -Epyc, supprime la préférence de place pour la nicotine. L'ensemble de leurs données suggère qu'en réponse à une exposition chronique à la nicotine, les neurones  **$\alpha 5$ -Amigo1** de l'IPN libèrent SST et NOS1 dans la MHb (exprimant les récepteurs correspondant) afin de fournir un rétrocontrôle inhibiteur du circuit MHb-IPN et d'augmenter les propriétés motivationnelles de la nicotine.

Il est important de souligner que toutes les données comportementales présentées dans cette partie ont été obtenues à partir de rats et souris mâles, aucune femelle n'a été testée.



**Figure 20.**  $\alpha 5$ -Amigo1 et  $\alpha 5$ -Epyc : deux sous-populations de neurones GABAergiques de l'IPN exprimant la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR. (A) Sections coronales de cerveaux de souris montrant la localisation des neurones  $\alpha 5$ -Amigo1 et  $\alpha 5$ -Epyc dans les différents sous-noyaux de l'IPN. Les cellules  $\alpha 5$ -Amigo1 et  $\alpha 5$ -Epyc sont présentes dans le sous-noyau rostral (IPR), mais les  $\alpha 5$ -Amigo1 sont largement exclus des sous-noyaux intermédiaires (IPI), où les cellules  $\alpha 5$ -Epyc sont densément distribuées (Barre d'échelle : 100  $\mu$ m). (B) Section sagittale montrant le traçage antérograde des projections des neurones  $\alpha 5$ -Amigo1 (rouge) de l'IPN vers les structures caudales par rapport aux projections majoritairement locales des neurones  $\alpha 5$ -Epyc (vert) (Barre d'échelle : 200  $\mu$ m). (C) Représentation schématique des projections des  $\alpha 5$ -Amigo1 (rouge) et des  $\alpha 5$ -Epyc (vert). Figure extraite de (Ables et al., 2017). **Abréviations:** DR, noyau dorsal du raphé; DTg, noyau tegmental dorsal; IF, noyau interfasciculaire; IPC, noyau central de l'IPN; IPI, noyau intermédiaire de l'IPN; IPN, noyau interpedonculaire; IPR, noyau rostral de l'IPN; LDTg, noyau tegmental latéro-dorsal; MHb, habénula médiane; mlf, fasciculus longitudinal médian; PDtg, noyau tegmental postéro-dorsal; PMnR, noyau paramédian du raphé; RLi, noyau linéaire rostral du raphé; scp, pédoncule cérébelleux supérieur; Th, thalamus.

#### d. L'auto-administration d'alcool

Les études menées sur les souris transgéniques  $\alpha 5$ KO indiquent que l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR potentialise l'ataxie, l'hypothermie, la sédation et l'anxiolyse induites par l'alcool sans affecter le métabolisme de l'alcool (A. Dawson et al., 2018; Santos et al., 2013). Concernant le comportement d'auto-administration d'alcool, les données obtenues à partir de souris  $\alpha 5$ KO indiquent que la délétion de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR n'affecte pas la consommation de solutions d'alcool aux concentrations comprises entre 5 et 30% dans le DID (A. Dawson et al., 2018; Santos et al., 2013), mais réduit la PPC pour l'alcool et diminue également la consommation d'alcool dans le DID après un stress contention (A. Dawson et al., 2018; Santos et al., 2013). Ces données vont plutôt à l'encontre de précédentes révélant une



réduction de l'auto-administration d'alcool à 3-20% dans le 2BC chez des souris surexprimant les récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  (sans changement concernant les effets aigus de l'alcool ou de son sevrage; Gallego et al., 2012); et des nouvelles révélant une augmentation de l'auto-administration d'alcool à 20% dans le 2BC chez des rats porteurs de récepteurs mutés  $\alpha 5^{D398N}nAChRs$  (Besson et al., 2019). Ces rats présentent également une plus forte motivation pour l'alcool à 12% dans le modèle d'auto-administration opérante et une plus forte réinstauration de la recherche d'alcool après extinction ; cette dernière étant associée à une augmentation de l'activation de l'insula d'après le marqueur d'activité c-Fos (Besson et al., 2019). A nouveau, toutes les études présentées dans cette partie ont été menées chez des mâles ; à ce jour, aucune de ces études n'a été réalisée chez les femelles.

Des données supplémentaires indiquent que chez des rats mâles et femelles, une exposition à l'alcool durant l'adolescence résulte en une réduction persistante du nombre de récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  dans la partie postérieure de l'ATV (Hauser et al., 2019). De façon similaire, l'exposition de cellules souches humaines à de faibles concentrations d'alcool réduit le niveau d'expression de *Chrna5* lors des phases précoces du développement humain (Krishnamoorthy et al., 2010).

#### e. Les circuits attentionnels

Comme résumé en **Figure 21**, la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$  est également exprimée dans la couche corticale VI (Wada & McKinnon, 1990) et dans les interneurons des couches II/III du CPF (Koukouli et al., 2017), où la libération d'ACh joue un rôle central dans le contrôle de l'attention (Gritton et al., 2016). Plusieurs études précliniques soutiennent que ces  $\alpha 5^*nAChRs$  jouent un rôle majeur dans la régulation cholinergique des circuits et fonctions du CPF. Les souris  $\alpha 5KO$  avec une délétion constitutive de la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$  (à l'échelle de l'organisme entier) ou un knock-down (KD) sélectif des récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  dans le CPF uniquement, présentent toutes deux une diminution de la régulation nicotinique cholinergique de l'activité neuronale du CPF, une **désensibilisation exacerbée des nAChRs**, ainsi que des **déficits attentionnels** dans des tâches complexes (Bailey et al., 2010; S. R. Grady et al., 2012; Howe et al., 2018; Proulx et al., 2014; Tian et al., 2011). Plus récemment, une étude optogénétique menée sur des souris mâles et femelles a permis de clarifier d'avantage l'importance de la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$  dans les performances attentionnelles en cas de conditions exigeantes : celle-ci assure des réponses cholinergiques rapides dans le CPF et protège ces réponses de la désensibilisation (Venkatesan & Lambe, 2020).

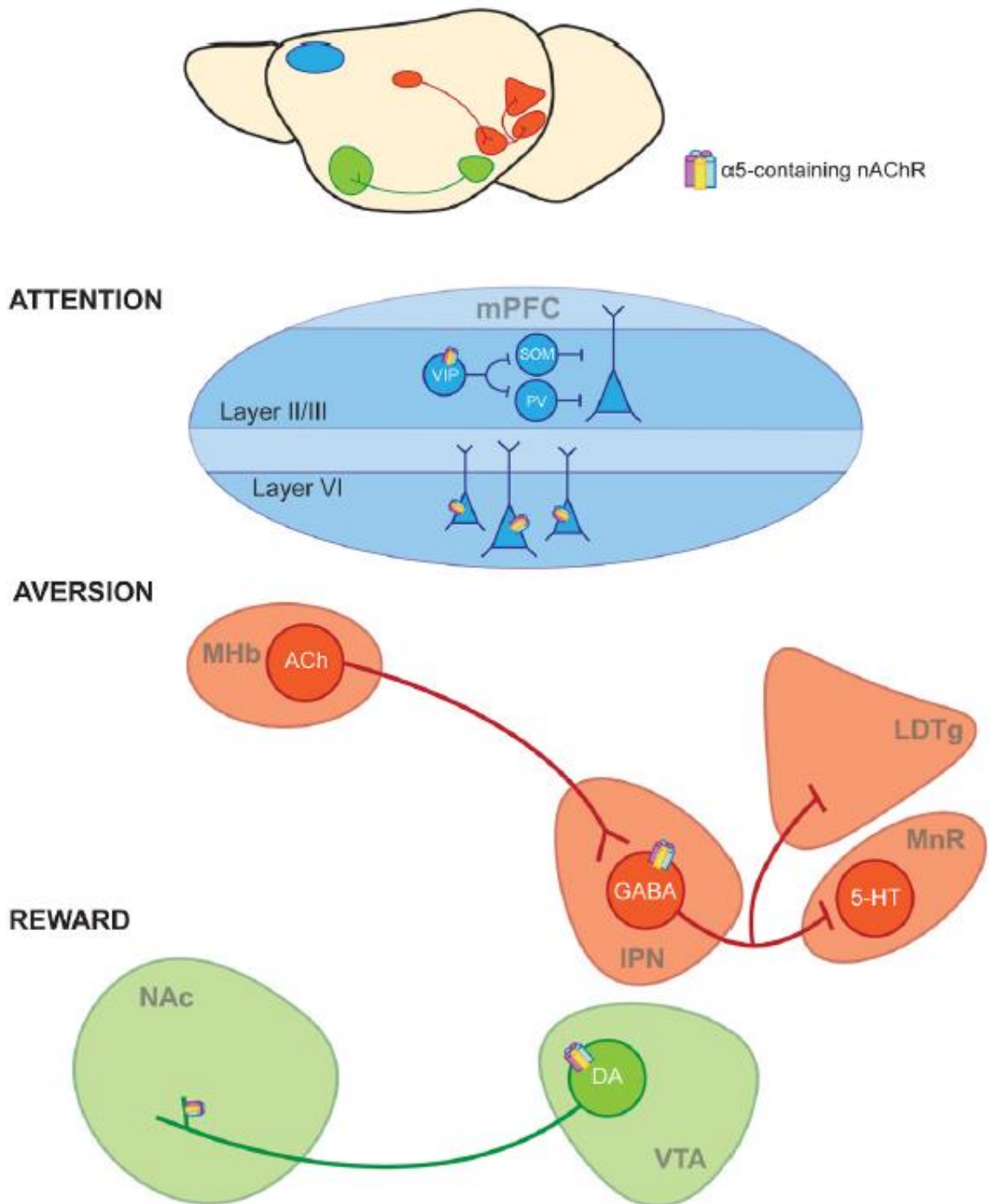
Koukouli et coll., 2017 se sont également intéressés à l'impact du  $\alpha 5$ -SNP D398N et ont démontré que les souris mâles exprimant des  $\alpha 5^{\text{D398N}}$ \*nAChRs ( $\alpha 5\text{KI}$ ) présentent des déficits comportementaux sensorimoteurs dans la tâche d'inhibition par le prépulse ou IPP. Cette tâche mesure la capacité d'un animal à inhiber son réflexe de sursaut en réponse à une tonalité acoustique (pulse), lorsque la tonalité est précédée d'un stimulus de moindre intensité (prépulse). Les souris  $\alpha 5\text{KI}$  exprimant le  $\alpha 5$ -SNP D398N présentent une diminution de l'IPP par rapport à leur congénères WT. Ces chercheurs ont également enregistré chez les mâles  $\alpha 5\text{KI}$  et  $\alpha 5\text{KO}$ , un **plus faible niveau d'activité des neurones pyramidaux** des couches II/III à l'état de repos (Koukouli et al., 2017). Or dans les couches II/III du CPF, la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est uniquement exprimée au niveau des interneurons VIP (exprimant le peptide vasoactif intestinal) qui exercent un contrôle inhibiteur sur les interneurons SOM (exprimant la somatostatine) et PV (exprimant la parvalbumine), qui exercent eux-mêmes un contrôle inhibiteur sur les neurones pyramidaux. Les données de Koukouli et al., 2017, suggèrent que la diminution d'activité observée dans les couches II/III des souris  $\alpha 5\text{KI}$  et  $\alpha 5\text{KO}$  serait ainsi plus précisément causée par une diminution de l'activité des interneurons VIP, résultant en une augmentation de l'inhibition médiée par les interneurons SOM sur les neurones pyramidaux. Un traitement chronique à la nicotine semble corriger ce déficit d'activité chez les souris  $\alpha 5\text{KI}$ . De manière intéressante, chez l'humain, le  $\alpha 5$ -SNP est associé à une réduction de la connectivité fonctionnelle à l'état de repos dans le CPF (Hong et al., 2010) et à une augmentation du risque d'addiction à la nicotine (Saccone et al., 2007).

#### f. Les comportements associés au stress et à l'anxiété

D'après Gangitano et al., 2009, les  $\alpha 5$ \*nAChRs pourraient également être des médiateurs de la réponse anxieuse. A nouveau, cette fonction est cohérente avec leur profil d'expression, plus spécifiquement au niveau de l'IPN dont l'implication dans les phénotypes anxieux et dépressifs est soutenue par plusieurs études cliniques et précliniques (cf Partie I.III.3.c). En testant des souris  $\alpha 5\text{KO}$  mâles et femelles, Gangitano et al., 2009 ont découvert que l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR **diminue les comportements de type anxio-dépressifs** exprimés dans les tests de l'EPM et de suspension par la queue chez les femelles mais pas chez les mâles (Gangitano et al., 2009). De manière générale, les souris C57BL/6J sauvages mâles et femelles présentent des comportements similaires dans le test de l'EPM. Néanmoins, des fluctuations du comportement dans l'EPM semblent se produire chez les

souris femelles en fonction du cycle œstral (Galeeva & Tuohimaa, 2001; Lovick & Zangrossi, 2021) : Les femelles WT apparaissent plus anxieuses lors de la phase de l'œstrus (lorsque les niveaux plasmatiques de progestérone sont maximaux) que lors de la phase de diestrus (où les niveaux de progestérone sont les plus bas). Or aucune fluctuation du niveau d'anxiété dépendante du cycle n'a été trouvée chez les femelles  $\alpha 5$ KO (Gangitano et al., 2009). De façon intéressante, la progestérone augmente de manière dose dépendante l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans des cultures cellulaires, et l'injection de progestérone chez des souris femelles vasectomisées augmente spécifiquement l'expression d'ARNm  $\alpha 5$  dans l'IPN, mais pas dans le cortex ou l'HPC (Gangitano et al., 2009). La modulation progestérone-dépendante de l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans l'IPN pourrait donc contribuer aux fluctuations du niveau d'anxiété observées chez les femelles WT au cours du cycle œstral.

De plus, en condition basale et en accord avec leur phénotype hypoanxieux dans l'EPM, les femelles  $\alpha 5$ KO présentent également de plus **faibles niveaux de corticostérone plasmatique** ; la corticostérone (ou cortisol chez l'humain) est un indicateur du niveau de stress et est à ce titre, qualifiée d'« hormone du stress ». En effet, un stimulus stressant active l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), entraînant la libération du facteur de libération de la corticotropine (CRF) par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, ce qui active à son tour la synthèse et la libération d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse et résulte finalement en la libération de corticostérone (CORT) par les glandes surrénales (Dallman et al., 1994). De façon intéressante, l'expression de  $\alpha 5$ \*nAChRs a été mise en évidence dans les glandes surrénales (Hone et al., 2015; Wu et al., 2010) et ceux-ci pourraient intervenir dans la régulation de la libération de CORT.



**Figure 21.** La sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est exprimée dans plusieurs circuits impliqués dans l'addiction.

Les  $\alpha 5$ \*nAChRs sont exprimées dans les circuits neuronaux sous-tendant notamment l'attention (mPFC), l'aversion (MHb-IPN) et la récompense (ATV-NAc). Dans les couches II/III du mPFC, les  $\alpha 5$ \*nAChRs sont exprimés sur des interneurons VIP (exprimant le peptide vasoactif intestinal) qui inhibent les interneurons SOM (exprimant la somatostatine) et PV (exprimant la parvalbumine); ces interneurons inhibent à leur tour les cellules pyramidales. Dans la couche VI, des  $\alpha 5$ \*nAChRs sont exprimés sur les neurones pyramidaux. La sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR est également exprimée sur les

neurones GABAergiques de l'IPN qui est impliqué dans l'aversion via des projections inhibitrices sur : le noyau médian du raphé (MnR), le noyau tegmental latérodorsal (LDTg) et les corps cellulaires et terminaisons des neurones dopaminergiques de l'ATV projetant sur le NAc (impliqués dans le signal de la récompense). Figure extraite de (Brynildsen & Blendy, 2021). **Abréviations:** 5-HT, sérotonine; DA, dopamine; IPN, noyau interpedonculaire; LDTg, noyau tegmental latéro-dorsal; MHb, habénula médiane; MnR, noyau médian du raphé; mPFC, cortex préfrontal médian; NAc, noyau accumbens; nAChR, récepteur nicotinique cholinergique; PV, parvalbumine; SOM, somatostatine; VIP, peptide vasoactif intestinal; VTA, aire tegmentale ventrale.

---

Les récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs sont ainsi associés à des circuits et fonctions particulièrement impliqués dans les TUALs (Figure 21). Des études pangénomiques ont même identifié plusieurs mutations dans son gène comme facteurs de risque au développement de TUALs. Les  $\alpha 5^*$ nAChRs pourraient ainsi représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de cette neuropathologie qui reste malheureusement encore aujourd'hui, un défi majeur pour la santé de plus de 283 millions de personnes dans le monde. Néanmoins, les données cliniques comme précliniques de plus en plus nombreuses autour de leur implication dans les comportements associés à l'alcool sont étonnamment contradictoires. Les mécanismes par lesquels les  $\alpha 5^*$ nAChRs pourraient contribuer aux TUALs restent donc incertains. De plus, les recherches étant encore majoritairement menées sur des sujets masculins, on connaît très peu de choses concernant les interactions entre le sexe et la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR, qui pourraient pourtant avoir d'importantes implications thérapeutiques.

## Objectifs du doctorat :

Durant ma thèse, mon travail de recherche consistait à déterminer, à l'aide de lignées murines transgéniques, **comment les processus comportementaux et les réseaux neuronaux impliqués dans la vulnérabilité aux TUALs sont modifiés par le  $\alpha 5$ -SNP D398N** du gène CHRNA5 codant pour la sous-unité  $\alpha 5$  du nAChR, chez les sujets masculins et féminins.

Le **premier objectif (chapitre 1)** a été de vérifier l'**implication des récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs** dans les effets aigus de l'alcool et plus spécifiquement dans :

- (1) les **propriétés récompensantes de l'alcool**,
- (2) et l'**activité neuronale évoquée par l'alcool dans l'ATV et l'IPN**, deux des structures exprimant les plus fortes densités cérébrales de  $\alpha 5^*$ nAChRs et impliquées dans les effets récompensants/aversifs de l'alcool.

En utilisant une lignée murine transgénique  $\alpha 5$ KO (n'exprimant pas le gène CHRNA5), j'ai donc dans un premier temps évalué si l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR modifie les propriétés récompensantes et aversives de différentes doses d'alcool, dans un modèle d'auto-administration intra-ATV. Dans un second temps, nous avons évalué si l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR modifie l'activité de décharge évoquée par l'alcool dans les neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN ; et ce en comparant les enregistrements électrophysiologiques *in vitro* obtenus à partir de tranches de cerveaux de souris  $\alpha 5$ KO versus WT. Les données recueillies dans ces expériences vont donner lieu à une première publication en cours de préparation : *Tochon L, Allain AE, Caillé-Garnier S, Bertrand S, David V. Lack of  $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN.*

Le **deuxième objectif (chapitre 2)** a été de déterminer, à l'aide des lignées murines transgéniques  $\alpha 5$ KO et également  $\alpha 5$ KI (exprimant le  $\alpha 5$ -SNP D398N humain), **si la délétion constitutive ou le SNP D398N de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR modifie** les phénotypes associés à l'abus d'alcool dont :

- (1) **le comportement de consommation orale d'alcool ;**
- (2) **et les traits pré consommatoires.**

En effet, chez l'humain l'abus d'alcool est associé à des traits de personnalité spécifiques comme l'anxiété, la recherche de sensation ou encore l'impulsivité. Nous avons donc dans un

premier temps évalué si ces mutations modifient, avant toute exposition à l'alcool, les niveaux d'anxiété, de recherche de sensation et d'impulsivité en comparant les réponses comportementales des souris  $\alpha 5KI$ ,  $\alpha 5KO$  et WT dans une batterie de tests comportementaux. Par la suite, nous avons évalué si ces mutations modifient le comportement de consommation d'alcool en comparant les niveaux d'auto-administration orale et volontaire d'alcool de ces mêmes souris  $\alpha 5KI$ ,  $\alpha 5KO$  et WT, dans un protocole d'accès intermittent couvrant une large gamme de concentrations (3-60%). A l'aide d'une troisième lignée transgénique  $\alpha 5KO$  couplée à de la réexpression virale neurospécifique, nous avons également **vérifié l'implication spécifique des  $\alpha 5^*nAChRs$  de l'IPN dans certaines de ces modifications phénotypiques**. Ces données vont donner lieu à une seconde publication en cours de préparation : *TOCHON L, Henkous N, Besson M, Dominique N, Maskos U, David V. Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles : preclinical support for Cloninger's alcoholism typology.*

Dans le [chapitre 3](#), nous avons poursuivi plus en avant notre deuxième objectif en clarifiant d'avantage le phénotype induit par la délétion constitutive ( $\alpha 5KO$ ) ou le SNP D398N ( $\alpha 5KI$ ) de la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$ . L'abus d'alcool chez l'humain étant également associé à des troubles sociaux, voir des comportements agressifs, nous avons cherché à caractériser le profil social des mutants  $\alpha 5$ . Ces expériences vont donner lieu à une troisième publication en cours de préparation : *TOCHON L, Pageze C, Guillou JLG, David V. Alcohol-prone  $\alpha 5$ -nicotinic receptor mutant mice display sex-dependent opposite social-emotional profiles in emotion recognition and pro-social tasks.*

---

## RESULTATS

---



# Chapitre I : Implication des $\alpha 5^*$ nAChRs dans les propriétés addictives de l'alcool et l'activité neuronale dans l'ATV et l'IPN

## I- Article 1

### **"Lack of $\alpha 5^*$ nAChRs increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN"**

Léa Tochon, Anne-Emilie Allain, Caillé-Garnier Stéphanie, Sandrine Bertrand et Vincent David

L'objectif de ce premier article était, en utilisant à la fois des souris mâles et femelles de génotype WT et  $\alpha 5$ KO, d'évaluer les effets de la délétion constitutive de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR sur les propriétés addictives et les réponses neuronales à l'alcool dans le circuit ATV-IPN.

En utilisant l'auto-administration intra-ATV combinée à une tâche basée sur le choix dans un labyrinthe en Y, nous avons constaté que la délétion de la sous-unité  $\alpha 5$  déplace l'auto-administration d'alcool vers des doses élevées, normalement non récompensantes voir aversives pour des souris WT.

Parallèlement, en utilisant des enregistrements électrophysiologiques sur tranches de cerveaux (*patch-clamp* en configuration « cellule-attachée »), nous avons constaté que les variations dans les fréquences de décharge évoquées par l'alcool, au niveau des neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN, sont presque systématiquement supprimées ou inversées chez les souris  $\alpha 5$ KO par rapport aux souris WT. Nos données ont également révélé un antagonisme fonctionnel ATV/IPN chez les mâles WT (non retrouvé chez les  $\alpha 5$ KO) et d'importantes différences entre les sexes dans les réponses médiées par l'alcool dans l'IPN.

Nos résultats soutiennent le rôle essentiel des récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs exprimés dans les neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN, dans les effets centraux de l'alcool et dans le contrôle comportemental de sa consommation.

## **Lack of $\alpha 5^*nAChRs$ increases ethanol self-administration and reverses ethanol induced neuronal activity in VTA and IPN**

Léa Tochon<sup>1\*</sup>, Anne-Emilie Allain<sup>1</sup>, Caillé-Garnier Stéphanie<sup>1</sup>, Sandrine Bertrand<sup>1</sup> and Vincent David<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, CNRS, EPHE, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France.

\* Address correspondence to Léa Tochon, PhD student ([lea.tochon@u-bordeaux.fr](mailto:lea.tochon@u-bordeaux.fr)) or Vincent David, PhD ([vincent.david@u-bordeaux.fr](mailto:vincent.david@u-bordeaux.fr)), Université de Bordeaux INCIA CNRS UMR 5287, bât B2, allée Geoffroy St Hilaire 33615 PESSAC cedex ; Email:

**Running Title:** Role of VTA and IPN  $\alpha 5^*nAChRs$  in alcohol addictive properties

**Keywords:**  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit; ethanol; ventral tegmental area; interpeduncular nucleus; intra-cranial self-administration; cell-attached; Alcohol use disorders.

## ABSTRACT

Human genetic studies have implicated gene variants in the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit as high risk factors for developing alcohol use disorders (AUDs). The strongest expression of  $\alpha 5$ -containing nAChRs ( $\alpha 5^*$ nAChRs) is found in specific brain regions known to be implicated in drug reward and aversion: the ventral tegmental area (VTA) and the interpeduncular nucleus (IPN). But mechanisms through which  $\alpha 5^*$ nAChRs may influence the risk remain unknown, and their underlying normal functions in these structures are still poorly understood. The aim of the current study was, using both male and female wild-type (WT) and  $\alpha 5$  knock-out mice ( $\alpha 5$ KO), to evaluate the effect of the  $\alpha 5$ -nAChR subunit deletion on ethanol's addictive properties and neuronal responses in the VTA-IPN circuit. Using intra-VTA self-administration combined to a choice-based task in a Y-maze, we found that the  $\alpha 5$  deletion shifts the ethanol (EtOH) self-administration toward high doses. Concurrently, cell-attached electrophysiological recordings on brain slices revealed that EtOH-evoked firing activities of both VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons are either suppressed or inverted in  $\alpha 5$ KO mice as compared to WT mice. Our data also revealed a VTA/IPN functional antagonism in WT males (no longer found in  $\alpha 5$ KO), and important sex differences in EtOH-mediated responses in the IPN. Our findings support that  $\alpha 5^*$ nAChRs play a critical role in the central effect of EtOH and in the behavioral control of its consumption.

## INTRODUCTION

Alcohol is the third-leading risk factor for premature death and disability around the world (1). The heterogeneity of AUD makes it highly unlikely that one single treatment will work for all individuals and understanding its multifactorial aetiology is still challenging (2). Thus, there is a high need for extending the menu of options for available pharmacological and behavioral therapies. Converging evidences define the  $\alpha 5$ -containing nicotinic cholinergic receptor ( $\alpha 5$ \*nAChR) as new potential therapeutic target for the treatment of AUDs. Clinical and genome-wide association studies (GWA) have found that humans carrying risk alleles in the  $\alpha 5$ -subunit encoding gene (CHRNA5) have increased vulnerability to develop alcohol-dependence (3,4), early onset of alcohol abuse (5) and exhibit a low level of response to alcohol which may confer them a greater risk for developing alcohol use disorder (6).

The potential influence of  $\alpha 5$ \*nAChRs on alcohol drinking behavior and related addictive properties is consistent with the high expression of  $\alpha 5$ -nAChR subunits found in the ventral tegmental area (VTA).  $\alpha 5$ \*nAChRs are expressed in around 80% of the VTA dopaminergic (DAergic) neurons and in less than 20% of the VTA GABAergic neurons (7). Moreover, the strongest expression of  $\alpha 5$  within the brain is found in GABAergic neurons of the IPN (interpeduncular nucleus; (8) which is a brain region median and ventral to the VTA but with opposite roles in the signalling of reward versus aversion (9-11). While DAergic neuron-rich VTA is largely associated with increased motivation toward novelty, reinforcement, and positive affective state, the IPN is a brain region governing reduced motivation toward familiarity, as well as aversion, and negative affective state. Interestingly, a mesointerpeduncular circuit in which VTA-DAergic neurons project to the neighboring IPN has been recently described (12,13). However, the role of  $\alpha 5$ \*nAChRs from circuits involving the VTA, the IPN or both (mesointerpeduncular), in AUD-related mechanisms remains unknown. And findings about their influence on ethanol self-administration (EtOH SA) behavior in rodent studies are mixed.

The aim of the current study was to further understand the role of  $\alpha 5$ \*nAChRs in EtOH's addictive properties and neuronal responses in the VTA-IPN circuit where their expression is the highest. This study was conducted on wild-type (WT) and  $\alpha 5$  knock-out ( $\alpha 5$ KO) mice, both males and females. Using an **intra-VTA EtOH SA model combined to a choice-based task in a Y-maze, we first assessed whether rewarding and/or aversive effects of several doses of EtOH are altered by the  $\alpha 5$ -nAChR subunit deletion.** Secondly, using cell-

attached electrophysiological recordings on brain slices, we **evaluated whether  $\alpha 5^*$ nAChRs contributes to EtOH-evoked firing activity of VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons.**

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals and ethical statement*

All surgical and experimental procedures were carried out with the approval of the Ethics Committee of the University of Bordeaux (CEE50) and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH) and the European Directive (2010/63/EU). The study was conducted on male and female C57BL6/J background mice, wild-types (WT) and  $\alpha 5$  knock-out mutants ( $\alpha 5$ KO; deletion of the *CHRNA5* gene encoding for the  $\alpha 5$  nicotinic cholinergic receptor subunit) (14). Mice were housed by groups of 5 to 10 in collective cages separated according to their sex and maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , under controlled hygrometrics and a 12:12 light-dark cycle (lights ON at 7:00 AM). They were provided with food and water *ad libitum*. Mice undergoing surgical procedures were housed individually the week prior to the surgery. Mice were between 3-6 months old at the time of experimental testing.

### *EtOH Preparation*

EtOH solutions for ICSA were prepared in aCSF (Phymep©, Paris, France) from EtOH 96% (VWR Chemicals BDH®), at either 11.2, 28, 56 or 112 mg% final concentration (mg% = mg of EtOH for 100ml of aCSF). For *in vitro* electrophysiology experiments, EtOH 96% (VWR Chemicals BDH®) was dissolved in oxygenated aCSF (in mM: 130 NaCl, 3 KCl, 2.50 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 0.58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose) at either 50mM or 200mM final concentration.

### *Stereotaxic surgery*

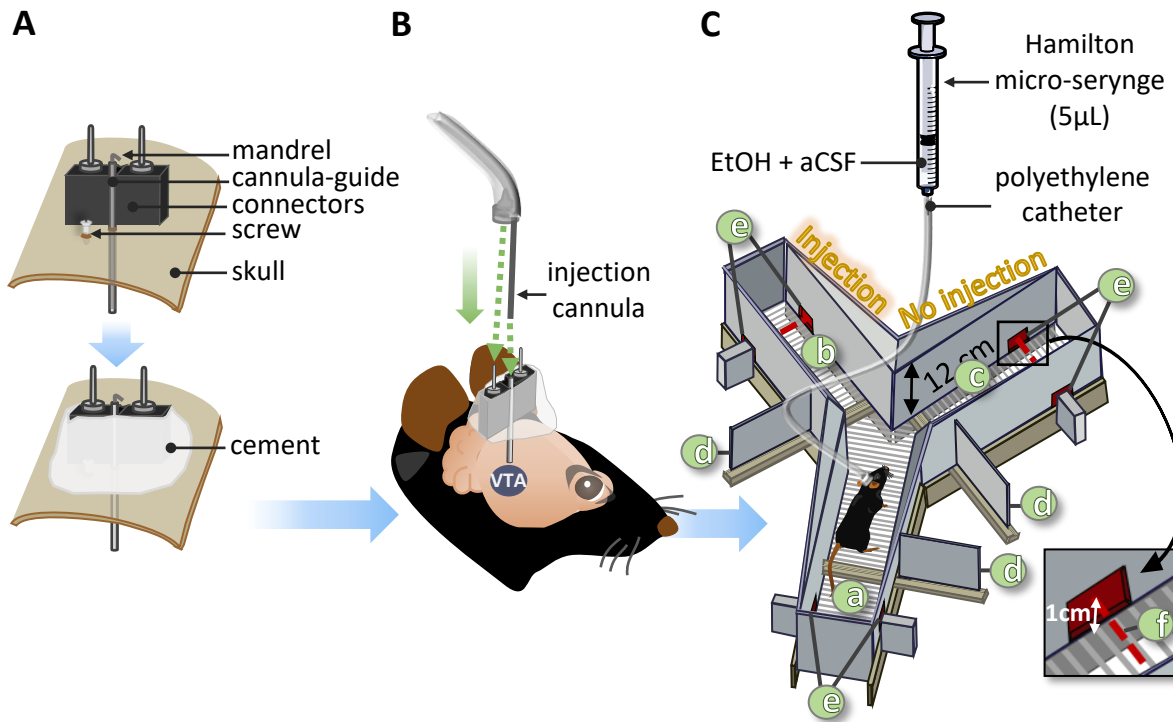
Mice were implanted unilaterally with a cannula-guide/connectors set described in **Figure 1A**. The tip of the cannula-guide ( $\varnothing_{\text{external}} = 0.460\text{mm}$ ; Le Guellec®, Douarnenez, France) was positioned 1.5mm above the posterior VTA (pVTA; **Fig. 1B**) and according to the following stereotaxic coordinates: AP = 0.28mm anterior to interaural 0; L =  $0.6 \pm 0.1\text{mm}$  lateral to the midline; DV = 4mm from the surface of the skull. Stereotaxic surgeries were performed under deep general anesthesia by volatile isoflurane (2%) and mice received a minimum recovery period of 7 days before intracranial self-administration protocol (ICSA; **Fig. 1C**).

### *VTA-ICSA procedure*

The VTA-ICSA combined to a choice-based task in a Y-maze, allows to assess concurrently positive reinforcing and aversive properties of drugs of abuse, and a rapid acquisition of voluntary self-administration (SA) behavior. The Y-shaped maze (**Fig. 1C**) were made of opaque grey Plexiglas, with horizontal sliding doors at the entrance to each arm. Two photoelectric detection cells located at the end of each arm emitted infrared radiation allowing to detect the presence of the mouse, and in case of EtOH-reinforced arm choice, to automatically trigger an injection via POLY\_Y software (imetronic®, Pessac, France; **Fig. 1C, e-f**). Prior animal introduction in the Y-maze, an injection cannula ( $\emptyset$ external = 0.229mm) was inserted into the pVTA via the cannula-guide previously implanted by stereotaxic surgery (**Fig. 1B**). This cannula was connected by a flexible polyethylene catheter to a micro-injection system comprising a Hamilton micro-syringe (**Fig. 1C**). By interrupting the infrared beam at the end of the reinforced arm, mice obtained one intra-VTA EtOH injection of 50nL (4 seconds). ICSA training started by a 10min-session intended to get mice used to the transfer from the animal house to the experimental room, to the Y-maze and to the connection/disconnection of the head to the micro-injection system. No injections were given during this session. From the next day, intra-VTA EtOH self-administration was assessed through a total of 10 sessions: each mouse performed 1 session per day, during 10 consecutive days, and 1 session consisted of 10 trials set out below. Four EtOH doses were tested: 11.2, 28, 56 and 112 mg%. The number of intra-session trials (between 0 and 10) in which the mouse interrupted the infrared beam in the EtOH-reinforced arm was automatically recorded by the POLY\_Y software.

### *Histological controls*

Photomicrographs of thionine-stained coronal brain sections (50 $\mu$ m) through the cannula-guide tracks were used to control the correct positioning of the EtOH-injection cannulas above the pVTA. Out of 123, 11 were removed from the experiments for misplacement. Representative examples of correct implantation are provided in **Figure 2J**. No observable tissue alteration at the level of the targeted VTA was observable following repeated EtOH injections, independently of the genotype, sex or EtOH concentration.



**Figure 1. EtOH ICSA in a Y-maze: the set up.** **A** Cannula-guide/connectors set implanted on the mouse's head by stereotaxic surgery. **B** Connection of the mouse to the EtOH micro-self-injection system (insertion of the injection cannula into the cannula-guide previously implanted). **C** Schematic representation of the Y-maze with: (a) starting box, (b) left arm, (c) right arm, (d) sliding doors, (e) photoelectric detection cells, (f) infrared beam.

#### *Preparation of VTA-IPN containing brain slices*

Under general anesthesia (10% ketamine Virbac® / 4% Xylazine Rompun® mixture, 0.1ml/10g of mice, ip), mice were perfused transcardially with 4°C sucrose solution (in Mm: 1.15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 205 sucrose; with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Horizontal 250µm-slices were obtained (**Fig. 3A**) and incubated for 1h in oxygenated aCSF (in mM: 130 NaCl, 3 KCl, 2.50 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 0.58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose) supplemented with the anti-radical L-Glythation at 35°C.

#### *Cell-Attached Recording of spontaneous and EtOH-evoked firing frequencies (FF)*

Cell-attached recordings were performed using electrodes pulled from borosilicate glass capillaries (3-6 MΩ) and filled with an internal solution containing (in mM): 120 K

Gluconate, 20 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 0.03 GTP, 0.01 AMPc, 0.01 Leupeptine, 77 D-mannitol, 3 Na<sub>2</sub>-ATP, Biocytin 1% and adjusted to pH 7.3. Recording chamber was continuously superfused with oxygenated aCSF at room temperature. Spontaneous spike activity was recorded using a filtered and digitalized patch-clamp amplifier (Multiclamp 700B, Axon Instruments, ITC-18 Interface, Instrutech), sampled at 10 kHz, and collected and analyzed using AxoGraph X software (Axon Instrument, CA, U.S.A). Recordings were monitored in VC mode at a command potential of 0 mV throughout the recordings (15). After a 15-min period of stable baseline recording, fresh solution of EtOH (at 50 or 200 mM) was bath applied until the end (after 20-minutes recordings in presence of EtOH).

### *Cell identification & Immunostaining*

Identification of VTA-DAergic neurons and IPN-GABAergic neurons was based on: (1) their location, (2) on the set of known electrophysiological properties that characterize these cells and (3) immunohistochemical analyzes. The IPN is well-delimited and primarily GABAergic, so visual control ensured correct patch location. However, to remedy to the difficult-to-define cytoarchitecture of the VTA, we decided to patch in a constant region of the pVTA, located right medially to the MT (medial terminal nucleus of the accessory optic tract; **Fig. 3A**) and then selected cells showing slow and regular FF (<10 Hz) and broad (>2 ms) action potentials. After electrophysiological recordings, neurons were opened to ensure the dissemination of the intra-pipette biocytin and slices containing biocytin-filled neurons were fixed with 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. After several washes, slices were incubated with a primary antibody: (1) 1/1000 mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (TH) antibodies (monoclonal, clone LNC1, MAB318, Sigma-Aldrich) for VTA neurons recordings; or (2) 1/1000 mouse anti- glutamate decarboxylase (67kDa isoform, GAD67) antibodies (monoclonal, clone 1G10.2, MAB5406, Chemicon®) for IPN neurons recordings. The next, day slices were incubated with the secondary antibodies (1h30-incubation at room temperature) 1/500 Alexa Fluor™ goat anti-mouse IgG (H+L; A11029, invitrogen). Immunostainings were acquired using a BX51 Olympus Fluoview microscope. Serial optical sections were obtained at a Z-step of 0.3µm and imaged using an objective 40x/1.00 numerical aperture oil. Neurons labeled positive for TH and biocytin within the VTA depending on the Paxinos area definition were considered confirmed DA cells, and neurons labeled positive for GAD and biocytin within the IPN were considered confirmed GABA cells; representative images of identified cells are provided in **Figure 3B-C**.



### *Data analysis and statistics*

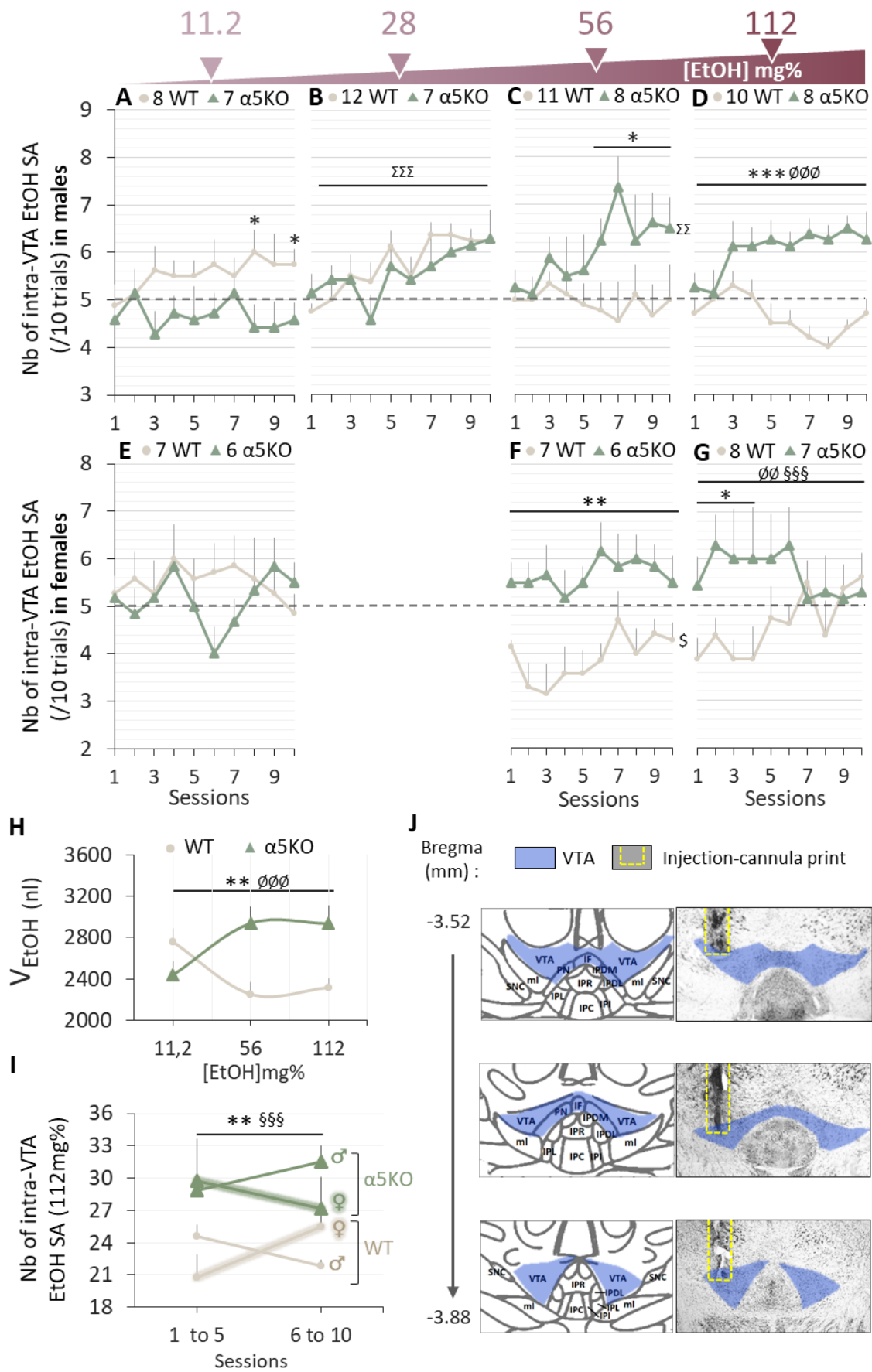
Firing frequency in electrophysiological recordings were analyzed off line using Axograph X software, statistics were conducted with StatView and figures were constructed with Excel. The number of intra-session trials (between 0 and 10) in which the animal interrupted the infrared beam in the EtOH-reinforced arm was expressed as number of intra-VTA EtOH self-administrations (or EtOH ICSA) per session. A score higher than 5 reveals preference for the injected substance, while a lower than 5 reveals avoidance. EtOH intra-VTA self-administration was tested with mixed-design ANOVAs using the number of self-injections or the total volume of self-injected EtOH as dependant variables, with the genotype ( $\alpha$ 5KO versus WT) and/or the sex (males versus females) as between-subject factors and ICSA sessions (session 1-10) or EtOH doses (dose 11.2-112 mg%) as a within-subject repeated measures. Neuronal FF were analyzed on 5-min periods before and after EtOH superfusion on brain slices. Differences in basal spontaneous firing rates of VTA-DAergic or IPN-GABAergic neurons between  $\alpha$ 5KO and WT mice were tested using a *t-test* for independent samples. To quantify the EtOH superfusion effect on VTA-DAergic or IPN-GABAergic neuron firing rates, 50 or 200mM EtOH-evoked FF were presented as percent of baseline firing frequency (0mM EtOH)  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Change from baseline was tested using a *t-test* for dependent samples (0mM EtOH baseline versus 50 or 200mM EtOH), and a mixed model ANOVA was used for comparison between genotypes and sex. For all analyses, statistical significance required  $\geq$  95% level of confidence ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTS

### The $\alpha 5^*nAChR$ deletion shifts the intra-VTA EtOH SA toward high doses in both male and female mice

With the EtOH dose of 11.2mg%, male WT showed a weak preference for the EtOH-reinforced arm of the Y-maze while intra-VTA SA scores of male  $\alpha 5KO$  remained at chance level or below over all sessions (**Fig. 2A**). These were significantly lower than WT ones at the sessions n°8 and 10 (**Fig. 2A**; S8:  $F_{(1,13)}=5.51$ ,  $p=0.035$ ; S10:  $F_{(1,13)}=6.01$ ,  $p=0.029$ ). At the optimally reinforcing dose of 28 mg%, both WT and  $\alpha 5KO$  males showed a significant and similar increasing preference for the EtOH-reinforced arm (**Fig. 2B**; Session effect:  $F_{(9,153)}=4.92$ ,  $p<0.001$ ). However, at 56mg%, male WT significantly reduced their number of ICSAs (**Fig. 2B vs 2C**; 28 vs 56mg%, Dose effect in male WT:  $F_{(1,21)}=5.18$ ,  $p=0.033$ ) while male  $\alpha 5KO$  tended to increase it (**Fig. 2C**; Session effect in male  $\alpha 5KO$ :  $F_{(9,63)}=2.81$ ,  $p=0.0076$ ; Genotype effect on sessions 6-10:  $F_{(1, 17)}=6.02$ ,  $p=0.025$ ). Doubling the dose further increased the difference between WT and  $\alpha 5KO$  males: WT displayed a progressive avoidance for the 112mg% EtOH-reinforced arm whereas male  $\alpha 5KO$  developed from the 3<sup>rd</sup> session a marked and stable preference for EtOH-reinforcement (**Fig. 2D**; Genotype effect:  $F_{(1,16)}=22.68$ ,  $p=0.0002$ ; Genotype x session interaction:  $F_{(9,144)}=3.42$ ,  $p=0.0008$ ).

In females, the 11.2mg% dose elicited a weak preference for the EtOH-reinforced arm in WT mice and unstable ICSA scores across sessions in  $\alpha 5KO$  mice, with no significant difference between the two groups (**Fig. 2E**). With the 56mg% dose, female WT then significantly reduced their number of intra-VTA EtOH SAs (**Fig. 2E vs 2F**; 11.2 vs 56mg%, Dose effect:  $F_{(1,12)}=8.93$ ,  $p=0.011$ ) while at the opposite female  $\alpha 5KO$  displayed preference for EtOH-reinforcement; leading to a significant genotype effect (**Fig. 2F**;  $F_{(1,11)}=16.6$ ,  $p=0.0018$ ). When we finally investigated the effects of the highest dose, we found that from sessions 1 to 6, WT displayed avoidance whereas  $\alpha 5KO$  displayed preference for the 112mg% EtOH-reinforced arm, with a significant genotype effect for sessions 1 to 4 (**Fig. 2G**; Genotype effect:  $F_{(1,13)}=4.9$ ,  $p=0.045$ ). However, this difference was transitory because the number of SA events in WT and  $\alpha 5KO$  respectively increased and decreased to both remain at chance level over the last four sessions (**Fig. 2G**; Genotype x session interaction:  $F_{(9,117)}=3.22$ ,  $p=0.0016$ ).



**Figure 2. The  $\alpha 5^*$ nAChR deletion shifts the intra-VTA EtOH SA toward high doses in both male and female mice, but only on a short-term basis in females. A-G** WT males and females (in brown) showed preference for the EtOH reinforced-arm of the Y-maze when low concentrations were proposed (11.2mg%, A, E; 28mg%, B) but regulated their EtOH ICSA rates by decreasing their choice, and even expressing avoidance when higher concentrations were proposed (56mg%, C, F; 112mg%, D, G). At the opposite,  $\alpha 5$ KO males and females (in green) exhibited lower interest for VTA-ICSA of EtOH at low dose (11.2mg%, A, E) and conversely preference for the EtOH reinforced-arm when high concentrations were proposed (56mg%, C, F; 112mg%, D, G). **H**  $\alpha 5$ KO (males and females) showed an inverted dose-response curve compared to WT, self-administering smaller volumes of EtOH-solution at 11.2mg% and larger volumes at 56/112 mg%. **I** Evolution of the total number of intra-VTA EtOH SA during the first half (sessions 1-5) versus the last half (sessions 6-10) of the protocol at 112mg%. Males acquired stable avoidance/preference for EtOH at 112mg% during the last half (sessions 6-10) of the protocol while females immediately acquired it (sessions 1-5) but did not maintain them during the last half of the protocol. **J** Microphotographs of thionine-stained 50 $\mu$ m-thick brain slices showing the localization of the EtOH-injection cannula (yellow dotted line) above the VTA (dark blue). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ : genotype effect;  $\Sigma\Sigma p \leq 0.01$ ,  $\Sigma\Sigma\Sigma p \leq 0.001$ : session effect;  $\emptyset\emptyset p \leq 0.01$ ,  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$  : genotype x session interaction;  $\$p \leq 0.05$ : sex effect;  $\$\$\$ p \leq 0.001$ : sex x genotype x session interaction.

Taken together these data showed that, while male and female WT mice regulated their EtOH ICSA by decreasing it when high EtOH doses were proposed (56-112mg%), male and female  $\alpha 5$ KO mice self-administered greater amounts as the dose is increased (**Fig. 2A-G**). The dose-response curve established from the total volume of EtOH self-administered (in nl, over the 10 sessions; **Fig. 2H**), confirmed the genotype-dependant inverse dose-response patterns observed with the number of EtOH SAs, and the absence of significant Sex effect on it : in both males and females the volume of EtOH self-administered dose-dependently decreased in WT while increasing in  $\alpha 5$ KO mice (**Fig. 2H**; Genotype effect:  $F_{(1,86)}=8.70$ ,  $p=0.0041$ ; Genotype x Dose interaction  $F_{(2,86)}=8.28$ ,  $p=0.0005$ ; Sex effect:  $F_{(1,80)}=0.97$ ,  $p=0.32$  ns). Thus, the lack of  $\alpha 5$ -nAChR subunit make less sensitive to both positive reinforcing and aversive effects of EtOH.

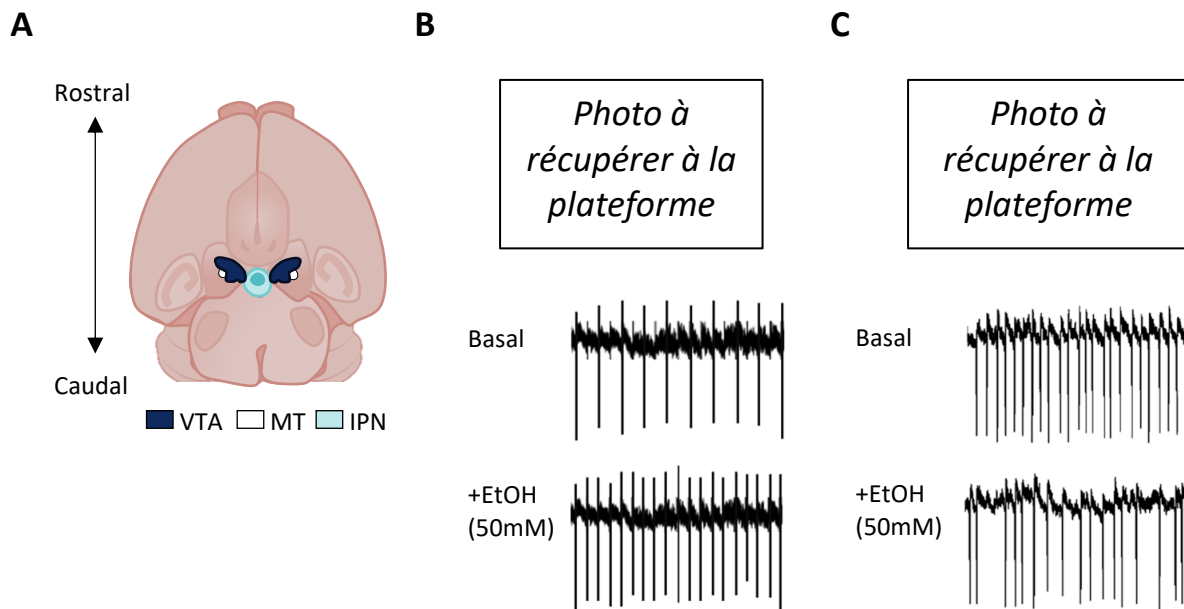
### **Females show faster acquisition than males, but transitory preference/avoidance for EtOH at high doses**

With the highest dose, the number of EtOH ICSAs session-dependently decreased in WT males while increasing in WT females and conversely session-dependently increased in

$\alpha$ 5KO males while decreasing in  $\alpha$ 5KO females, which lead to a highly significant Sex x Session x Genotype interaction (**Fig. 2D vs 2G**; 112mg%,  $F_{(9,261)}=5.73$ ,  $p<0.0001$ ). This effect was already visible with the 56mg% dose, but only as a tendency (**Fig. 2C vs 2F**). The comparison of the total number of SAs performed during the first half (sessions 1-5) versus the last half (sessions 6-10) of the protocol confirmed that males acquired stable avoidance/preference for EtOH at 112mg% during the last half of the protocol while females immediately acquired it with an attenuation in the last half of the protocol (**Fig. 2I**; Sex x Session x Genotype:  $F_{(1,29)}=26.95$ ,  $p<0.0001$ ; Genotype effect:  $F_{(1,29)}=10.40$ ,  $p=0.0031$ ). Besides, we found that with the 56mg% dose, WT females self-administered significantly less than WT males (**Fig. 2C vs 2F**; Sex effect in WT:  $F_{(1,16)}=5.20$ ,  $p=0.036$ ) and immediately exhibited a strong avoidance. Also,  $\alpha$ 5KO females showed an immediate low but stable preference for the 56mg% EtOH-reinforced whereas  $\alpha$ 5KO males displayed a progressive increase of preference over sessions, reaching ICSA scores higher than 7 (**Fig. 2C vs 2F**). Together these results suggested that females could be more sensitive to the central effects of high EtOH doses.

#### **Spontaneous firing rate of VTA-DAergic or IPN-GABAergic neurons do not differ between WT or $\alpha$ 5KO male and female mice**

Within the VTA, the mean spontaneous firing rate of DAergic neurons from WT mice was  $3.63\pm 0.44$  Hz and no significant difference was found between males and females (**Fig. 4A**; M:  $4.26\pm 0.72$  Hz versus F:  $2.99\pm 0.49$  Hz). VTA-DAergic cells from  $\alpha$ 5KO mice fired at a mean FF of  $2.87\pm 0.39$  Hz, with no significant difference between males and females (**Fig. 4A**; M:  $2.51\pm 0.42$  Hz versus F:  $3.19\pm 0.65$  Hz) and no significant difference compared to WT, even in sex-matched analyses. Within the IPN, neither genotype nor sex difference was found on baseline spontaneous activity of GABAergic neurons (**Fig. 4B**). Nevertheless, spontaneous FF of IPN-GABAergic neurons from  $\alpha$ 5KO mice tended to be slower than from WT mice (**Fig. 4B**;  $\alpha$ 5KO:  $2.88\pm 0.51$  Hz versus WT:  $4.87\pm 0.89$  Hz).



**Figure 3. EtOH responses in VTA-DAergic and IPN-GABAergic cells.** **A** Schematic representation of the typical horizontal brain slice used for cell-attached recordings and containing both VTA (dark blue) and IPN (light blue). The white dot indicates the location of the medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT), used as morphological repair to patch in a constant region of the VTA. **B** Representative confocal image of a recorded VTA neuron from WT male with TH and biocytin staining signals and representative trace of cell-attached recordings depicting the changes in FF elicited by EtOH 50mM (baseline firing rate of ~3 Hz). **C** Representative confocal image of a recorded IPN neuron from WT male with GAD and biocytin staining signals and its electrophysiological recordings depicting the change in FF elicited by EtOH 50mM (baseline firing rate of ~6 Hz).

### **EtOH 50mM increases the firing activity of VTA-DAergic neurons, and conversely decreases it in IPN-GABAergic neurons from WT males**

Responses to acute EtOH (bath-applied) were then measured in these VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons and two EtOH doses of 50 and 200 Mm were tested (**Fig. 4C-F**). In WT males, 50mM-EtOH increased the FF of VTA-DAergic neurons (**Fig. 4C left**; 50mM-EtOH effect:  $t_{(8)}=2.30$ ,  $p=0.49$ ) while 200mM-alcohol decreased it (**Fig. 4C right**; Dose effect:  $F_{(1,16)}=7.90$ ,  $p=0.012$ ). In contrast the two EtOH doses decreased the IPN-GABAergic neuronal activity, but this change was only significant with the 50mM dose (**Fig. 4D**; 50mM-EtOH effect:  $t_{(10)}=-2.40$ ,  $p=0.037$ ). Bath application of 50mM-EtOH thus induced opposite neuronal responses in the VTA and the IPN of WT males: FF of VTA-DAergic neurons increased by  $14\pm 6\%$  whereas FF of

IPN-GABAergic neurons decreased by  $10\pm 4\%$  (**Fig. 3B-C and 4C-D**; VTA vs IPN, unpaired t test:  $t_{(18)}=-3.35$ ,  $p=0.0035$ ).

### **EtOH-induced responses of VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons from $\alpha 5$ KO males are either suppressed or inverted in comparison with WT**

Strikingly, in VTA-DAergic cells from  $\alpha 5$ KO males, EtOH application did not induced any change of the FF, neither with 50mM nor with 200 mM, while dose-dependent inverted patterns of were previously observed in WT cells (**Fig. 4C**; Genotype x dose interaction:  $F_{(1,28)}=5.21$ ,  $p=0.030$ ). And conversely to IPN cells from WT, the FF of IPN-GABAergic neurons from  $\alpha 5$ KO males tended to increase after EtOH application (**Fig. 4D**; 50mM:  $+8\pm 4\%$ ; 200mM:  $+23\pm 14\%$ ; Genotype effect:  $F_{(1,37)}=9.54$ ,  $p=0.0038$ ).

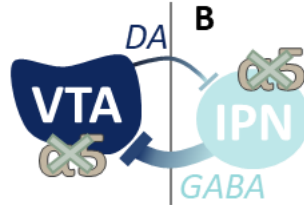
### **EtOH 50mM mediates inverted GABAergic responses in the IPN of female and male WT**

Cells from WT females exhibited different EtOH-induced responses compared to WT males, showing slight increases in VTA-DAergic neurons FF instead of a significant increase and a decrease with 50 and 200mM-EtOH respectively (**Fig. 4E**; Sex x Dose interaction:  $F_{(1,32)}=5.39$ ,  $p=0.026$ ). Moreover, IPN neurons from WT females displayed a significant increase (**Fig. 4F**;  $t_{(9)}=2.47$ ,  $p=0.035$ ) instead of a significant decrease with the 50mM-EtOH (Sex effect in WT:  $F_{(1,18)}=11.81$ ,  $p=0.0028$ ).

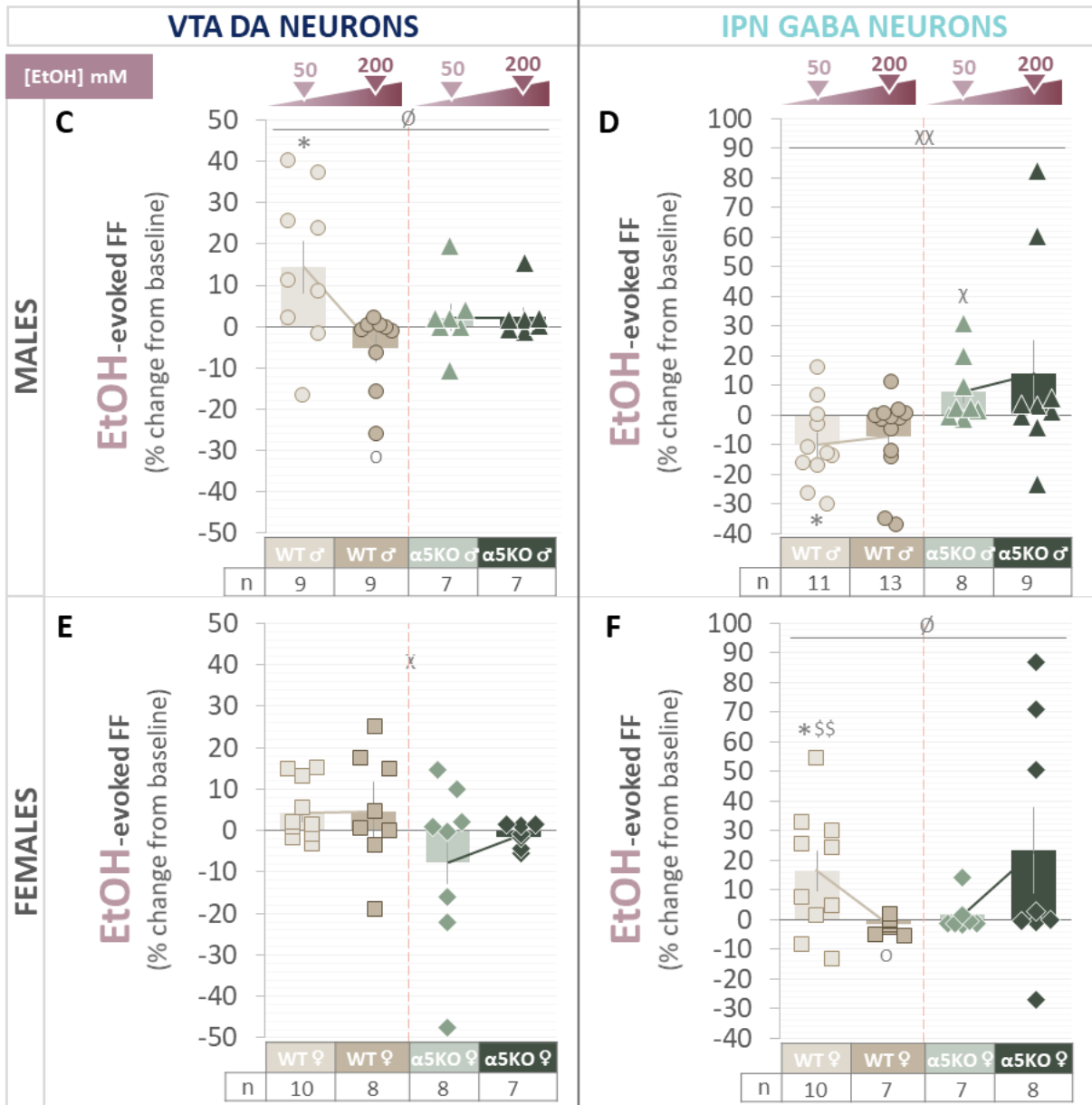
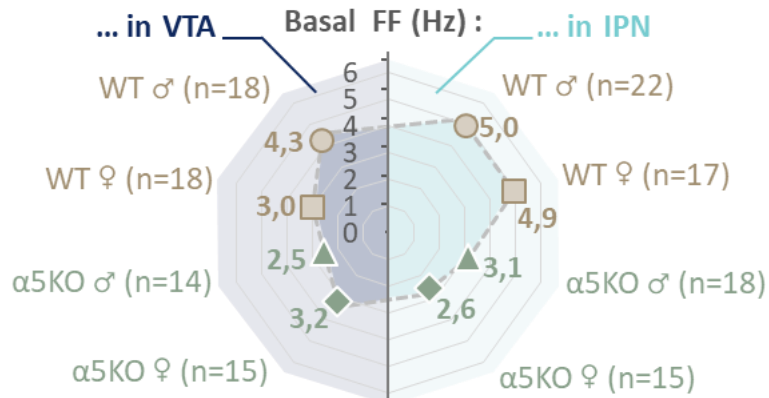
### **EtOH-induced responses of VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons from $\alpha 5$ KO females are either suppressed or inverted in comparison with their sex-matched WT**

We found that as in males, the  $\alpha 5$  deletion in female mice suppressed or even inverted EtOH-induced neuronal responses in both VTA and IPN. We found a significant Genotype effect on EtOH-evoked FF within the VTA (**Fig. 4E**;  $F_{(1,29)}=4.19$ ,  $p=0.049$ ), expressed as an EtOH-induced decrease (50mM) or no effect (200mM) in  $\alpha 5$ KO females versus an EtOH-induced increase in their sex-matched WT (50 and 200mM). Within the IPN of  $\alpha 5$ KO females, no more EtOH-induced increase was observed with the 50mM dose, and conversely where adding 200mM-EtOH had no effect on WT IPN-GABAergic FF, it seemed to induce an increase in female  $\alpha 5$ KO cells (**Fig. 4F**; Genotype x Dose interaction:  $F_{(1,28)}=5.34$ ,  $p=0.028$ ).

**A**



**B**





**Figure 4. EtOH-evoked firing activities of both VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons from brain slices are almost systematically suppressed or inverted in  $\alpha 5$ KO mice compared to WT mice. A-B** Spontaneous FF of VTA-DAergic (A) and IPN-GABAergic (B) neurons depending on the genotype and the sex. Spontaneous firing rate of VTA-DAergic or IPN-GABAergic neurons do not differ between WT (brown) or  $\alpha 5$ KO (green) male and female mice. **C-F** Mean  $\pm$ s.e.m change in VTA-DAergic and IPN-GABAergic neuron FF induced by bath application of the indicated EtOH concentration (50 or 200 mM), in male (C, D) and female (E, F) brain slices. \* $p \leq 0.05$ : Ethanol effect (comparison with baseline);  $\chi p \leq 0.05$ ;  $\chi\chi p \leq 0.001$ : Mutation effect (comparison with sex-matched WT);  $\circ p \leq 0.05$ : Dose effect (comparison with 50 mM);  $\emptyset p \leq 0.05$ : Genotype x dose interaction.  $\$ p \leq 0.05$ : Sex effect (comparison with genotype-matched males).

## DISCUSSION

In the present study, we characterized the implication of  $\alpha 5^*$ nAChRs in EtOH addictive properties and in EtOH-elicited neuronal activity at the level of the brain reward/aversion system. We first demonstrated that the lack of  $\alpha 5$ -nAChR subunit changes the EtOH-mediated effects on the brain reward system because higher doses were needed to generate a rewarding signal and the aversive signal was attenuated, which significantly increased EtOH self-administration (SA) at high doses. This specific dose-dependent effect may explain why previous rodent studies investigating EtOH seeking in  $\alpha 5$  mutants provided mixed results by concluding to a similar, a decreased or increased consumption in comparison with WT (16-19). Our data support the view that an alteration of the  $\alpha 5$  subunit reduces the regulation signal on alcohol intake, thus shifting alcohol consumption toward high doses, which combined to other risk factors may contribute to a rapid instatement of EtOH dependence. Although this alteration was observed in both males and females, we found some gender differences. As previously observed by Rodd et al. (20), our females showed faster acquisition as males, of either preference ( $\alpha 5$ KO), or avoidance (WT) for EtOH. Interestingly, women tend to show faster progression toward developing an AUD compared to men (21). However, the quickly acquired high self-administration observed in  $\alpha 5$ KO females seems transitory. To determine whether this kinetic may reflect either higher or lower vulnerability to AUD-like development, it would be informative to assess their EtOH SA after a period of forced abstinence, or to repeat these experiments with an intermittent SA paradigm (every-other-day instead of consecutive days). Understanding sex differences in vulnerability for alcohol abuse and the neural mechanisms behind such differences will be critical to both acquiring a

full understanding of the behavior and developing treatments for men and women diagnosed with AUD.

Secondly, we demonstrated that the lack of the  $\alpha 5$ -nAChR subunit drastically changes EtOH-mediated effects on the brain reward / aversion systems, indeed EtOH-evoked firing activities of VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons respectively were either suppressed or inverted in  $\alpha 5$ KO mice as compared to WT mice. Non-essential to the formation of nAChRs and unable to contribute to the ACh-binding site, the  $\alpha 5$  subunit is considered as an 'accessory' fifth subunit in a nicotinic receptor pentamer (22). Nevertheless, its presence has been shown to confer efficient properties like higher  $\text{Ca}^{2+}$  permeability and higher nicotine sensitivity in the  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR combination (23). *In vitro* and *in vivo* studies have also demonstrated a critical role for  $\alpha 5$ -nAChR subunits in the regulation of DAergic neurons activity in the brain's reward system (24-26). Here we showed that  $\alpha 5$ \*nAChRs also play a critical role in the EtOH-induced neuronal activity in both VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons. We also highlighted important sex differences in the IPN function, with opposite EtOH-evoked responses in IPN-GABAergic neurons between WT males and females, not found between  $\alpha 5$ KO males and females. Interestingly, Gangitano et al. (27) found a progesterone-dependent modulation of  $\alpha 5$  subunit expression in the IPN. It could thus be interesting to assess whether EtOH-evoked responses in IPN-GABAergic neurons from females vary across the oestrus cycle. A more recent study found that a chronic nicotine exposure results in increased  $\alpha 5$  transcript levels in the IPN, but only in females (28). Moreover, as compared to males, female rats displayed greater numbers of nicotine withdrawal-induced active cells within the central portion of the IPN; and this withdrawal-induced activation of the IPN was correlated with negative affective states in females, but not males (29). Gender-specific mechanisms implicating  $\alpha 5$ \*nAChRs may contribute to differential responses to nicotine but also to alcohol between females and males.

In conclusion, we provide evidence that VTA-DAergic and IPN-GABAergic  $\alpha 5$ -containing neurons play a critical role in EtOH SA regulation. Recent studies suggest the existence of direct dopaminergic projections from the paranigral subnucleus of the VTA to the caudal part of the IPN (12,13). This mesointerpeduncular pathway has been implicated in the regulation of anxiety-like behaviour and preference for novelty (12,13), which are highly linked with alcohol seeking. Regarding our data, it would be interesting to explore the direct implication of this pathway in EtOH SA behaviour and whether  $\alpha 5$ \*nAChRs are expressed in these specific VTA DA-projecting neurons. Besides, another recent study has demonstrated that a specific

subset of interpeduncular  $\alpha 5$  nicotinic GABAergic neurons, called  $\alpha 5$ -Amigo<sup>1</sup>, regulate nicotine preference (30). These  $\alpha 5$ -Amigo<sup>1</sup> neurons seem to send long projections to laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), which interestingly provide one of the main source of cholinergic innervation of VTA-DAergic neurons (31). Regarding our data, it would be interesting to explore the role of these  $\alpha 5$ -Amigo<sup>1</sup> GABAergic neurons in detecting and signalling EtOH in the brain.  $\alpha 5$ \*nAChRs provide the opportunity to further characterize reward/aversion networks by identifying and assessing the contribution of  $\alpha 5$ -expressing subpopulations, especially among VTA-DAergic and IPN-GABAergic neurons.

## **FUNDING AND DISCLOSURE**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 5287 (V.D.) and CNRS UMR 3571 (U.M.), Bordeaux University, Agence Nationale de la Recherche (ANR), Neuroscience and BLANC, LABEX BRAIN, French National Cancer Institute grant (INCa/CANCEROPOLE-TABAC-01-16022). The laboratory of V.D. is part of the Bordeaux Neurocampus. The authors have nothing to disclose.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

VD, SB, AEA and LT were responsible for the study concept and design. AEA and LT conducted all of the *in vitro* electrophysiology related experiments and analysed these data under the guidance of SB. SCG contributed to the *in vitro* electrophysiological set up. AEA performed all the immunostaining experiments. LT conducted all of the ICSA related experiments and analysed this data under the guidance of VD. LT drafted the manuscript and all authors provided critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

## REFERENCES

1. World Health Organization. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization, 2018
2. Witkiewitz K, Litten RZ, Leggio L. Advances in the science and treatment of alcohol use disorder *Sci Adv* 2019 **5**(9): eaax4043
3. Hällfors J, Loukola A, Pitkäniemi J, Broms U, Männistö S, Salomaa V, et al. Scrutiny of the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 smoking behavior locus reveals a novel association with alcohol use in a Finnish population based study *Int J Mol Epidemiol Genet* 2013 **4**(2):109-119
4. Wang JC, Grucza R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, et al. Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence *Mol Psychiatry* 2009 **14**(5): 501–10
5. Schlaepfer IR, Hoft NR, Collins AC, Corley RP, Hewitt JK, Hopfer CJ, et al. The CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster Variability as an Important Determinant of Early Alcohol and Tobacco Initiation in Young Adults *Biol Psychiatry* 2008 **63**(11): 1039–46
6. Joslyn G, Brush G, Robertson M, Smith TL, Kalmijn J, Schuckit M, et al. Chromosome 15q25.1 genetic markers associated with level of response to alcohol in humans *Proc Natl Acad Sci* 2008 **105**(51): 20368–73
7. Klink R, d’Exaerde A de K, Zoli M, Changeux J-P. Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei *J Neurosci* 2001 **21**(5): 1452–63
8. Hsu Y-WA, Tempest L, Quina LA, Wei AD, Zeng H, Turner EE. Medial Habenula Output Circuit Mediated by 5 Nicotinic Receptor-Expressing GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus *J Neurosci* 2013 **33**(46): 18022–35
9. McLaughlin I, Dani JA, De Biasi M. The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation *J Neurochem* 2017 **142**: 130–43
10. Wills L, Kenny PJ. Addiction-related neuroadaptations following chronic nicotine exposure *J Neurochem* 2021 **157**(5): 1652–73
11. Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory *Neurosci Biobehav Rev* 2010 **35**(2): 129–50
12. DeGroot SR, Zhao-Shea R, Chung L, Klenowski PM, Sun F, Molas S, et al. Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry *Biol Psychiatry* 2020 **88**(11): 855–66
13. Molas S, Zhao-Shea R, Liu L, DeGroot SR, Gardner PD, Tapper AR. A circuit-based mechanism underlying familiarity signaling and the preference for novelty *Nat Neurosci* 2017 **20**(9): 1260–8
14. Fowler CD, Kenny PJ. Utility of genetically modified mice for understanding the neurobiology of substance use disorders *Hum Genet* 2012 **131**(6): 941–57
15. Perkins KL. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices *J Neurosci Methods* 2006 **154**(1–2): 1–18
16. Besson M, Forget B, Correia C, Blanco R, Maskos U. Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in CHRNA5: a role in alcohol dependence and feeding behaviour *Neuropsychopharmacology* 2019 **44**(11): 1906–16

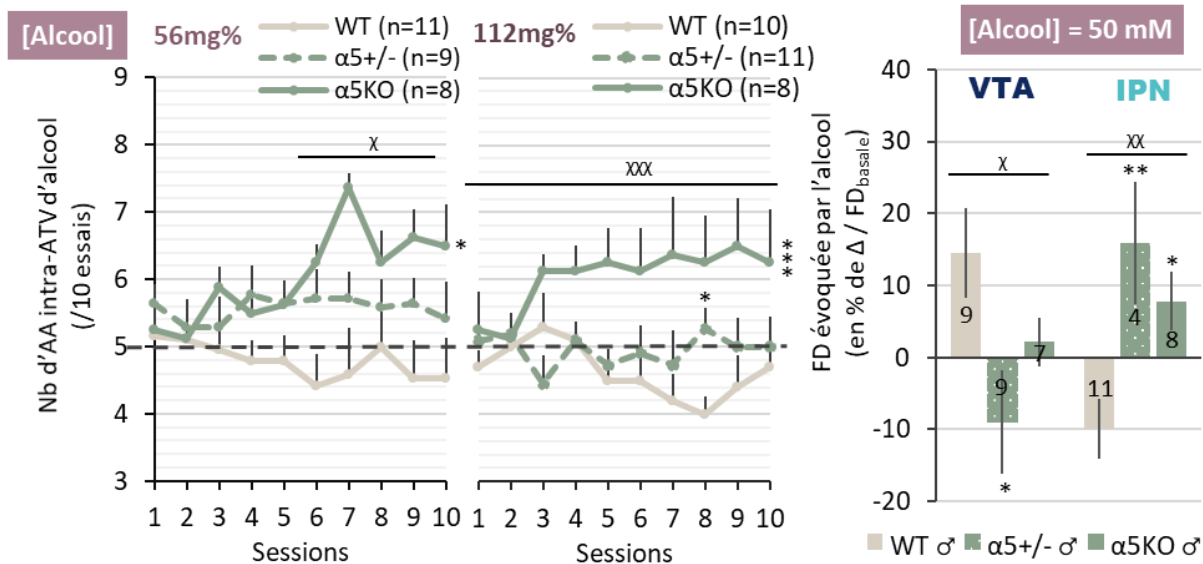
17. Dawson A, Wolstenholme JT, Roni MA, Campbell VC, Jackson A, Slater C, et al. Knockout of alpha 5 nicotinic acetylcholine receptors subunit alters ethanol-mediated behavioral effects and reward in mice *Neuropharmacology* 2018 **138**: 341–8
18. Gallego X, Ruiz-Medina J, Valverde O, Molas S, Robles N, Sabrià J, et al. Transgenic over expression of nicotinic receptor alpha 5, alpha 3, and beta 4 subunit genes reduces ethanol intake in mice *Alcohol* 2012 **46**(3): 205–15
19. Santos N, Chatterjee S, Henry A, Holgate J, Bartlett SE. The  $\alpha 5$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Plays an Important Role in the Sedative Effects of Ethanol But Does Not Modulate Consumption in Mice *Alcohol Clin Exp Res* 2013 **37**(4): 655–62
20. Rodd ZA. Intracranial Self-Administration of Ethanol within the Ventral Tegmental Area of Male Wistar Rats: Evidence for Involvement of Dopamine Neurons *J Neurosci* 2004 **24**(5): 1050–7
21. Agabio R, Pisanu C, Gessa GL, Franconi F. Sex Differences in Alcohol Use Disorder *Curr Med Chem* 2017 **24**(24): 2661-2670
22. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors *Curr Neuropharmacol* 2018 **16**(4): 338–49
23. Scholze P, Huck S. The  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates  $\alpha 4\beta 2^*$  and  $\alpha 3\beta 4^*$  Receptors *Front Synaptic Neurosci* 2020 **12**: 607959
24. Exley R, McIntosh JM, Marks MJ, Maskos U, Cragg SJ. Striatal 5 Nicotinic Receptor Subunit Regulates Dopamine Transmission in Dorsal Striatum *J Neurosci* 2012 **32**(7): 2352–6
25. Morel C, Fattore L, Pons S, Hay YA, Marti F, Lambomez B, et al. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons *Mol Psychiatry* 2014 **19**(8): 930–6
26. Xiao C, Zhou C, Jiang J, Yin C. Neural circuits and nicotinic acetylcholine receptors mediate the cholinergic regulation of midbrain dopaminergic neurons and nicotine dependence *Acta Pharmacol Sin* **41**(1): 1–9
27. Gangitano D, Salas R, Teng Y, Perez E, De Biasi M. Progesterone modulation of  $\alpha 5$  nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle *Genes Brain Behav* 2009 **8**(4): 398–406
28. Correa VL, Flores RJ, Carcoba LM, Arreguin MC, O’Dell LE. Sex differences in cholinergic systems in the interpeduncular nucleus following nicotine exposure and withdrawal *Neuropharmacology* 2019 **158**: 107714
29. Matos-Ocasio F, Espinoza VE, Correa-Alfonzo P, Khan AM, O’Dell LE. Female rats display greater nicotine withdrawal-induced cellular activation of a central portion of the interpeduncular nucleus versus males: A study of Fos immunoreactivity within provisionally assigned interpeduncular subnuclei *Drug Alcohol Depend* 2021 **221**: 108640
30. Ables JL, Görlich A, Antolin-Fontes B, Wang C, Lipford SM, Riad MH, et al. Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular  $\alpha 5$  nicotinic neurons regulates nicotine preference *Proc Natl Acad Sci* 2017 **114**(49): 13012–7
31. Dautan D, Souza AS, Huerta-Ocampo I, Valencia M, Assous M, Witten IB, et al. Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits *Nat Neurosci* 2016 **19**(8): 1025–33

## II- Expériences complémentaires

### 1. La délétion d'un seul allèle du gène *CHRNA5* est suffisante pour augmenter l'auto-administration intracérébrale d'alcool et inverser les activités neuronales dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN, induites par l'alcool

Dans l'article présenté dans ce chapitre 1, nous avons dans un premier temps évalué les effets de l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR (souris  $\alpha 5$ KO) sur les propriétés addictives de l'alcool en utilisant un test d'auto-administration (AA) basé sur le choix, dans un labyrinthe en Y, du bras associé à une injection d'alcool dans l'ATV. Nous avons constaté que, à la différence des WT, les souris  $\alpha 5$ KO présentent une préférence pour les injections de solutions d'alcool à fortes concentrations (56 et 112 mg%). Dans un second temps, nous avons enregistré par électrophysiologie *in vitro* sur tranches les fréquences de décharge de neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN chez des souris WT et  $\alpha 5$ KO, avant et après application d'alcool (dont à 50 mM). Et nous avons constaté que par rapport aux cellules enregistrées chez des souris WT, les cellules provenant de souris  $\alpha 5$ KO présentent une suppression ou une inversion de l'activité de décharge induite par l'alcool, quelle que soit la structure ou la dose testée.

Dans les expériences d'auto-administration intra-ATV d'alcool à 56 et 112 mg%, nous avons également testé  $n=20$  mutants hétérozygotes ( $\alpha 5^{+/-}$ ) mâles, dépourvus d'un seul des deux allèles du gène *CHRNA5*. Ceux-ci ont été testés en même temps que des mâles WT et  $\alpha 5$ KO dont les données sont présentées dans l'article 1, et tous ces résultats sont combinés en **Figure 22 gauche**. Les courbes de préférence laissent suggérer que l'absence d'une seule copie favorise déjà la prise d'alcool à fortes doses, mais de façon nettement moins marquée (et surtout non significative) par rapport à l'absence des deux allèles. Lorsque la solution d'alcool à 56 mg% est proposée, le nombre d'AA moyen des  $\alpha 5^{+/-}$  n'est pas significativement plus élevé que celui des WT, mais on constate néanmoins un profil intermédiaire entre les WT et les  $\alpha 5$ KO. A 112 mg%, les  $\alpha 5^{+/-}$  présentent des réponses plus proches des WT que des  $\alpha 5$ KO, avec néanmoins un évitement moins marqué que les WT lors des dernières sessions (Session 8, effet génotype :  $F(2,26)=8.88$ ,  $p=0.0011$  ; post-hoc Bonferroni/Dunn,  $\alpha 5^{+/-}$  vs WT :  $p=0.016$  ;  $\alpha 5$ KO vs WT :  $p=0.0003$ ).



**Figure 22.** Auto-administration intra-ATV d'alcool et enregistrement électrophysiologique des neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN chez des souris  $\alpha 5^{+/-}$  mâles. Gauche : Courbes montrant les scores de préférence pour l'alcool à 56 ou 112 mg%, exprimés en nombre moyen d'auto-administrations (AA) intra-ATV sur 10 essais, en fonction de chacune des 10 sessions (1 session/jour). Ligne pointillée : hasard (score de 5/10 obtenu en l'absence de récompense et correspondant à de l'alternance spontanée). Un score  $>5$  indique une préférence pour la substance injectée, tandis qu'un score  $<5$  indique un évitement. Droite : histogramme montrant la fréquence de décharge (FD) induite par l'alcool (50mM) dans les neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN enregistrés sur tranches (*patch-clamp* en configuration cellule-attachée). La FD est exprimée en % de variation par rapport à la FD basale (= en l'absence d'alcool).  $\chi$   $p < 0.05$ ,  $\chi\chi$   $p < 0.01$ ,  $\chi\chi\chi$   $p < 0.001$  : effet génotype ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$  : post-hoc Bonferroni versus WT.

Nous avons également enregistré, dans des conditions expérimentales identiques à celles présentées dans l'article,  $n=13$  cellules originaires de souris  $\alpha 5^{+/-}$  mâles (9 neurones dopaminergiques de l'ATV et 4 neurones GABAergiques de l'IPN). Ces enregistrements supplémentaires révèlent que l'absence d'un seul des deux allèles du gène *CHRNA5* est suffisante pour inverser le profil d'activité de décharge évoqué par l'alcool dans le circuit ATV-IPN (Figure 22 droite). Inversement aux cellules enregistrées chez les souris WT, l'alcool à 50mM diminue la fréquence de décharge (FD) des neurones dopaminergiques de l'ATV et augmente celle des neurones GABAergiques de l'IPN chez les mâles  $\alpha 5^{+/-}$  (Effet génotype dans l'ATV:  $F(2,22)=3.87$ ,  $p=0.036$  ; Post-hoc Bonferroni/Dunn,  $\alpha 5^{+/-}$  vs WT:  $p=0.010$  ; dans l'IPN:  $F(2,20)=6.98$ ,  $p=0.005$  ; Post-hoc Bonferroni/Dunn,  $\alpha 5^{+/-}$  vs WT:  $p=0.0039$ ,  $\alpha 5KO$  vs WT:  $p=0.010$ ).

La délétion d'un seul allèle du gène CHRNA5 altère donc l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV et des neurones GABAergiques de l'IPN de façon similaire à l'absence totale du gène, mais n'altère pas de façon aussi marquée le comportement d'AA intra-ATV d'alcool. Ces résultats suggèrent qu'en plus de ces neurones, d'autres sous-types neuronaux porteurs de la sous-unité  $\alpha 5$  pouvant provenir de l'ATV, de l'IPN ou d'autres structures cérébrales, interviennent dans le codage de la valence récompensante/aversive de l'alcool et dans le contrôle comportemental de sa consommation. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact de la délétion d'un seul allèle chez les souris femelles.

## **2. Le $\alpha 5$ -SNP D398N augmente l'auto-administration intracérébrale de solutions d'alcool à fortes concentrations**

Qu'en est-il de la mutation RS16969968 du gène CHRNA5, plus couramment connue sous le nom de  $\alpha 5$ -SNP D398N ? Même si son impact est plus largement relaté dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse, nous commençons à l'aborder en cette fin de chapitre 1.

Toujours dans les expériences d'auto-administration intra-ATV de solutions d'alcool à 56 et 112 mg%, nous avons également testé, en même temps que les animaux précédents, des mutants  $\alpha 5$ KI (12 mâles et 7 femelles) porteurs du  $\alpha 5$ -SNP D398N.

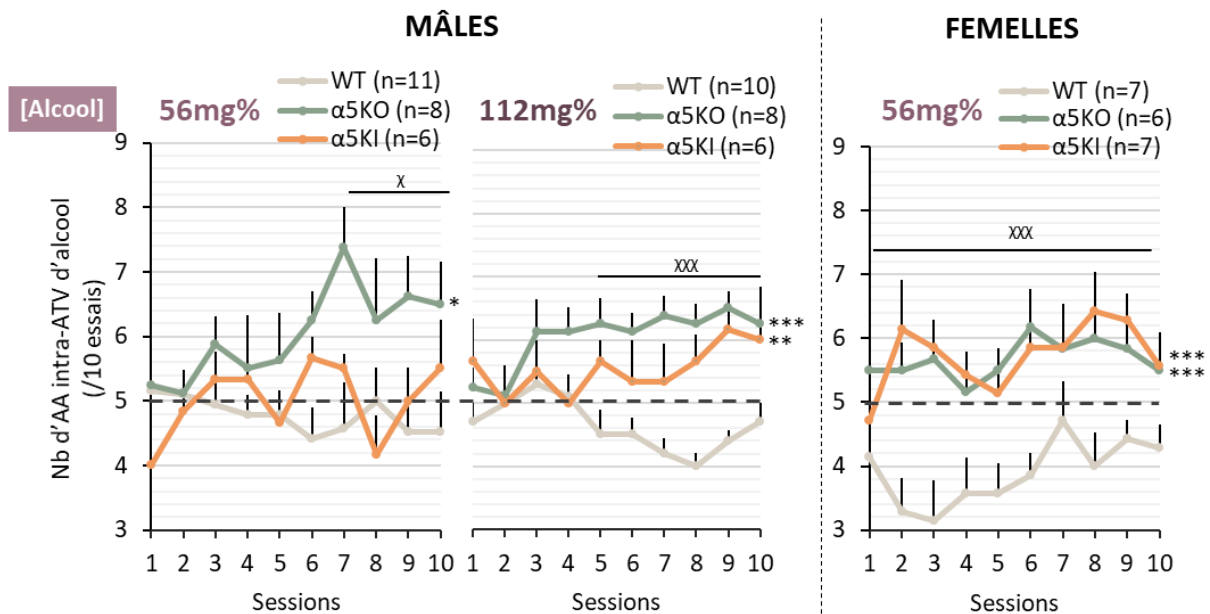
Les résultats de ces animaux illustrés en **Figure 23** indiquent que les mâles  $\alpha 5$ KI ne s'auto-administrent pas plus d'alcool que les WT pour la dose de 56 mg%. En revanche, ces derniers présentent, à l'inverse de leurs congénères WT mais similairement à leurs congénères  $\alpha 5$ KO, une préférence pour l'auto-administration d'alcool à la très forte dose de 112mg% (effet génotype pour les sessions 5-10 :  $F(2,21)=14.25$ ,  $p=0.0001$ ; post-hoc Bonferroni/Dunn,  $\alpha 5$ KI vs WT :  $p=0.0035$  ;  $\alpha 5$ KO vs WT :  $p<0.0001$  ; **Figure 23 gauche**).

Chez les souris femelles, le  $\alpha 5$ -SNP altère les propriétés aversives de l'alcool et augmente son auto-administration dès la dose de 56 mg% (effet génotype :  $F(2,17)=14.11$ ,  $p=0.0002$ ; post-hoc Bonferroni/Dunn,  $\alpha 5$ KI vs WT :  $p=0.0002$  ;  $\alpha 5$ KO vs WT :  $p=0.0004$ ; **Figure 23 droite**).

Similairement à la délétion de la sous-unité  $\alpha 5$ , le  $\alpha 5$ -SNP D398N favorise donc la prise de solutions d'alcool à fortes concentrations, mais différemment entre les mâles et les femelles : de solutions à 56mg% chez les femelles, et seulement à partir de 112 mg% chez les mâles. Aussi, l'altération du comportement d'auto-administration d'alcool chez les mâles



n'est pas strictement identique entre les souris  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$ . Ces résultats suggèrent : (1) une potentielle interaction entre le  $\alpha 5$ -SNP D398N et le sexe ; (2) que l'absence de  $\alpha 5$ -nAChR et la présence de sa version mutée  $\alpha 5^{D398N}$  induisent des modifications différentes dans la fonction du nAChR (perte de fonction seulement partielle avec la sous-unité  $\alpha 5^{D398N}$  ?) ; (3) ou bien que des mécanismes de compensation sont mis en place dans l'un ou l'autre de ces cas. Certaines de ces observations sont confirmées dans les chapitres suivants.



**Figure 23.** Auto-administration intra-ATV d'alcool chez des mâles et des femelles  $\alpha 5KI$  porteurs du  $\alpha 5$ -SNP D398N humain. Scores de préférence pour les solutions d'alcool à 56 ou 112 mg% chez les mâles (**gauche**), et pour la solution d'alcool à 56mg% chez les femelles (**droite**).  $\chi$   $p < 0.05$ ,  $\chi\chi\chi$   $p < 0.001$  : effet génotype ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$  : post-hoc Bonferroni/Dunn versus WT.

## **Chapitre II : Impact de la délétion et du SNP D398N de la sous-unité $\alpha$ 5-nAChR sur la consommation d'alcool et les phénotypes pré consommatoires associés**

### **I- Article 2**

#### **“Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles: Preclinical support for Cloninger alcoholic subtypes”**

Léa Tochon, Nadia Henkous, Morgane Besson, Noémie Dominique, Uwe Maskos, Vincent David

Dans ce deuxième article, nous avons étudié les effets de la délétion constitutive ou du polymorphisme D398N de la sous-unité  $\alpha$ 5-nAChR sur la consommation orale d'alcool, et sur des traits phénotypiques connus pour favoriser sa consommation abusive : l'anxiété, la recherche de sensation et l'impulsivité. A cette fin, nous avons testé des souris mâles et femelles  $\alpha$ 5KI et  $\alpha$ 5KO dans les tests du labyrinthe en croix surélevé (EPM), de la préférence de place pour la nouveauté (NPP) et de l'inhibition passive (SD), afin d'estimer respectivement leur niveau d'anxiété, de recherche de nouveauté et de contrôle comportemental (correspondant à une dimension du spectre impulsif). A la fin de cette batterie de tâches comportementales, la consommation orale de ces souris a été évaluée dans un protocole d'auto-administration intermittente, orale et volontaire d'alcool.

Nos données démontrent que les mutants  $\alpha$ 5KI et  $\alpha$ 5KO consomment tout deux de plus grandes quantités d'alcool à fortes doses que les WT, tout en affichant des phénotypes émotionnels opposés. De façon intéressante, ceux-ci évoquent fortement les deux profils de TUALs humains établis par Cloninger et ses collègues ; avec le type I = plutôt féminin, dit « d'évitement » et caractérisé par une forte anxiété ; et à l'opposé, le type II = masculin, dit de « recherche de sensations ». Aussi, nous avons constaté que la réexpression neurospécifique de la sous-unité  $\alpha$ 5-nAChR dans les neurones GABAergiques de l'IPN, diminue la consommation d'alcool et tend à restaurer le phénotype impulsif observé chez les souris  $\alpha$ 5KO.

Ainsi, dans ce chapitre 2 nous confirmons à l'aide d'un second modèle d'auto-administration d'alcool (se conférer à l'intra-ATV du chapitre 1) que les deux mutations de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR déplacent la consommation d'alcool vers des solutions fortement concentrées, à la fois chez les souris mâles et femelles avec à nouveau quelques différences dépendantes du sexe. Nos données renforcent également l'implication des neurones GABAergiques de l'IPN exprimant la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR, dans le contrôle de la consommation. Enfin, nos données révèlent que les souris  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO sont toutes deux sujettes à la surconsommation de solutions fortement alcoolisées tout en présentant des profils cognitivo-émotionnels opposés, ce qui en fait des modèles précliniques potentiels de deux types opposés de TUALs chez l'humain.

**Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles: preclinical support for Cloninger alcoholic subtypes**

Léa Tochon<sup>1\*</sup>, Nadia Henkous<sup>1</sup>, Morgane Besson<sup>2</sup>, Noémie Dominique<sup>2</sup>, Uwe Maskos<sup>2</sup>, Vincent David<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, CNRS, EPHE, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup>Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, Institut Pasteur, CNRS UMR 3571, 75015 Paris, France

\* Correspondence to Léa Tochon ([lea.tochon@u-bordeaux.fr](mailto:lea.tochon@u-bordeaux.fr)) or Vincent David ([vincent.david@u-bordeaux.fr](mailto:vincent.david@u-bordeaux.fr)) Université de Bordeaux INCIA CNRS UMR 5287, bât B2, allée Geoffroy St Hilaire 33615 Pessac, France

The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

**Running Title:** Preclinical models of type 1 and 2 alcoholisms

**Keywords:** alcohol use disorders;  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor; genetic risk factors; preconsumatory traits; interpeduncular nucleus

## ABSTRACT

### Background

Human genetic studies have implicated gene variants in the *CHRNA5* gene, encoding the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit, as risk factors for developing alcohol use disorders (AUDs). Mechanisms through which they may influence these risks remain unknown.

### Methods

To understand how  $\alpha 5$ -nAChR mutations may influence alcohol-drinking behavior and preconsummatory traits relevant to AUDs (anxiety, sensation-seeking, impulsivity), we tested male and female transgenic mice expressing the most common human polymorphic variant ( $\alpha 5$ -SNP D398N;  $\alpha 5KI$ ) or a deletion of the *CHRNA5* gene ( $\alpha 5KO$ ), in the elevated-plus maze, novelty-place preference and step-down tasks. Alcohol consumption of both mutant strains was tested using an intermittent alcohol self-administration protocol. Finally, the implication of the  $\alpha 5$ -expressing IPN-GABAergic neurons in these changes was assessed using neurospecific lentiviral reexpression of the  $\alpha 5$  subunit in  $\alpha 5KOxGAD$ -Cre mice.

### Results

We found that  $\alpha 5KI$  and  $\alpha 5KO$  both showed alcohol over-consumption for highly concentrated solutions, while displaying opposite emotional profiles that strongly evoked Cloninger's typology of human AUD. While  $\alpha 5KI$  mice displayed Type I-like characteristics, i.e. mostly female, 'novelty avoidant' and high anxiety;  $\alpha 5KO$  exhibited Type II-like features such as sensation seeking, low anxiety and impulsivity. Viral reexpression of the  $\alpha 5$  subunit specifically in GABAergic neurons of the IPN decreased alcohol consumption and improved the impulsive-like phenotype observed in  $\alpha 5KO$ .

### Conclusions

Mutations of the  $\alpha 5$  subunit resulting in loss of  $\alpha 5^*$ nAChRs function shifted the alcohol consumption toward high doses. In contrast,  $\alpha 5$ -expressing IPN GABAergic neurons contributed to the control of this alcohol intake. We suggest that preclinical models expressing human genetic variants of  $\alpha 5^*$ nAChRs ( $\alpha 5KI$  and  $\alpha 5KO$  mice) can help to identify different motivations underlying AUDs, which could represent a major step toward the development of personalized and more effective treatments.

## 1. Introduction

Alcohol use disorder (AUD) is a world-wide problem, third-leading risk factor for premature death and disability (1), with still few effective treatments (2). Treatment development efforts in general have not taken into account heterogeneity in the etiology and maintenance of AUD, and broad ranging alcohol treatments may not be applicable to all subtypes of problem drinkers (3). Gaining a better understanding of the etiology and maintenance of AUD is thus critical. AUD is a multifactorial condition known to have a strong heritable component. Among genetic risk factors, human genetic studies have implicated gene variants in the *CHRNA5* gene, encoding the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit, in the risk of both nicotine and alcohol use disorders (4,5). For nicotine, the strongest association was found with a missense mutation ( $\alpha 5$ -SNP D398N) of the *CHRNA5* gene, for which the frequency in worldwide population is estimated at 28% and around 35% in Western population (6–8). Yet studies examining the influence of the  $\alpha 5$ -SNP on alcohol phenotypes have been inconclusive (9). At least one study has identified an association of the  $\alpha 5$ -SNP D398N with symptoms of alcohol use disorder in individuals of European descent (10) while others found no association with alcohol dependence (5,11–13). Still, there is a strong correlation between smoking and alcohol abuse; 90% of alcoholics smoke and alcohol dependence is 15 times more frequent in smokers than none smokers (14).

The  $\alpha 5$ -SNP of the *CHRNA5* changes codon 398 from GAT encoding Aspartate (D) to AAT encoding Asparagine (N) (D398N) and it has been shown to affect calcium permeability and concentration-response curves of receptor in cell culture studies (15,16). Rodent studies have revealed that the  $\alpha 5$ -nAChR subunit expression is highly restricted to specific brain regions known to be implicated in drug reward (VTA), aversion (MHb-IPN pathway), attention (mPFC) and memory (hippocampus) (17,18). The strongest expression is found in GABAergic neurons of the IPN (interpeduncular nucleus) (19,20). Similarly to human studies, rodent studies data about the  $\alpha 5$  subunit's implication in alcohol dependence-related mechanisms are mixed. Rats carrying the  $\alpha 5$ -SNP D398N self-administered more EtOH, required a higher dose of quinine to reduce their ethanol (EtOH) intake, and showed higher levels of reinstatement in response to EtOH and the cue together (21). While the loss of the  $\alpha 5$ -nAChR subunit in mice enhanced acute EtOH-responsive behaviors resulting in lower tolerance, such as EtOH-induced hypothermia and ataxia, hypnosis recovery time, and the anxiolytic-like response in mice; without changing the EtOH metabolism (22,23). Regarding alcohol seeking, the  $\alpha 5$  deletion was not found to modify EtOH drinking behavior in the Drinking-In-the-Dark (DID) (22,23). It

even attenuated EtOH conditioned place preference and reduced its intake in the DID following restraint stress (23). In contrast, a systemic overexpression of the  $\alpha 5$ -containing nAChRs ( $\alpha 5^*$ nAChRs) in mice, resulted in a reduction in EtOH self-administration without changing acute EtOH responses (24). Adolescent EtOH exposure resulted in persistent reduction of  $\alpha 5^*$ nAChRs in the posterior VTA of rats (25) and in human stem cells, exposure to low EtOH concentrations reduced *Chrna5* expression during early human development (26). Thus, mechanisms by which  $\alpha 5^*$ nAChRs may contribute to alcohol-dependence remain unclear. Moreover, as pointed in the Brynildsen & Blendy, 2021 review (9), human studies have already identified sex-specific effects in the influence of *CHRNA5* gene on for instance, neural reactivity to smoking cues and smoking cessation (27), and sex-specific effects of *CHRNA5* deletion on anxiety-like behavior have been identified in mice (28), as of yet, only one nicotine study in rodent models bearing the  $\alpha 5$ -SNP D398N has included females (29). Little is known about neuronal mechanisms underlying the  $\alpha 5$ -subunit x sex interaction while it could have important treatment implications. Moreover, in humans, alcohol abuse is associated with specific personality traits such as anxiety, sensation seeking and impulsivity. Each of these traits can be assessed using preclinical tasks which have been developed using mouse models, and show good predictive validity. However, preconsummatory traits are hardly ever assessed in drug studies. Therefore, using male and female mutant mice expressing either the human  $\alpha 5$ -SNP D398N ( $\alpha 5$ KI), or a deletion of the *CHRNA5* gene ( $\alpha 5$ KO), we sought to understand how  $\alpha 5$  mutations may modify behavioral processes and neural circuits involved in the vulnerability to AUDs.

First, we assessed whether the  $\alpha 5$  deletion or the  $\alpha 5$ -SNP D398N modify **preconsummatory traits** linked with alcohol abuse, namely anxiety, sensation-seeking and impulsivity, by comparing behavioral responses of the  $\alpha 5$ KO,  $\alpha 5$ KI and WT mice in the elevated-plus maze (EPM), novelty-place preference (NPP) and step-down (SD) tasks.

Second, we assessed whether the  $\alpha 5$  deletion or the  $\alpha 5$ -SNP D398N would influence the **alcohol drinking behavior** by comparing the oral EtOH self-administration levels of the  $\alpha 5$ KO,  $\alpha 5$ KI and WT mice in an EtOH intermittent access (IA) protocol covering a wide range of ethanol concentrations (3-60%).

Third, we studied the effects of the **neurospecific reexpression of the  $\alpha 5$  subunit in GABAergic neurons of the IPN** on impulsive-like and alcohol-drinking phenotypes of  $\alpha 5$ KO mice virally reexpressing either the  $\alpha 5$ -subunit or only GFP in IPN GABAergic neurons. We used

$\alpha 5\text{KO}-\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  and  $\alpha 5\text{KO}-\text{GFP}^{\text{IPN-GABA}}$  mice in the SD and EtOH IA tasks to assess whether the  $\alpha 5$ -reexpression in these neurons was sufficient to restore the impulsive-like and alcohol-drinking phenotypes to WT levels.



## 2. Methods and Materials

### 2.1. Animal models

The study was conducted on male and female  **$\alpha$ 5KI** mice, expressing the SNP D398N of the *CHRNA5* gene encoding for the  $\alpha$ 5-nAChR subunit (rs16969968) mutation (Forget et al. 2018);  **$\alpha$ 5KO** mice with a constitutive deletion of the *CHRNA5* gene (30) and their WT (C57BL6/J) controls. In tasks for which a behavioral phenotype was found, we used  **$\alpha$ 5KO x GAD-Cre**, i.e.  $\alpha$ 5KO receiving a Cre recombinase-activated lentiviral expression vector to drive  $\alpha$ 5<sup>WT</sup> exclusively in IPN GABAergic neurons. All WT,  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI mice used in this study were littermates bred in our laboratory from cross-breedings of heterozygous ( $\alpha$ 5<sup>+/-</sup>) mice.  $\alpha$ 5KO x GAD-Cre mice were generated by the Pasteur Institute and housed in our facility for at least 1 month in the same room as WT,  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI, matched for age and sex. Mice were housed by groups of 5 to 10 in collective cages (840cm<sup>2</sup> floor area) separated according to their sex and maintained at 22±1°C, under controlled hygrometrics and a 12:12 light-dark cycle (lights ON at 7:00 AM). They were provided with food and water *ad libitum*. One week prior the start of the first behavioral procedure, mice were isolated in individual cages and handled every day, over 3 minutes/day for 5 days, to reduce fear reactivity to the experimenter and non-specific experimental stress. All experiments were performed between 8:00 AM and 6:00 PM, and mice were between 3.5 and 7.5 months old at the time of experimental testing which corresponds to the mature adult age group (31).

This entire study was carried out with the approval of the Ethics Committee of the University of Bordeaux (CEE50) and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH) and the European Directive (2010/63/EU).

### 2.2. Experimental design

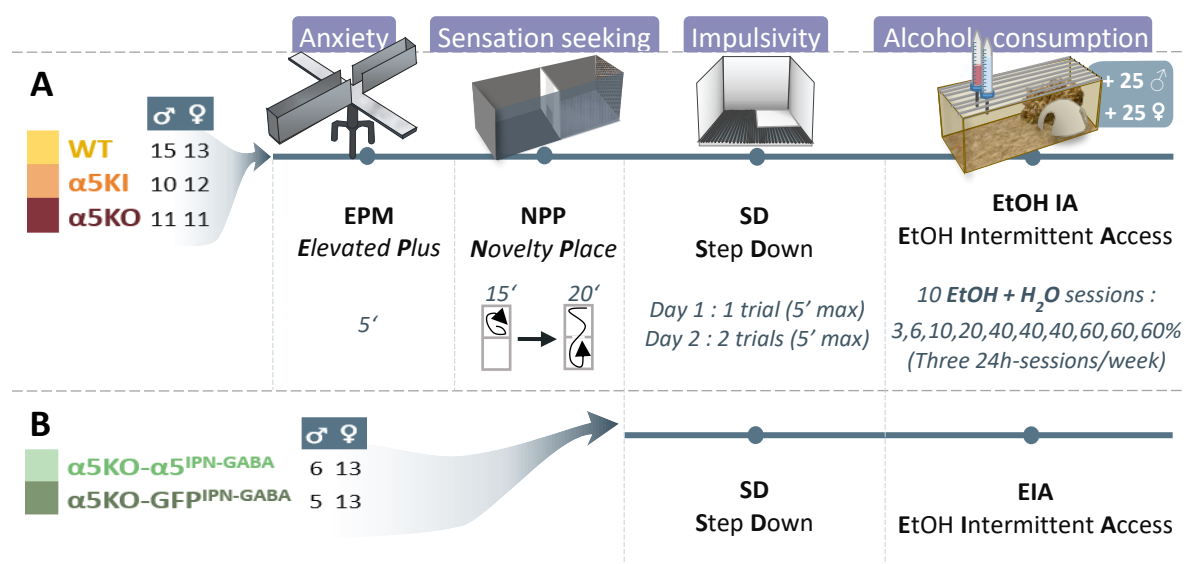
#### **Experiment 1: effects of $\alpha$ 5 mutations on AUD-related behavioral traits**

Twenty eight WT (15 ♂ 13 ♀), 22  $\alpha$ 5KI (10 ♂ 12 ♀) and 22  $\alpha$ 5KO (11 ♂ 11 ♀) mice were tested in a battery of three consecutive behavioral tasks to assess AUD relevant behavioral traits prior to any alcohol exposure: (1) the EPM = elevated plus maze for anxiety; (2) NPP = novelty place preference for sensation seeking; and (3) SD = step-down passive avoidance task for impulsivity. Followed by a fourth task assessing their oral and voluntary alcohol drinking behavior: (4) EtOH IA = EtOH intermittent access. The 72 mice had performed the four tasks

at a frequency of one behavioral task per week. Males and females were tested on separated days for the EPM, NPP and SD tasks but concurrently for the EtOH IA. 50 additional males and females of each genotype were included in the EtOH IA to address the oral consumption heterogeneity.

Forty-one other mice (WT: 7 ♂ 7 ♀,  $\alpha$ 5KI: 8 ♂ 7 ♀,  $\alpha$ 5KO: 6 ♂ 6 ♀) underwent the EtOH IA protocol for collection of blood ethanol concentration data relative to this protocol. Blood was collected twice, 30 min after the start of 40%-EtOH free access (2<sup>nd</sup> 40%-EtOH session) and then 30 min after the start of 60%-EtOH free access (2<sup>nd</sup> 60%-EtOH session).

We also collected blood from 42 naïve mice (WT: 9 ♂ 7 ♀,  $\alpha$ 5KI: 9 ♂ 6 ♀,  $\alpha$ 5KO: 6 ♂ 5 ♀) experiencing neither isolation, nor handling or behavioral task in order to assess the effect of both  $\alpha$ 5 mutations on basal plasmatic corticosterone levels (pCORT).



**Fig. 1. Overview of experiments 1 and 2**

(A): WT (in yellow),  $\alpha$ 5KI (in orange) and  $\alpha$ 5KO (in red) male and female mice were tested in three consecutive behavioral tasks to assess traits: (1) the EPM = elevated plus maze for anxiety; (2) NPP = novelty place preference for sensation seeking; and (3) SD = step-down passive avoidance task for impulsivity. Followed by a fourth task assessing their oral and voluntary alcohol drinking behavior: (4) EIA = EtOH intermittent access. 52 additional males and females were tested in the EIA. (B): Concurrently,  $\alpha$ 5KO mice virally reexpressing either the  $\alpha$ 5-subunit or only GFP specifically in IPN GABAergic neurons (respectively:  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5IPN-GABA in light green and  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN</sup>-GABA in dark green) were tested in the SD and the EIA.

## Experiment 2: effects of the neurospecific reexpression of the $\alpha 5$ subunit in GABAergic neurons of the IPN on impulsive-like and alcohol drinking behaviors in $\alpha 5$ KO mice

Thirty seven  $\alpha 5$ KO x GAD-Cre (11  $\sigma$  26  $\text{♀}$ ) mice underwent intra-IPN stereotaxic injections of lentivirus (LVs) expressing either bicistronic  $\alpha 5$ -IRES2-eGFP or enhanced green fluorescent protein (eGFP) cDNAs in order to express respectively: the  $\alpha 5$ -subunit ( $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  mice) or only GFP ( $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> mice) specifically in IPN GABAergic neurons.

About 7 weeks after stereotaxic surgery, these 19  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  (6  $\sigma$  13  $\text{♀}$ ) and 18  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> (5  $\sigma$  13  $\text{♀}$ ) were tested in the SD and the EtOH IA, concurrently to sex-matched WT,  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO of the first batch, following the exact same procedure.

### 2.3. Assessment of behavioral preconsumatory traits

**Elevated Plus-Maze test (EPM).** Anxiety-related responses were assessed in the elevated plus-maze test (EPM) for 5 min. The experimental device was a cross-shaped maze in opaque grey Plexiglas (60cm above the floor) made of two opposite *closed arms* (CA; length = 30cm, width = 7cm) with 17cm high walls, and two opposite *open arms* (OA; length = 30cm, width = 7cm) without walls, connected by a 70 lux illuminated central square. Briefly, mice were placed for 5 sec inside a cylinder (25cm high,  $\text{Ø} = 10\text{cm}$ ) in the central square. Once the cylinder removed, the videotracking system (Anymaze®, France) automatically started to record the time spent in the open arms (OA TIME) and their extremities (Ex TIME). The mouse was considered to be entered or taken out of an arm when the hind legs were engaged beyond the dividing limit with the central area. The device was cleaned with 70% EtOH solution before and after each mouse trial to avoid olfactive disturbance. The recorded parameters (OA TIME and Ex TIME) were then expressed in cumulated sec per time segments of 30 sec and in percentage on total test time (divided by 300 sec).

**Novelty Place Preference (NPP).** The novelty Place Preference or NPP test (32) was conducted in an opaque grey Plexiglas box (42x14x20cm) divided in two compartments differing in their colors and textures, and separated by a vertically sliding door. One compartment consisted of two white walls, two grey walls and a smooth black floor; the other consisted of three grey walls, one silver wall with circular hollows and a dark blue floor in woven plastic. The mouse was first accustomed for a 15 min to one of the two compartments that became the *familiar compartment* (FC). The FC was counterbalanced between mice, and the number of entries in its center and corners was recorded by Anymaze®. At the end of the

15 min-habituation, the central door was opened giving access to the *novel compartment* (NC). The mouse was free to explore the entire box for 20 min during which the NC entry latency and the time spent in FC and NC were recorded by Anymaze® (in a new videotracking files). We then used the difference between NC time and FC time as a place preference score for novelty (NPP score). A positive score reveals a preference, while a negative score reveals an avoidance of the new compartment.

**Step-Down Inhibitory passive avoidance task (SD).** The Step-Down Inhibitory Passive Avoidance Task evaluates the ability of a mouse to inhibit its natural exploratory response in order to avoid an aversive stimulus (33). The mouse was placed on an “escape platform”, in a conditioning chamber it has never visited before, consisting in a rectangular Plexiglas chamber (45x30x25cm) with 72 stainless steel rods (3mm) spaced 5mm apart and connected to an electric shock generator. Rodents naturally express an exploration behavior but during this test, if the mouse comes down from the platform where it is originally dropped, an intermittent electric shock (0.8 mA, 1 sec) is delivered through the ground until the mouse comes back on the starting platform (named “escape platform”) marking the end of the trial. Impulsivity was measured as the mouse's ability to inhibit its natural exploration behavior. On the first day, one acquisition trial measured the step-down latency (SDL = time in sec before getting down from the platform) and the escape latency (EL = time in sec before returning and staying on the platform). These two parameters were re-evaluated during the next two trials, 24 and 26 hours after acquisition, and the freezing time displayed on the platform was also measured and then expressed in percentage of time relative to the total test time (which varied between mice).

#### 2.4. Intermittent oral EtOH self-administration

**Dose-response curve (3-60% EtOH).** EtOH intermittent access protocol (EtOH IA) consisted of giving intermittent 24h-access to EtOH on alternating days of the week with water available *ad libitum* (34,35). The water bottle of experimental mice (in individual cages) was replaced by two smaller homemade water bottles (Falcon™ 50 ml conical centrifuge tubes with attached caps and steel teat). After one week of habituation (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O), water in one of the two bottles was replaced by an EtOH solution for 24h (EtOH/H<sub>2</sub>O), every other day. The two bottles were weighed before and after each EtOH/H<sub>2</sub>O session to determine the EtOH, H<sub>2</sub>O and total fluid drinking volumes. Mice were also weighed at one-tenth of a gram before each EtOH/H<sub>2</sub>O session to express EtOH intake (EI) in grams of EtOH per kilogram of mice

(g/kg/24h). At the end of the EtOH/H<sub>2</sub>O session, the EtOH bottle was emptied, thoroughly rinsed and filled with water for the next 24h-session. Mice had access to EtOH for two 24h-sessions per week, during 4 weeks and bottles positions were regularly reversed to avoid position preference bias. EtOH concentration was gradually increased from 3 to 60% with 3 sessions at EtOH 40% and 60% (total number of EtOH/H<sub>2</sub>O sessions: 10). Two dose-response curves describing the evolution of EI (in g/kg/24h) and EP ratio (EtOH preference ratio = EtOH drinking volume divided by total fluid drinking volume) in function of the EtOH concentration were calculated.

## 2.5. Blood assays

**Blood collection.** Blood collection was performed under deep general anaesthesia (isoflurane 4% in pure oxygen), either from the submandibular vein or, at the end of the general procedure, from the trunk after decapitation. The blood was immediately collected in tubes containing EDTA 10% (to prevent clotting) and centrifuged at 4°C for 10 min (3000 RCF, 121 mm ROTOR, 4705 rpm). Plasma was then transferred into fresh tubes and stored at -80°C until used for CORT and BEC analysis.

**pCORT assessment.** Total plasma corticosterone levels were assayed using the DetectX<sup>®</sup> Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (sensitivity: 20.9 pg/mL; Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples and standards were run in duplicates, and the coefficient of variance among the duplicates was less than 15%.

**BEC assessment.** Plasmatic EtOH levels were assayed using the EnzyChrom<sup>™</sup> Ethanol Assay Kit (ECET-100) purchased from BioAssay systems (sensitivity: 0.0008 vol %; Hayward, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. All samples and standards were run in duplicates.

## 2.6. Lentiviral re-expression of the $\alpha 5$ -nAChR subunit in IPN<sup>GABA</sup> neurons of $\alpha 5$ KO

**Construction of lentiviral vectors.** The bicistronic expression of mouse wild-type  $\alpha 5$  subunit cDNAs and the eGFP cDNA were under the lentiviral re-expression. The lentiviral expression vectors were derived from the pHR's expression vectors first described by (36) with several subsequent modifications (37). The IRES element (Internal Ribosome Entry Site) enables the coordinated expression of two genes within the same vector, allowing the monitoring of the delivery of the gene of interest using eGFP visualization. Bicistronic

expression of mouse WT  $\alpha 5$  cDNAs and the eGFP cDNA were under the control of the mouse phosphoglycerate kinase (PGK) promoter. Viral particles were generated by co-transfection of HEK-293T cells by the vector plasmid, a packaging plasmid and an envelope plasmid using Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. At 2 days after transfection, viral particles were harvested in the supernatant, treated with DNaseI and MgCl<sub>2</sub>, filtered through 0.45  $\mu$ m pores, concentrated by ultracentrifugation and re-suspended in a small volume of phosphate-buffered saline (PBS). Viral stocks were stored in small aliquots at -80°C before use. Viral titers were estimated by quantification of the p24 capsid protein using HIV-1 p24 antigen immunoassay (ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

To create the pTrip!U3-PGK- $\alpha 5$ -IRES2-eGFP, a two-step strategy was used. First, the  $\alpha 5$  cDNA from pCS2+ plasmid, was cloned into the pIRES2-eGFP expression plasmid (Clontech) between XhoI and EcoRI of the multiple cloning sites. Then, in the pre-existing pTRIP- $\beta 2$ -IRES2-eGFP lentiviral vector the fragment coding for  $\beta 2$ -IRES2-eGFP was replaced by the fragment  $\alpha 5$ -IRES2-eGFP between the XhoI and BsrGI sites. Further details can be found in (37,38).

**Lentiviral re-expression.**  $\alpha 5$ KO x GAD-Cre (n=37) mice were injected bilaterally into the IPN with LVs expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP;  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> mice, n=18) or bicistronic  $\alpha 5^{WT}$ -IRES2-eGFP ( $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{IPN-GABA}$  mice, n=19) cDNAs. Vectors carrying either  $\alpha 5$ -IRES2-eGFP or only eGFP under control of the PGK promoter (phosphoglycerate kinase) were used to generate viral particles in HEK-293T cells. Immediately before stereotaxic injections, lentiviruses were diluted in PBS to achieve a dose of injection of 1.7-1.9 x10<sup>6</sup>TU in 2 $\mu$ l (equivalent to 150ng of p24 protein for bi-cistronic viruses). To create the conditional lentivectors the same sub-cloning strategy was used. In the previously described lentivector pTrip PDGF-floxed-mCherry-eGFP-WPRE we took advantage of the compatibility between Sall and XhoI restriction sites to replace the eGFP cDNA by the fragment coding for the  $\alpha 5$  subunit.

**Lentivirus stereotaxic injections.**  $\alpha 5$ KO x GAD-Cre mutant mice aged of 10 weeks were anaesthetized using 250 $\mu$ l of ketamine (Merial, France)/xylazine 0.05% (Bayer Healthcare, France) in PBS and placed into a stereotaxic frame. Lentivirus (2 $\mu$ l at 75ng p24 protein per  $\mu$ l for bicistronic lentiviral vectors and 2 $\mu$ l at 25ng p24 protein per  $\mu$ l for eGFP vector) was injected bilaterally at: antero-posterior +0.2 mm from lambda, lateral:  $\pm 0.0$  mm from sagittal line, and -3.5 mm from the surface. All procedures were approved by Animalerie Centrale and

Medecine du Travail, Institut Pasteur and the authors carrying out surgery hold an Animal Surgery Authorization from the French Ministry of Agriculture.

**Histological controls.** Lentiviral re-expression was controlled at the end of the behavioral procedure by histological analysis of eGFP expression. Mice were euthanized by decapitation under deep general anaesthesia (isoflurane 4% in pure oxygen). Brains were quickly removed and incubated at 4°C in a 10% formol-saccharose solution. 24 hours later, they were incubated 48 hours in a 30% formol-saccharose solution before being cut into coronal 50µm slices with a freezing microtome (Leica). Sections were mounted on gelatin coated slides and coverslipped with Eukitt to be finally examined through fluorescence microscopy.

## 2.7. Statistics

All data were expressed as mean ± SEM and normal distribution of data was tested with the Kolmogoroff-Smirnov test. Statistical analyses were first performed using two or three-way analyses variance (ANOVA), with two between-subject factors: 'genotype' (WT, α5KO, α5KI) and 'sex' (males, females) and one within-subject factor with repeated measures depending on the studied parameter: 'delay' (time in sec or min), 'zone' (corner, center), 'trial' (acquisition, trial 24h, trial 26h), 'dose' (3, 6, 10, 20, 40, 40, 40, 60, 60, 60%). To analyse the genotype effect specific to each sex, we performed one or two-way ANOVA with one between-subject factor 'genotype' (WT, α5KO, α5KI) and one within-subject factor with repeated measures depending on the studied parameter as described above. For all ANOVA, Post-hoc Bonferroni/Dunnett's multiple comparisons analyses were performed when adequate. We also performed direct comparison between male and female WT data using one or two-way ANOVA with the one between-subject factor 'sex' (males, females) and one within-subject factor with repeated measures depending on the studied parameter. For zone entries % data in NPP habituation, the paired t-test was used to determine whether the center entries % differed significantly from corners entries %. For correlations, simple linear regression analyses were performed with BAC as dependant variable and EI as independent variable. For all tests,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 1. Results

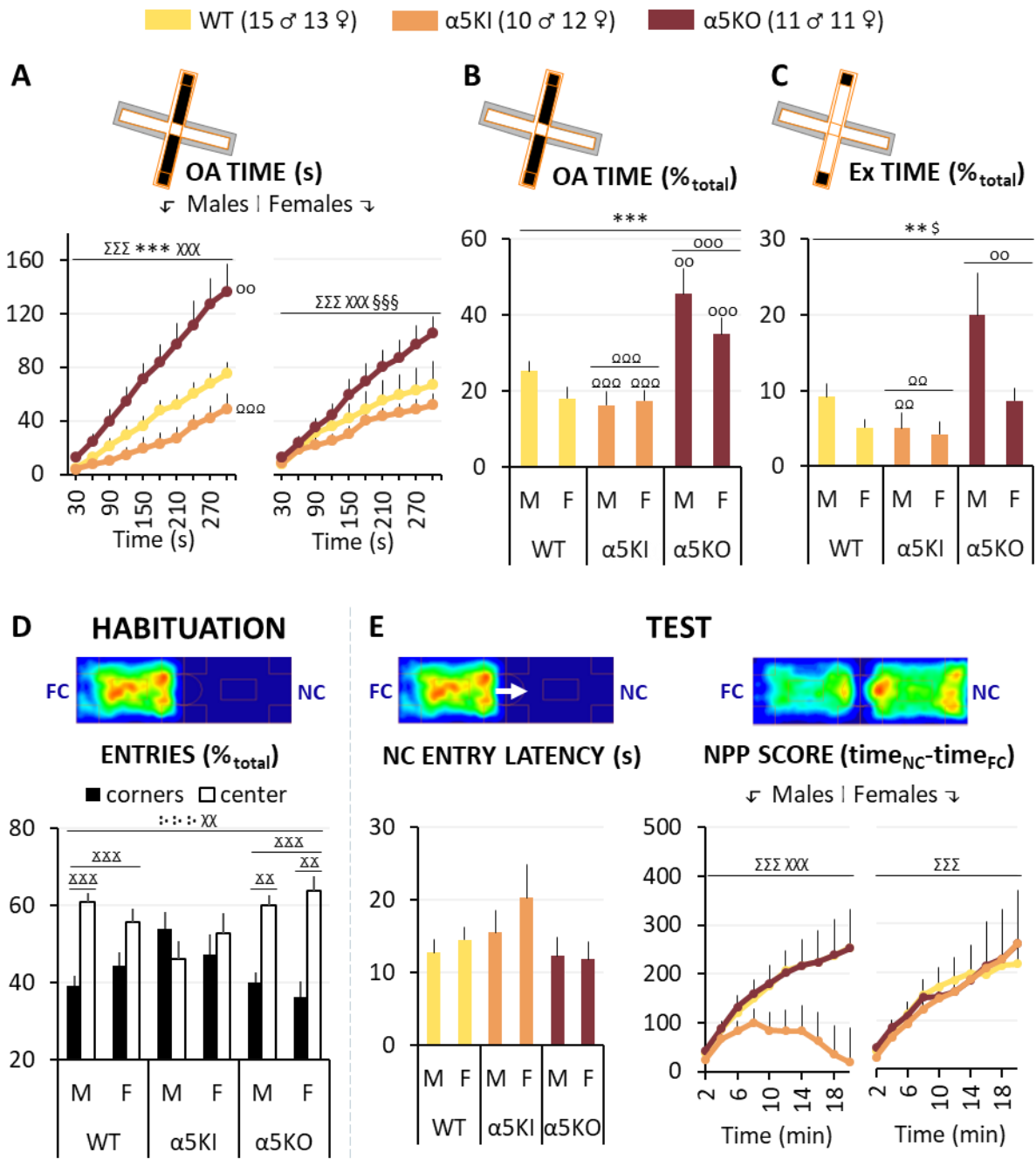
### **Experiment 1: effects of $\alpha 5$ mutations on AUD-related behavioral traits and alcohol-drinking behavior**

#### *Anxiety-like phenotype of $\alpha 5$ KI and $\alpha 5$ KO mice*

WT males and females showed similar progressive increase in time spent in the EPM open arms (OA; delay effect:  $F(9,594)=165.57$ ,  $p<0.0001$ ; sex effect:  $p=0.96$ , ns; **figure 2A**). They spent  $22\pm 2\%$  of the total test time in open arms (OA), and  $7\pm 1\%$  in their extremities (Ex) with females spending about half time less than males (M:  $25\pm 3\%$ , F:  $18\pm 3\%$ ; sex effect:  $p=0.076$  ns, **figure 2B**; M:  $9\pm 2\%$ , F:  $5\pm 1\%$ ; sex effect:  $p=0.080$  ns, **figure 2C**).

Concerning nicotinic mutants, both  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI differed from their WT littermates but in an opposite way, leading to a highly significant genotype effect on the three recorded parameters (OA time s:  $F(2,66)=10.25$ ,  $p=0.0001$  with delay x genotype interaction:  $p<0.0001$ ; OA time %:  $F(2,66)=17.98$ ,  $p<0.0001$ ; Ex time %:  $F(2,66)=6.39$ ,  $p=0.0029$ ; **figure 2A-C**). Indeed,  $\alpha 5$ KO spent significantly more time than WT and  $\alpha 5$ KI in the OA ( $40\pm 4\%$  vs  $22\pm 2\%$  vs  $18\pm 2\%$ ;  $\alpha 5$ KO vs WT:  $p<0.0001$ ,  $\alpha 5$ KO vs  $\alpha 5$ KI:  $p<0.0001$ ; cumulated in sec,  $\alpha 5$ KO vs WT:  $p=0.0020$ ,  $\alpha 5$ KO vs  $\alpha 5$ KI:  $p<0.0001$ , **figure 2A,B**) and their end (Ex % time:  $14\pm 3\%$  vs  $7\pm 1\%$  vs  $5\pm 1\%$ ;  $\alpha 5$ KO vs WT:  $p=0.0085$ ,  $\alpha 5$ KO vs  $\alpha 5$ KI:  $p=0.0011$ , **figure 2C**). Conversely,  $\alpha 5$ KI tended to spend as much or less time than WT in the OA ( $18\pm 2\%$  vs  $22\pm 2\%$ , **figure 2A,B**) and their end (Ex% time:  $5\pm 1\%$  vs  $7\pm 1\%$ , **figure 2C**).





**Fig. 2. Anxiety and sensation seeking-like phenotypes in α5KI and α5KO mice**

(A-C): anxiety-related behavior as assessed with time spent on the EPM open arms (OA) per time segments (A) or on total test time (B), and on their extremities (Ex; C). (D-E): Sensation seeking-related behavior indicated by the novel compartment (NC) entry latency (E, left) and the novelty place preference (NPP) score (E, right) during test trial. (D): Anxiety-related behavior in response to the introduction inside the NPP apparatus indicated by relative percentage of entries in the corners versus the center of the habituation compartment (FC).  $\Sigma\Sigma\Sigma p \leq 0.001$ : delay effect;  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ : genotype effect;  $\$p \leq 0.05$ : sex effect;  $\chi\chi p \leq 0.01$ ,  $\chi\chi\chi p \leq 0.001$ : delay x genotype interaction;  $\$ \$ \$ p \leq 0.001$ : delay x sex interaction;  $o o p \leq 0.01$ ,  $o o o p \leq 0.001$ : α5KO vs WT (bonferroni post-hoc);  $Q Q p \leq 0.01$ ,  $Q Q Q p \leq 0.001$ : α5KI vs α5KO (bonferroni post-hoc);  $\cdot \cdot \cdot p \leq 0.001$ : zone x genotype interaction;  $\chi\chi p \leq 0.01$ ,  $\chi\chi\chi p \leq 0.001$ : FC center vs FC corners entries % (paired t test).

In both sex groups,  $\alpha$ 5KO displayed a hypoanxious response as compared to their sex-matched WT while on the contrary  $\alpha$ 5KI tended to be more anxious. These effects were more pronounced in males than in females. Both  $\alpha$ 5KO males and females showed a sharp increase in the time spent in the OA, while  $\alpha$ 5KI showed a more moderate one, as expressed by significant delay x genotype interactions (M:  $F(18,297)=7.99$ ,  $p<0.0001$ ; F:  $F(18,297)=3.50$ ,  $p<0.0001$ ; **figure 2A**). The global genotype effect for these parameter reached statistical significance only in males (M:  $F(2,33)=9.37$ ,  $p=0.00060$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.0030$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0002$ ; F:  $p=0.10$  ns; delay x sex interaction:  $F(9,594)=2.99$ ,  $p=0.0017$ ), as for the Ex time (M:  $F(2,33)=4.41$ ,  $p=0.019$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.027$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0084$ ; F:  $p=0.13$  ns; sex effect:  $F(1,66)=6.45$ ,  $p=0.013$ ; **figure 2C**). The total OA time % was significantly higher in  $\alpha$ 5KO than WT and  $\alpha$ 5KI in both sex analyzed separately (M:  $F(2,33)=9.49$ ,  $p=0.0006$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.0020$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0002$ ; F:  $F(2,33)=8.46$ ,  $p=0.0008$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.0009$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0008$ ; **figure 2B**).

#### *Sensation seeking-like phenotype in the NPP*

WT males and females both showed a marked preference toward NC over FC, as revealed by positive NPP scores progressively increasing over test time (delay effect:  $F(9,594)=20.14$ ,  $p<0.0001$ ; **figure 2E right**). Their NC entry latency was around  $14\pm 1$  sec, with no significant difference between males and females (M:  $13\pm 1$ , F:  $16\pm 2$  sec, **figure 2E left**).

Compared to WT,  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI mice displayed no significant differences, neither in their NPP scores, nor in their NC latencies of entry (**figure 2E**). However, in contrast with WT and  $\alpha$ 5KO males, the NPP score of  $\alpha$ 5KI males clearly decreased over test time (**figure 2E right**). In support, the one-way analysis performed on males data revealed a significant delay x genotype interaction ( $F(18,297)=2.49$ ,  $p=0.0008$ ). Moreover, we found different behavioral responses between  $\alpha$ 5KO,  $\alpha$ 5KI and WT to the habituation phase (15min-familiarization to FC) statistically expressed by a significant zone x genotype interaction ( $F(2,66)=5.28$ ,  $p=0.0074$ , **figure 2D**). Indeed, WT males and females crossed the FC center more often than the FC corners ( $58\pm 2\%$  vs  $41\pm 2\%$ , paired t-test:  $p=0.0005$ ). This effect was exacerbated in  $\alpha$ 5KO ( $62\pm 2\%$  vs  $38\pm 2\%$ , paired t-test:  $p<0.0001$ ) and inversely attenuated in  $\alpha$ 5KI ( $50\pm 3\%$  vs  $50\pm 3\%$ , paired t-test:  $p=0.95$  ns).

Separately, we found that  $\alpha$ 5KO males, similarly to WT males, crossed the center significantly more often than the corners of the FC ( $\alpha$ 5KO:  $60\pm 3\%$  vs  $40\pm 3\%$ , paired t-test:  $t(14)=4.22$ ,  $p=0.0040$ ; WT:  $61\pm 3\%$  vs  $39\pm 3\%$ , paired t-test:  $t(10)=3.70$ ,  $p=0.0009$ , **figure 2D**), while  $\alpha$ 5KI males tended to do the opposite ( $46\pm 4\%$  vs  $54\pm 4\%$ , paired t-test:  $p=0.41$  ns). In females,  $\alpha$ 5KI and WT the FC center as frequently or more than its corners (no significant difference between center and corners entries %;  $\alpha$ 5KI:  $53\pm 5\%$  vs  $47\pm 5\%$ , paired t-test:  $p=0.60$  ns; WT:  $56\pm 3\%$  vs  $44\pm 3\%$ , paired t-test:  $p=0.12$  ns; **figure 2D**), while  $\alpha$ 5KO crossed significantly more often the FC center than its corners ( $64\pm 4\%$  vs  $36\pm 4\%$ , paired t-test:  $t(10)=3.50$ ,  $p=0.0056$ ).

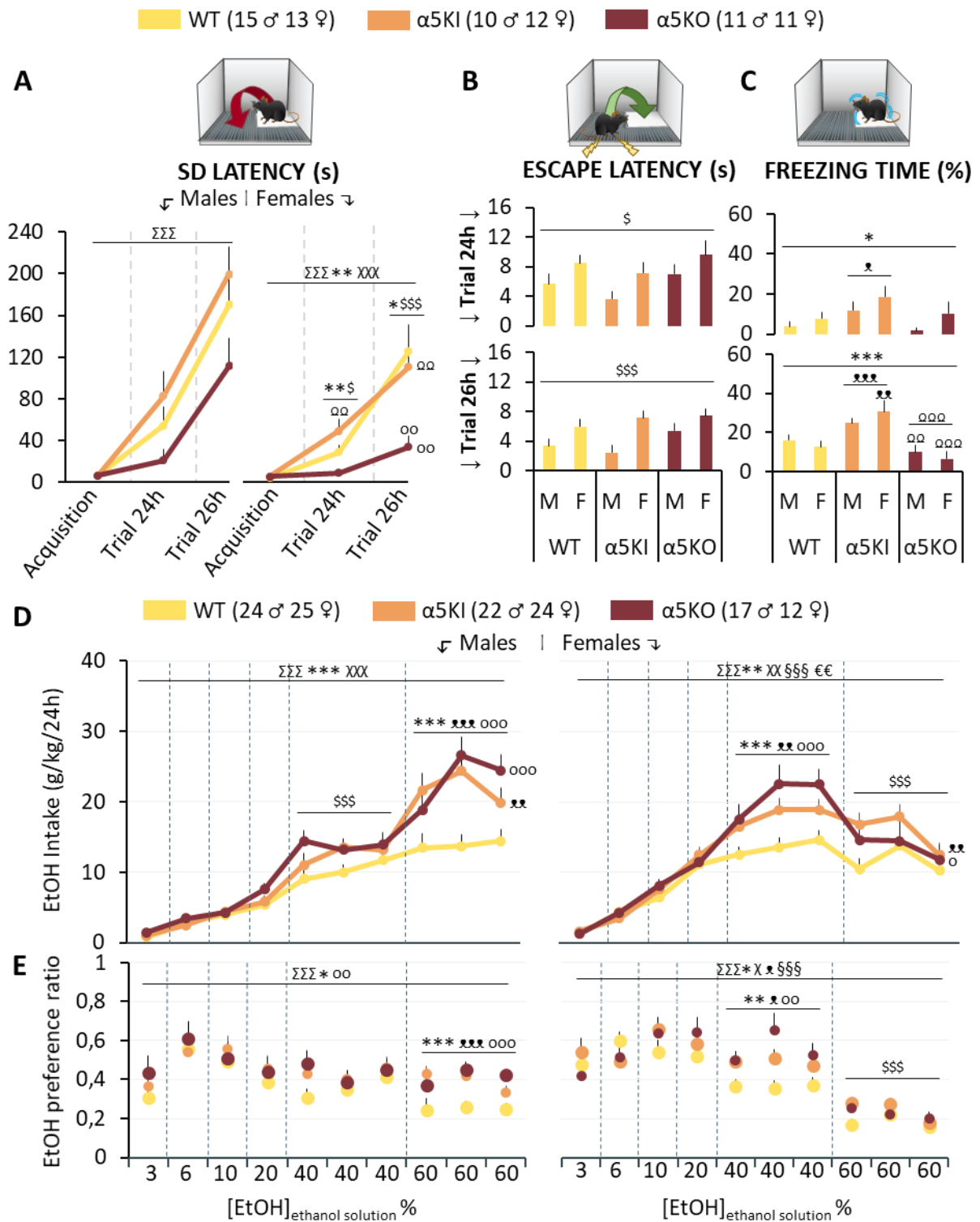
### *Impulsive-like phenotype in the SD*

During the acquisition trial, WT males and females jumped down from the platform after  $5\pm 0.5$  sec (SDL= step-down latency) and took on average  $31.7\pm 4$  sec to come back and stay on it (EL= escape latency; **figure 3A,B**). WT females exhibited significantly lower SDL and higher EL as compared to WT males (SDL:  $3.9\pm 0.4$  vs  $5.9\pm 0.8$ ,  $F(1,26)=4.55$ ,  $p=0.042$ ; EL:  $46\pm 7$  vs  $19\pm 2$ ,  $F(1,26)=16.19$ ,  $p=0.0004$ ; **figure 3A,B**). But the following significant increase of the SDL, combined to the significant decrease of the EL observed in both sex 24 and 26h later indicated that all WT properly learnt the task (trial effect on SDL, M:  $F(2,66)=70.22$ ,  $p<0.0001$ , F:  $F(2,66)=37.88$ ,  $p<0.0001$ ; trial effect on EL, M:  $F(2,66)=54.63$ ,  $p<0.0001$ , F:  $F(2,66)=64.36$ ,  $p<0.0001$ ; **figure 3A,B**): they all waited longer than the previous day before getting down from the platform but also went back faster on it.

Analysis of SDL and EL revealed no significant difference in either  $\alpha$ 5KO or  $\alpha$ 5KI compared to WT during the acquisition trial (SDL, WT:  $5\pm 0.5$ ,  $\alpha$ 5KO:  $6\pm 1$ ,  $\alpha$ 5KI:  $6\pm 1$ ; EL, WT:  $31.7\pm 4$ ,  $\alpha$ 5KO:  $28.6\pm 5$ ,  $\alpha$ 5KI:  $26.4\pm 5$ ; **figure 3A,B**), and they all exhibited significant increases of their SDL and decreases of their EL on the following trials (trial effect on SDL,  $\alpha$ 5KO:  $p<0.0001$ ,  $\alpha$ 5KI:  $p<0.0001$ ; trial effect on EL,  $\alpha$ 5KO:  $p<0.0001$ ,  $\alpha$ 5KI:  $p<0.0001$ ). There was no significant difference between the EL of the WT,  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI in the trials at 24 and 26h (**figure 3B**). Nevertheless, we noticed that  $\alpha$ 5KI males and females took longer than WT to step down from the platform, while  $\alpha$ 5KO stepped down earlier than WT and  $\alpha$ 5KI at trial 24h (genotype effect:  $F(2,66)=5.58$ ,  $p=0.0057$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0018$ ; **figure 3A**). During this trial, we also recorded the freezing % expressed on the platform (before stepping down from it) and found that  $\alpha$ 5KI males and females expressed more freezing than WT (genotype effect:  $F(2,66)=3.61$ ,  $p=0.032$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.012$ ; **figure 3C top**). During the last trial (26h post-acquisition), the SDL of  $\alpha$ 5KI and WT mice increased dramatically (respectively:  $64\pm 13$  and  $42\pm 11$  sec vs  $150\pm 19$  and

144±18 sec) compared to those of  $\alpha$ 5KO (15±11 vs 72±11 sec; **figure 3A**). These differences were supported by another significant genotype effect on SDL at trial 26h ( $F(2,66)=6.39$ ,  $p=0.0029$ ;  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.0033$ ;  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0029$ ) and a global genotype effect ( $F(2,66)=7.35$ ,  $p=0.0013$ ) with a trial x genotype interaction ( $F(4,132)=5.00$ ,  $p=0.009$ ) in repeated measures ANOVA including the 3 trials. Again, as in the trial at 24h,  $\alpha$ 5KI displayed higher anxiety as compared to WT and  $\alpha$ 5KO, with higher freezing rates ( $F(2,66)=13.35$ ,  $p<0.0001$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.0004$ ;  $\alpha$ 5KI vs  $\alpha$ 5KO:  $p<0.00010$ ; **figure 3C bottom**).

In both sexes,  $\alpha$ 5KO displayed lower behavioral control (i.e. decreased SDL) as compared to their sex-matched WT while  $\alpha$ 5KI displayed as much or more control (increased SDL); but these SDL differences were only significant in females (M:  $p=0.065$  ns; F:  $F(2,33)=5.90$ ,  $p=0.0064$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.0060$ ,  $\alpha$ 5KO vs  $\alpha$ 5KI:  $p=0.0043$ , trial x genotype interaction:  $F(4,66)=4.50$ ,  $p=0.0028$ ; **figure 3A**). The two-way (genotype and sex) analysis on repeated measures revealed a significant sex effect ( $F(1,66)=11.64$ ,  $p=0.0011$ ) with a strong trial x sex interaction ( $F(2,132)=9.23$ ,  $p=0.0002$ ) for the SDL parameter. This latter was due to significant sex differences in  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI but not in WT mice: though the 3 trials  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI females exhibited shorter SDL than  $\alpha$ 5KO and  $\alpha$ 5KI males (sex effect in  $\alpha$ 5KO:  $F(1,20)=7.01$ ,  $p=0.015$ ,  $\alpha$ 5KI:  $F(1,20)=5.78$ ,  $p=0.026$  and WT:  $p=0.19$  ns) and thus potentially less behavioral control than their sex-matched males. Finally, the total freezing time % is significantly higher in  $\alpha$ 5KI than WT and  $\alpha$ 5KO in both sex analysed separately (M:  $F(2,33)=7.04$ ,  $p=0.0028$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.012$ ,  $\alpha$ 5KI vs  $\alpha$ 5KO:  $p=0.00080$ ; F:  $F(2,33)=6.54$ ,  $p=0.0040$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.0049$ ,  $\alpha$ 5KI vs  $\alpha$ 5KO:  $p=0.0028$ ; **figure 3C**) and no sex effect was found for this parameter.



**Fig. 3. Impulsive-like and alcohol drinking behaviors in α5KI and α5KO mice.**

(A-C): Impulsivity-related behavior assessed in the step-down (SD) task and indicated by the SD latency: the ability to inhibit exploration behavior by staying as long as possible on the platform (A). (B): time takes to return on the platform and during which electrical shocks are delivered, for the trials performed 24h (top) and 26h (bottom) after acquisition. (C): Anxiety-related behavior induced by the SD task and indicated by the freezing time expressed on the platform during the trials at 24h (top) and 26h (bottom). (D-E): Dose-response curves of oral EtOH intake (EI; g/kg/24h) and EtOH preference

ratio (over water; EP) in males (left) and females (right).  $\Sigma\Sigma\Sigma p \leq 0.001$ : trial/dose effect;  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ : genotype effect;  $\$p \leq 0.05$ ,  $\$\$\$p \leq 0.001$ : sex effect;  $\chi p \leq 0.05$ ,  $\chi\chi p \leq 0.01$ ,  $\chi\chi\chi p \leq 0.001$ : trial/dose x genotype interaction;  $\$\$\$\$p \leq 0.001$ : sex x dose interaction;  $\text{€€}p \leq 0.01$ : sex x dose x genotype interaction;  $op \leq 0.05$ ,  $oop \leq 0.01$ ,  $oopop \leq 0.001$ :  $\alpha 5KO$  vs WT (bonferroni post-hoc);  $\text{xp} \leq 0.05$ ,  $\text{xxp} \leq 0.01$ ,  $\text{xxxp} \leq 0.001$ :  $\alpha 5KI$  vs WT (bonferroni post-hoc);  $\text{opop} \leq 0.01$ ,  $\text{opopop} \leq 0.001$ :  $\alpha 5KI$  vs  $\alpha 5KO$  (bonferroni post-hoc).

### *Alcohol drinking behavior in the EtOH IA protocol*

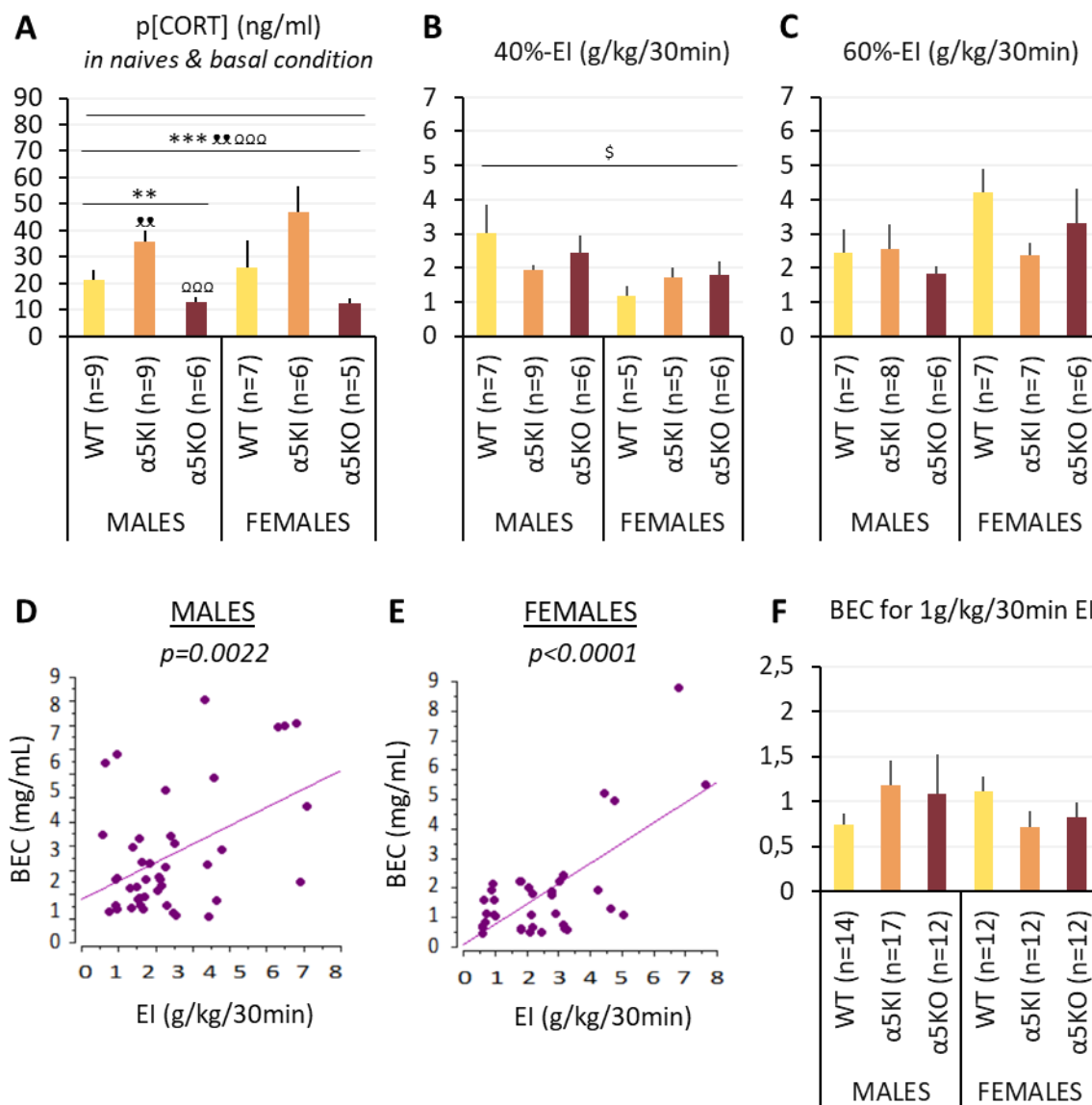
WT males and females voluntarily drank EtOH solutions from the 1<sup>st</sup> to 10<sup>th</sup> session. They showed EI (EtOH intake) and EP ratio (EtOH preference) data from  $1.04 \pm 0.1$  g/Kg/24h and  $0.39 \pm 0.05$  with the EtOH solution at 3%, to  $12.3 \pm 1.2$  g/Kg/24h and  $0.20 \pm 0.02$  at 60%. EI progressively increased with the EtOH concentration in both males and females but there was a leftward shift in the dose effect in the latter, leading to a significant sex x dose interaction ( $F(9,1044)=21.61$ ,  $p < 0.0001$ ; **figure 3D**): WT females exhibited higher EI than WT males for EtOH solutions from 3 to 40%, but it bluntly decreased at 60% while still increasing in males. Consistently, EP ratios were higher in WT females than in WT males from the session at 3% to the 2<sup>nd</sup> session at 40%, then EP ratios tended to be higher in WT males than in WT females (sex x dose interaction:  $p = 0.051$ ; **figure 3E**). In terms of total fluid intake (EtOH + H<sub>2</sub>O), we found that on a 24h-period mice drank a mean volume of 3 ml with no difference between males and females. Since females are lighter than males (F:  $25 \pm 0.1$ g vs M:  $33 \pm 0.2$ g,  $F(1,116)=146.67$ ,  $p < 0.0001$ ), female WT showed higher total fluid intake than male WT when reported to the weight (F:  $2.6 \pm 0.05$ ml/20g vs M:  $2.0 \pm 0.3$ ml/20g,  $F(1,46)=46.74$ ,  $p < 0.0001$ ).

Dose-response curves for EI and EP ratio were highly modified by the two  $\alpha 5$  mutations (genotype effect on EI:  $F(2,116)=14.32$ ,  $p < 0.0001$  and EP:  $F(2,116)=8.53$ ,  $p = 0.0003$  dose-response curves; **figure 3D,E**). Both  $\alpha 5KO$  and  $\alpha 5KI$  mice showed higher EI and higher EP ratio than WT for the sessions with 40 and 60% EtOH but did not differ from WT for the sessions with 3, 6, 10 and 20% EtOH. No difference compared to WT was found in term of total fluid intake ( $\alpha 5KO$ :  $2.4 \pm 0.05$ ,  $\alpha 5KI$ :  $2.4 \pm 0.04$ , WT:  $2.3 \pm 0.03$  ml/20g). Importantly,  $\alpha 5$  mutations differently modified EtOH consumption depending on sex, as supported by sex x dose interactions for the EI and EP parameters (EI:  $F(9,1044)=21.61$ ,  $p < 0.0001$  and EP:  $F(9,1044)=7.30$ ,  $p < 0.0001$ ). Indeed,  $\alpha 5KO$  and  $\alpha 5KI$  males differed the most from WT males at concentration as high as 60%, with respective 60%-EI of  $23.3 \pm 1$  and  $21.9 \pm 1$  versus  $13.8 \pm 1$

g/kg/24h in WT (3 sessions at 60%,  $F(2,58)=9.82$ ,  $p=0.0002$ ,  $\alpha5KO$  vs WT:  $p=0.0003$ ,  $\alpha5KI$  vs WT:  $p=0.0006$ ; **figure 3D left**) and respective 60%-EP ratio of  $0.42\pm0.02$  and  $0.39\pm0.02$  versus  $0.25\pm0.02$  in WT (3 sessions at 60%,  $F(2,58)=9.33$ ,  $p=0.0003$ ,  $\alpha5KO$  vs WT:  $p=0.00040$ ,  $\alpha5KI$  vs WT:  $p=0.00070$ ; **figure 3E left**). At this concentration in females, only  $\alpha5KI$  significantly differed from the WT with EP ratio of  $0.25\pm0.02$  versus  $0.18\pm0.02$  in WT (and  $0.2\pm0.02$  in  $\alpha5KO$ ; genotype effect:  $F(2,58)=3.18$ ,  $p=0.048$ ;  $\alpha5KI$  vs WT:  $p=0.015$ ,  $\alpha5KO$  vs WT:  $p=0.19$  ns; **figure 3E right**). Contrary to males, the genotype effect on 60%-EI did not reach significance in females (**figure 3D right**). Both  $\alpha5KO$  and  $\alpha5KI$  females differed the most from WT females at concentration as high as 40%, with respective 40%-EI of  $20.9\pm1$  and  $18.1\pm1$  versus  $13.6\pm1$  g/kg/24h in WT (3 sessions at 40%,  $F(2,58)=8.83$ ,  $p=0.0004$ ,  $\alpha5KO$  vs WT:  $p=0.0002$ ,  $\alpha5KI$  vs WT:  $p=0.0004$ ; **figure 3D right**) and respective 40%-EP ratio of  $0.56\pm0.04$  and  $0.49\pm0.03$  versus  $0.34\pm0.02$  in WT (3 sessions at 40%,  $F(2,58)=6.23$ ,  $p=0.0035$ ,  $\alpha5KO$  vs WT:  $p=0.0020$ ,  $\alpha5KI$  vs WT:  $p=0.0123$ ; **figure 3E right**). In contrast to females, the genotype effect on 40%-EI and 40%-EP did not reach significance in males (**figure 3D-E left**).

#### *BEC induced by the 40 and 60%-EI in the EtOH IA protocol*

On a 30min-session no significant difference was found between  $\alpha5$  mutants and WT in terms of either 40%-EI/EP (**figure 4B**), or 60%-EI/EP (**figure 4C**). Nevertheless, males self-administered significantly more 40%-EtOH than females on this 30min period (WT, M:  $3.0\pm0.8$  vs F:  $1.2\pm0.3$ ;  $\alpha5KO$ , M:  $2.4\pm0.5$  vs F:  $1.8\pm0.4$ ;  $\alpha5KI$ , M:  $1.9\pm0.1$  vs F:  $1.7\pm0.3$ ; in g/Kg/30min; sex effect:  $F(1,32)=5.47$ ,  $p=0.025$ ; **figure 4B**). Additionally, we found that in both males and females, the measured BEC data were positively correlated to their relative 40%-EI and 60%-EI data (M:  $F(1,41)=10.70$ ,  $p=0.0022$ , **figure 4D**; F:  $F(1,34)=30.13$ ,  $p<0.0001$ , **figure 4E**). To make direct comparisons of BEC between mice, we then divided the BEC (in mg/mL) of each mouse by their corresponding EI (in g/Kg/30min); which gave the BEC for 1 g/Kg/30min EI (**figure 4F**). No genotype or sex difference was found with BEC for 1 g/Kg/30min EI of:  $0.74\pm0.1$  (M) and  $1.11\pm0.2$  (F) in WT,  $1.08\pm0.4$  (M) and  $0.82\pm0.2$  (F) in  $\alpha5KO$  and  $1.2\pm0.3$  (M) and  $0.72\pm0.2$  (F) in  $\alpha5KI$  (**figure 4F**).



**Fig. 4. Plasmatic corticosterone (pCORT) and blood ethanol (BEC) concentrations in α5KI and α5KO mice**

(A): Basal stress levels in naive mice estimated by plasmatic corticosterone concentrations (p[CORT]). (B-F): BEC induced by the 40 and 60%-EI in the EtOH IA protocol with: EI data on a 30min period with EtOH solutions at 40% (B) and 60% (C), BEC of male (D) and female (E) mice in function to their corresponding 40 and 60%-EI. (F): Estimation of the mean BEC of each genotype for an EI of 1g/Kg/30min. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ : genotype effect;  $\alpha\alpha$  $p \leq 0.01$ : α5KI vs WT (bonferroni post-hoc);  $\alpha\alpha\alpha$  $p \leq 0.001$ : α5KI vs α5KO (bonferroni post-hoc).

*Effect of α5 mutations on a stress-related biomarker: basal plasmatic corticosterone assay*

Naïve WT mice exhibited basal plasmatic corticosterone concentrations (pCORT) of  $23.4 \pm 5$  ng/ml, with no significant difference between males and females (M:  $21.4 \pm 4$ , F:  $25.9 \pm 10$  ng/ml; **figure 4A**). Compared to WT, α5KI showed significantly higher pCORT levels



(40.2±5 ng/ml) while  $\alpha$ 5KO showed lower pCORT levels (12.7±1 ng/ml; genotype effect:  $F(2,36)=9.83$ ,  $p=0.0004$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.0074$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.10$  ns,  $\alpha$ 5KI vs  $\alpha$ 5KO:  $p=0.0002$ ; **figure 4A**). No global sex effect was revealed by the ANOVA, but when analyzed per sex, the genotype effect reached statistical significance only in males (M:  $F(2,21)=9.47$ ,  $p=0.0012$ ,  $\alpha$ 5KI vs WT:  $p=0.0078$ ,  $\alpha$ 5KO vs WT:  $p=0.13$  ns,  $\alpha$ 5KI vs  $\alpha$ 5KO:  $p=0.0004$ ; F:  $p=0.065$  ns; **figure 4A**).

## **Experiment 2: Effects of the neurospecific reexpression of the $\alpha$ 5 subunit in GABAergic neurons of the IPN**

### *Histological control of LV induced reexpression*

Histological analysis showed that in all  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> and  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup> mice included in this study ( $n=37$ ), only IPN neurons were infected by the injected LVs. Strong eGFP signals could be visualized in the rostral subnucleus of the IPN (IPR) known for carrying the highest density of GABAergic neurons in the IPN and for carrying the highest density of native  $\alpha$ 5-nAChR subunit (**figure 5A**).

### *Role of the $\alpha$ 5-expressing IPN GABAergic neurons in the impulsive-like phenotype*

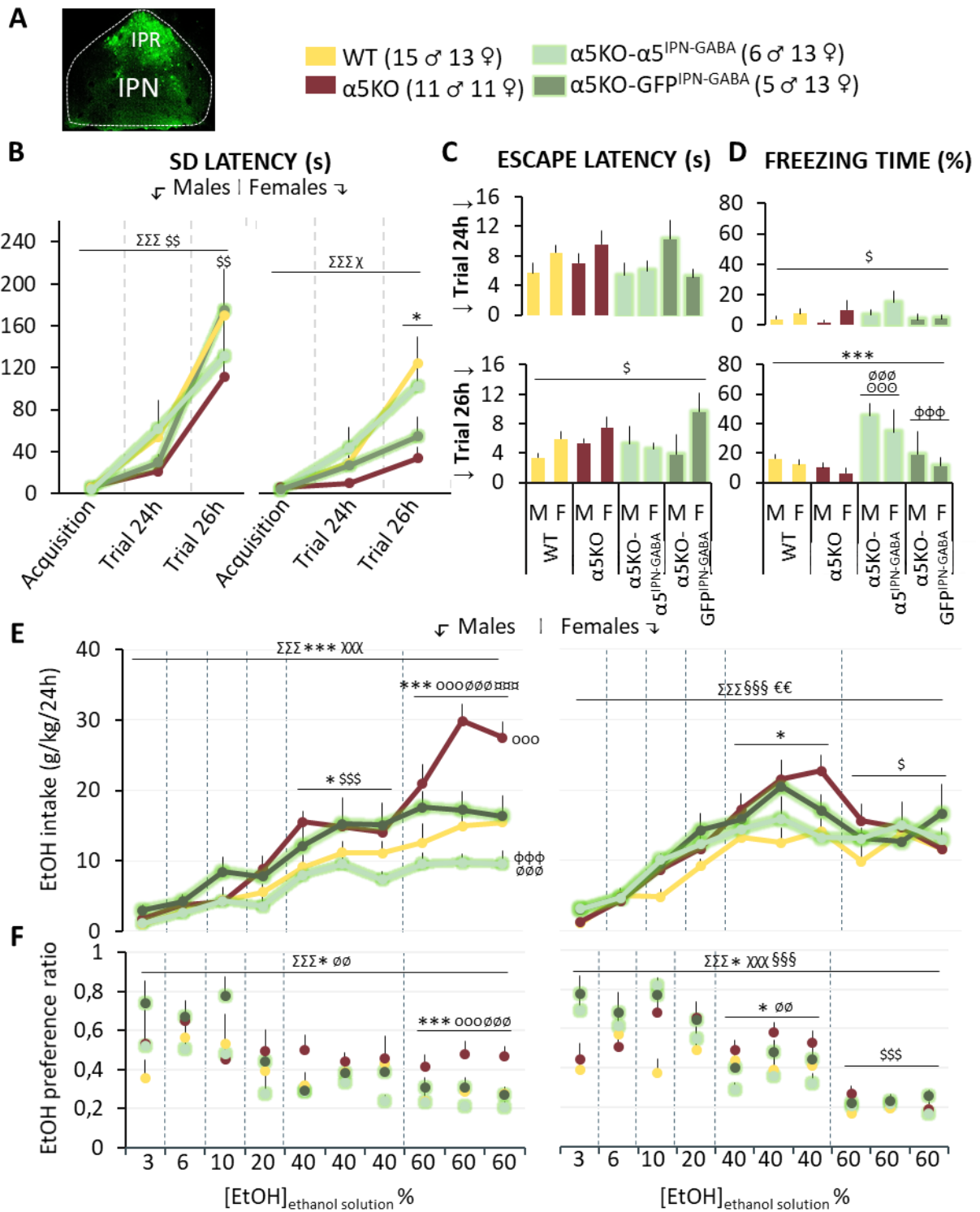
The analysis of SDL revealed no significant difference compared to WT in the acquisition trial (**figure 5B**), and all mice exhibited significant increases of their SDL and decreases of their EL on the following trials (trial effect, SDL:  $F(2,158)=82.28$ ,  $p<0.0001$ ; EL:  $F(2,158)=75.84$ ,  $p<0.0001$ ; **figure 5B,C**). Thus, neither  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> nor  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup> mice were impaired in the acquisition of this task. We found no significant difference between the EL of the WT,  $\alpha$ 5KO,  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> and  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup> mice in the trials at 24 and 26h (**figure 5C**). However, in the trial at 24h, while  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> males exhibited SDL similar to  $\alpha$ 5KO ones (29.8±8 vs 21.3±11 sec; **figure 5B left**),  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup> males exhibited SDL higher and close to WT ones (62.1±27 vs 53.9±17 sec; **figure 5B left**). However, this genotype effect did not reach statistical significance and was not found in the trial at 26h where all genotypes showed mean SDL ranging between 111.3 and 163.2 sec (**figure 5B left**). Therefore,  $\alpha$ 5 reexpression in IPN GABAergic neurons only tended to restore the behavioral control to WT levels at the 24h-trial in males. Differently as males, SDL of  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup> females were similar to WT ones and significantly higher than  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> and  $\alpha$ 5KO ones in the trial at 26h but not at 24h (in sec,  $\alpha$ 5KO- $\alpha$ 5<sup>IPN-GABA</sup>: 101.1±30 and WT: 122.4±25 vs  $\alpha$ 5KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup>: 53.2±18 and  $\alpha$ 5KO: 32.8±11;  $F(3,46)=3.16$ ,  $p=0.033$ ; **figure 5B right**). These genotype and

sex differences were also supported by global (though the 3 delays and M+F) significant main effects of sex ( $F(1,79)=7.71$ ,  $p=0.0069$ ) and delay x genotype and delay x sex interactions (delay x genotype:  $F(6,158)=2.31$ ,  $p=0.036$ , delay x sex:  $F(2,158)=7.32$ ,  $p=0.0009$ ; **figure 5B**).

Moreover, the  $\alpha 5$  reexpression in IPN GABAergic neurons significantly increased the freezing % time expressed during the trial at 26h of  $\alpha 5$ KO males and females (genotype effect:  $F(3,79)=13.38$ ,  $p<0.0001$ ; **figure 5D bottom**). Indeed, the  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  mice exhibited the highest percentage of freezing ( $37.5\pm 6\%$ ) compared to  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> ( $12.6\pm 3\%$ ;  $p<0.0001$ ),  $\alpha 5$ KO ( $8.2\pm 2\%$ ;  $p<0.0001$ ) and even WT mice ( $14.4\pm 2\%$ ;  $p<0.0001$ ; **figure 5D bottom**). This freezing increase was still highly significant in males and females analysed separately (genotype effect in M:  $F(3,33)=6.15$ ,  $p=0.0019$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup>:  $p=0.0077$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO:  $p=0.00020$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs WT:  $p=0.0010$ ; in F:  $F(3,46)=7.79$ ,  $p=0.0003$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup>:  $p=0.0005$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO:  $p<0.0001$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs WT:  $p=0.0010$ ; **figure 5D**).

#### *Role of the $\alpha 5$ -expressing IPN GABAergic neurons on alcohol intermittent drinking*

Over the 10 EtOH sessions,  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> males and females self-administered significantly more EtOH than WT and  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  (respectively,  $13.5\pm 0.7$  and  $12.5\pm 0.7$  versus  $9.2\pm 0.4$  and  $9.9\pm 0.5$  g/kg/24h;  $F(3,79)=9.36$ ,  $p<0.0001$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO:  $p=0.0010$ , WT vs  $\alpha 5$ KO:  $p<0.0001$ , WT vs  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup>:  $p=0.0017$ ) but with a significant dose x genotype x sex interaction ( $F(27,711)=2.13$ ,  $p=0.0008$ ; **figure 5E-F**). In males, the neurospecific reexpression of the  $\alpha 5$  subunit in IPN GABAergic neurons efficiently reduced the EtOH self-administration:  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  males exhibited lower EI and EP ratio than  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> throughout the procedure (EI,  $6.5\pm 0.6$  vs  $11.7\pm 1.0$  g/kg/24h, main genotype effect:  $F(3,33)=14.50$ ,  $p<0.0001$ ,  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  vs  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup>:  $p=0.0022$  **figure 5E left**; EP,  $0.33\pm 0.04$  vs  $0.46\pm 0.04$ ,  $p=0.18$  ns, **figure 5F left**). Even if the  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> did not reach 60%-EI and 60%-EP as high as  $\alpha 5$ KO ones, the  $\alpha 5$  reexpression greatly reduced them: the EI levels were even almost halved in  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  compared to their GFP controls ( $9.6\pm 0.9$  vs  $17.1\pm 1.4$  g/kg/24h, **figure 5E left**). In females, although the dose-response curves of  $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  mice tended to be closer to the WT ones than to the  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> and  $\alpha 5$ KO ones (**figure 5E-F right**), we did not find any significant effect for the  $\alpha 5$  reexpression on EtOH drinking behaviour, even during sessions with EtOH 40% ( $\alpha 5$ KO- $\alpha 5^{\text{IPN-GABA}}$  versus  $\alpha 5$ KO-GFP<sup>IPN-GABA</sup> for EI:  $14.6\pm 1.4$  vs  $17.8\pm 1.5$ , **figure 5E right**; for EP:  $0.32\pm 0.03$  vs  $0.44\pm 0.04$ , **figure 5F right**).



**Fig. 5. Effects of the reexpression of the  $\alpha 5$  subunit in GABAergic neurons of the IPN on impulsive-like and alcohol drinking behaviors of  $\alpha 5$ KO mice**

(A): Impulsivity-related behavior indicated by the SD latency. (B): escape latencies for the trials performed 24h (top) and 26h (bottom) after acquisition. (C): Anxiety-related behavior induced by the SD task and indicated by the freezing time expressed on the platform during the trials at 24h (top) and 26h (bottom). (D-E): Dose-response curves of oral EI (g/kg/24h) and EP ratio in males (left) and females (right).  $\Sigma\Sigma\Sigma p \leq 0.001$ : trial/dose effect;  $* p \leq 0.05$ ,  $*** p \leq 0.001$ : genotype effect;  $\$ p \leq 0.05$ ,  $$$ p \leq 0.01$ ,  $$$$ p \leq 0.001$ : sex effect;  $\chi p \leq 0.05$ ,  $\chi\chi p \leq 0.01$ ,  $\chi\chi\chi p \leq 0.001$ : trial/dose x genotype interaction;  $\emptyset p \leq 0.05$ ,  $\emptyset\emptyset p \leq 0.01$ ,  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :

*sex x dose interaction*;  $\epsilon\epsilon p \leq 0.01$ : *sex x dose x genotype interaction*;  $\emptyset\emptyset p \leq 0.01$ ,  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :  $\alpha 5KO-\alpha 5^{IPN-GABA}$  vs  $\alpha 5KO$  (bonferroni post-hoc);  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :  $\alpha 5KI$   $\alpha 5KO-\alpha 5^{IPN-GABA}$  vs *WT* (bonferroni post-hoc);  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :  $\alpha 5KO-\alpha 5^{IPN-GABA}$  vs  $\alpha 5KO-GFP^{IPN-GABA}$  (bonferroni post-hoc);  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :  $\alpha 5KO-GFP^{IPN-GABA}$  vs  $\alpha 5KO$  (bonferroni post-hoc);  $\emptyset\emptyset\emptyset p \leq 0.001$ :  $\alpha 5KO$  vs *WT* (bonferroni post-hoc).

## 2. Discussion

Genome wide studies have provided consistent evidence for a role of the  $\alpha 5$ -SNP (rs16969968) in nicotine dependence. Although a link with alcohol abuse has been suggested as well, so far mixed results support this idea. Here, we investigated effects of either the most common SNP, or a deletion of the  $\alpha 5$ -encoding gene, on behavioral traits associated with AUDs and alcohol-drinking behavior in response to a wide range of ethanol concentrations. To this end, we used male and female  $\alpha 5KI$  and  $\alpha 5KO$  mice. We first observed that, surprisingly, these two mutant strains show opposite anxiety-like phenotypes. In accordance with their lower basal corticosterone levels (used as a stress biomarker),  $\alpha 5KO$  exhibited lower anxiety as compared to *WT*, spending more time in the EPM open arms (and their extremities) and expressing less freezing in the SD, where they exhibited an impulsive phenotype as revealed by lower step-down latencies. In contrast,  $\alpha 5KI$  males and females showed good behavioral control and tended to be hyperanxious judging by an increase in freezing in the SD, a decrease in the time spent in the EPM open arms/extremities, and higher basal corticosterone levels. Furthermore,  $\alpha 5KI$  males showed a decreased novelty preference in the course of the NPP task. Importantly, although useful for interrogating the function of  $\alpha 5$ \*nAChRs in animal models, the deletion of *CHRNA5* does not recapitulate functional alterations associated with the SNP. The anxiety-like phenotypes are consistent with previous studies reporting that  $\alpha 5KO$  female mice are hypoanxious (28) but hyperanxiety in males reexpressing the  $\alpha 5$ -SNP D398N (37). However, they also found either no change (28) or hyperanxiety (37) in  $\alpha 5KO$  males, while ours displayed hypoanxiety. The anxiety-related responses exhibited by our nicotinic mutants across the different behavioral tasks are in accordance with their basal stress levels estimated by plasmatic corticosterone:  $\alpha 5KO$  displayed low anxiety and lower pCORT levels while  $\alpha 5KI$  displayed high anxiety and higher pCORT levels. The  $\alpha 5$  subunit is highly expressed in adrenal glands of humans (39) and mice (40), where it can influence plasmatic cortisol and corticosterone levels respectively. Our

results are consistent with the idea that  $\alpha 5^*$ nAChRs could influence the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and stress-related behaviors.

The reduced behavioral control observed in  $\alpha 5$ KO is also consistent with the expression  $\alpha 5^*$ nAChRs within the mPFC, where they are known to play a critical function in the development of cortical neurons and in attentional processes (41–43).  $\alpha 5$ KO mice exhibit disrupted attentional performance in the 5-choice serial reaction time test (41). Our results are also consistent with a previous study showing that mice over-expressing  $\alpha 3\alpha 5\beta 4^*$ nAChRs exhibit less impulsive-like behavior than WT controls, and this phenotype is related to the numbers of copy of this transgene (44).

Finally, we assessed alcohol addictive properties using an oral, voluntary and intermittent self-administration protocol at different ethanol concentrations. Despite their opposite emotional profiles, both  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI mutant strains exhibited a drastic increase in alcohol consumption as compared to their WT littermates, at concentrations as high as 60% in males and 40% in females. They did not differ from WT for the sessions with 3, 6, 10 and 20% EtOH. This could account for the fact that other rodent studies focusing on doses below 30%, concluded on no effect of the *chrna5* deletion on EtOH drinking behaviour. The  $\alpha 5$  subunit is located primarily within the rostral subnucleus of the IPN, on GABAergic neurons that project to the mesopontine raphe and dorsal tegmental area (19,20,45,46). The  $\alpha 5^*$ nAChRs are located on dopaminergic cell bodies in the VTA and on terminals in the NAc, where they modulate DA release. Expression of the  $\alpha 5$ -SNP DN398N appears to alter the excitability of VTA DA neurons (47). The VTA and the IPN are two surrounding structures with opposite roles in the reward versus aversive signalling. An imbalance in this IPN-VTA circuit could contribute to the dysregulation of alcohol self-administration at high doses. In support, we already found that the viral reexpression of  $\alpha 5$  specifically in IPN-GABAergic neurons partially restore the behavioral control in  $\alpha 5$ KO, and reduces EtOH consumption in males. Further studies are needed to understand the functional interactions between the IPN and the VTA and their contribution to the control of alcohol consumption. Interestingly, reexpression of the  $\alpha 5$  subunit in the IPN had little to not impact on EtOH consumption in females. Females appeared to be much more sensitive than males to alcohol aversive effects, reducing their EtOH self-administration drastically with 60%-concentrated solutions. These results could be due to functional differences in the IPN of males and females. Sex differences in baseline  $\alpha 5$ -expression had been reported in the IPN of rats (48) and Gangitano et al., found that IPN levels

of  $\alpha 5$  mRNA can be modulated by progesterone (28). The inclusion of females in future studies bearing IPN-related functions is thus crucial.

Together, our data showed that both mutant strains ( $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO) are more prone to alcohol over-consumption, while displaying opposite emotional profiles. These results strongly evoked the two human alcoholic profiles established by Cloninger and colleagues (1998). Type I is mostly female, 'avoidant' and display novelty avoidance and high anxiety; Type II concerns a majority of males, with a 'sensation seeker' profile, low anxiety and high impulsivity. Alcoholism results from a combination of genetic, environmental and personality traits. Many possible combinations can generate different motivations to consume alcohol and therefore diverse manifestations of alcoholism that had long time been recognized by clinicians and researchers. Therefore, several binary, three-type, four-type and five-type models of alcohol dependence have been proposed and listed in (49). Currently, five alcoholism subtypes are recognized by The National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA): the young adult, functional Class, intermediate familiar, young antisocial and chronic severe subtype (50). The Cloninger and Moss classifications have the characteristic to be driven on community samples and not only AUD treatment-seeking patients. Moreover, two subtypes proposed by Moss et al., share similarities with the Cloninger's type I, while the three others are closer to the Cloninger's type II. Type I and II alcoholism represent two extremes of the complex continuous spectrum of alcohol abuse that we might be able to model in rodents. We found several matches between Type I/ $\alpha 5$ KI and Type II/ $\alpha 5$ KO characteristics and now we seek to establish whether these two nicotinic mutant mice could further work as a promising animal model for Type I and Type II alcoholism outlined by Cloninger and colleagues. To further confirm the similarities, it could be interesting to assess whether opposite social profiles can also emerge from  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO because type I alcoholics are described as eager to help others and sensitive to social cues while at the opposite, type II alcoholics often display anti-social personality disorders and aggressive behaviors. Moreover, one of the main limitations of this study is that we only assessed oral and voluntary alcohol consumption. We saw an escalation of the EtOH consumption in  $\alpha 5$ -mutants despite aversive concentrations, but we did not assess whether they met the other criteria for addiction, such as preference for alcohol over other reward options (51), the punishment-resistant alcohol drinking (52) or their relapse behavior after alcohol deprivation. It is now essential to evaluate further these features in  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO transgenic mice.

Although human neuroimaging studies provide significant insight into systems-level neural circuitry underlying the association of the  $\alpha 5$ -SNP D398N with alcohol abuse liability, their ability to causally link this SNP to alcohol abuse phenotypes is limited. Mechanistic studies in animal models are necessary. The respective contribution of  $\alpha 5$ -carrying neuronal subpopulations in AUD can be assessed using the  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO transgenic models. Here we also evaluated behavioral traits related to high EtOH consumption, prior the alcohol exposure, which is often challenging in humans. It would be highly interesting to explore how a chronic alcohol exposition may modify the initial vulnerable phenotypes of these  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO mutants. Environmental factors are also known to play a critical role in the development of AUD. So studying the effect of environmental factors such as chronic stress or environmental enrichment, on  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO vulnerable phenotypes and their following EtOH consumption could be useful for the understanding of genetic x behavioral traits x environment interactions. Identifying whether different subtypes of AUD may respond better to specific treatments is critical. Therefore, the characterization of AUD subtypes associated with the  $\alpha 5$ -mutations provide a unique opportunity to evaluate the most effective treatment, among the preexisting ones, but also for the development of personalized new ones, for which  $\alpha 5^*$ nAChRs could be a new target through allosteric modulators (53).

In conclusion, we provide evidence that alteration of  $\alpha 5^*$ nAChR function, either through expression of the polymorphic variant in  $\alpha 5$ KI mice, or deletion of the  $\alpha 5$  subunit gene in  $\alpha 5$ KO mice, both drastically increased alcohol consumption in the IA paradigm. Moreover,  $\alpha 5$ KI and  $\alpha 5$ KO mice display opposite motivational profiles highly consistent with Cloninger's alcoholc subtypes. Finally, LV induced reexpression of  $\alpha 5$  in IPN GABAergic neurons partially restored the control of alcohol intake and decreased impulsive phenotype. Our data suggest that preclinical models expressing human genetic variants can help to identify different motivations underlying AUDs and to study alcoholism subtypes, which could represent a major step toward the development of personalized and thus more effective treatments.

## **Funding and Disclosure**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 5287 (V.D.) and CNRS UMR 3571 (U.M.), Bordeaux University, the Institut Pasteur, Agence Nationale de la Recherche (ANR), Neuroscience and BLANC, LABEX BRAIN, FP7 ERANET program NICO-GENE grant, French National Cancer Institute grant (INCa/CANCEROPOLE-TABAC-01-16022). The laboratory of V.D. is part of the Bordeaux Neurocampus; and U.M. is a member of the Laboratory of Excellence, Bio-Psy Labex; as such this work was supported by French state funds managed by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) within the Investissements d'Avenir program under reference ANR-11IDEX-0004-02. The team of U.M. is part of the Ecole des Neurosciences de Paris Ile-de-France Network.

The authors declare no competing interests.



## References

1. World Health Organization. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [cité 28 oct 2021]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>
2. Witkiewitz K, Litten RZ, Leggio L. Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Sci Adv*. sept 2019;5(9):eaax4043.
3. Litten RZ, Ryan ML, Falk DE, Reilly M, Fertig JB, Koob GF. Heterogeneity of Alcohol Use Disorder: Understanding Mechanisms to Advance Personalized Treatment. *Alcohol Clin Exp Res*. avr 2015;39(4):579-84.
4. Haller G, Kapoor M, Budde J, Xuei X, Edenberg H, Nurnberger J, et al. Rare missense variants in CHRN3 and CHRNA3 are associated with risk of alcohol and cocaine dependence. *Hum Mol Genet*. 1 févr 2014;23(3):810-9.
5. Wang JC, Gruzca R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, et al. Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. mai 2009;14(5):501-10.
6. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X, et al. Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry*. sept 2008;165(9):1163-71.
7. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet*. 1 janv 2007;16(1):36-49.
8. Lassi G, Taylor AE, Timpson NJ, Kenny PJ, Mather RJ, Eisen T, et al. The CHRNA5–A3–B4 Gene Cluster and Smoking: From Discovery to Therapeutics. *Trends Neurosci*. déc 2016;39(12):851-61.
9. Brynildsen JK, Blendy JA. Linking the CHRNA5 SNP to drug abuse liability: From circuitry to cellular mechanisms. *Neuropharmacology*. mars 2021;186:108480.
10. Chen X, Chen J, Williamson VS, An S-S, Hettaema JM, Aggen SH, et al. Variants in nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 5$  and  $\alpha 3$  increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 5 oct 2009;150B(7):926-33.
11. Hällfors J, Loukola A, Pitkäniemi J, Broms U, Männistö S, Salomaa V, et al. Scrutiny of the CHRNA5-CHRNA3-CHRN4 smoking behavior locus reveals a novel association with alcohol use in a Finnish population based study. *Int J Mol Epidemiol Gene*. 2013;4(2):11.
12. Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, et al. Variation in Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes is Associated with Multiple Substance Dependence Phenotypes. *Neuropsychopharmacology*. août 2010;35(9):1921-31.
13. 23andMe Research Team, HUNT All-In Psychiatry, Liu M, Jiang Y, Wedow R, Li Y, et al. Association studies of up to 1.2 million individuals yield new insights into the genetic etiology of tobacco and alcohol use. *Nat Genet*. févr 2019;51(2):237-44.
14. Van Skike CE, Maggio SE, Reynolds AR, Casey EM, Bardo MT, Dwoskin LP, et al. Critical needs in drug discovery for cessation of alcohol and nicotine polysubstance abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. févr 2016;65:269-87.

15. Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J. Acetylcholine Receptor (AChR)  $\alpha 5$  Subunit Variant Associated with Risk for Nicotine Dependence and Lung Cancer Reduces ( $\alpha 4\beta 2$ )  $2 \alpha 5$  AChR Function. *Mol Pharmacol.* janv 2011;79(1):119-25.
16. Scholze P, Huck S. The  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates  $\alpha 4\beta 2^*$  and  $\alpha 3\beta 4^*$  Receptors. *Front Synaptic Neurosci* [Internet]. 2020 [cit  3 ao t 2021];0. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2020.607959/full>
17. Brown RWB, Collins AC, Lindstrom JM, Whiteaker P. Nicotinic  $\alpha 5$  subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem.* 15 juin 2007;0(0):070615193023002-???
18. Wills L, Kenny PJ. Addiction-related neuroadaptations following chronic nicotine exposure. *J Neurochem.* juin 2021;157(5):1652-73.
19. Hsu Y-WA, Tempest L, Quina LA, Wei AD, Zeng H, Turner EE. Medial Habenula Output Circuit Mediated by  $\alpha 5$  Nicotinic Receptor-Expressing GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus. *J Neurosci.* 13 nov 2013;33(46):18022-35.
20. Morton G, Nasirova N, Sparks DW, Brodsky M, Sivakumaran S, Lambe EK, et al. ChRNA5-Expressing Neurons in the Interpeduncular Nucleus Mediate Aversion Primed by Prior Stimulation or Nicotine Exposure. *J Neurosci.* 1 ao t 2018;38(31):6900-20.
21. Besson M, Forget B, Correia C, Blanco R, Maskos U. Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in CHRNA5: a role in alcohol dependence and feeding behavior. *Neuropsychopharmacology.* oct 2019;44(11):1906-16.
22. Santos N, Chatterjee S, Henry A, Holgate J, Bartlett SE. The  $\alpha 5$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Plays an Important Role in the Sedative Effects of Ethanol But Does Not Modulate Consumption in Mice. *Alcohol Clin Exp Res.* avr 2013;37(4):655-62.
23. Dawson A, Wolstenholme JT, Roni MA, Campbell VC, Jackson A, Slater C, et al. Knockout of alpha 5 nicotinic acetylcholine receptors subunit alters ethanol-mediated behavioral effects and reward in mice. *Neuropharmacology.* ao t 2018;138:341-8.
24. Gallego X, Ruiz-Medina J, Valverde O, Molas S, Robles N, Sabrià J, et al. Transgenic over expression of nicotinic receptor alpha 5, alpha 3, and beta 4 subunit genes reduces ethanol intake in mice. *Alcohol.* mai 2012;46(3):205-15.
25. Hauser SR, Knight CP, Truitt WA, Waeiss RA, Holt IS, Carvajal GB, et al. Adolescent Intermittent Ethanol Increases the Sensitivity to the Reinforcing Properties of Ethanol and the Expression of Select Cholinergic and Dopaminergic Genes within the Posterior Ventral Tegmental Area. *Alcohol Clin Exp Res.* sept 2019;43(9):1937-48.
26. Krishnamoorthy M, Gerwe BA, Scharer CD, Heimburg-Molinario J, Gregory F, Nash RJ, et al. Low ethanol concentration alters CHRNA5 RNA levels during early human development. *Reprod Toxicol.* nov 2010;30(3):489-92.
27. Janes AC, Smoller JW, David SP, Frederick B deB., Haddad S, Basu A, et al. Association between CHRNA5 genetic variation at rs16969968 and brain reactivity to smoking images in nicotine dependent women. *Drug Alcohol Depend.* janv 2012;120(1-3):7-13.

28. Gangitano D, Salas R, Teng Y, Perez E, De Biasi M. Progesterone modulation of  $\alpha 5$  nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. *Genes Brain Behav.* juin 2009;8(4):398-406.
29. O'Neill HC, Wageman CR, Sherman SE, Grady SR, Marks MJ, Stitzel JA. The interaction of the Chrna5 D398N variant with developmental nicotine exposure. *Genes Brain Behav.* 2018;17(7):e12474.
30. Fowler CD, Kenny PJ. Utility of genetically modified mice for understanding the neurobiology of substance use disorders. *Hum Genet.* juin 2012;131(6):941-57.
31. Flurkey K, Curren J, Harrison D. Mouse models in aging research [Internet]. 2007. (Faculty Research 2000 - 2009.). Disponible sur: [https://mouseion.jax.org/stfb2000\\_2009/1685](https://mouseion.jax.org/stfb2000_2009/1685)
32. Kliethermes CL, Crabbe JC. Genetic independence of mouse measures of some aspects of novelty seeking. *Proc Natl Acad Sci.* 28 mars 2006;103(13):5018-23.
33. Borba Filho GL, Zenki KC, Kalinine E, Baggio S, Pettenuzzo L, Zimmer ER, et al. A New Device for Step-Down Inhibitory Avoidance Task—Effects of Low and High Frequency in a Novel Device for Passive Inhibitory Avoidance Task That Avoids Bioimpedance Variations. Chapouthier G, éditeur. *PLOS ONE.* 23 févr 2015;10(2):e0116000.
34. Hwa LS, Chu A, Levinson SA, Kayyali TM, DeBold JF, Miczek KA. Persistent Escalation of Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice With Intermittent Access to 20% Ethanol: ESCALATED ALCOHOL AFTER INTERMITTENT ACCESS. *Alcohol Clin Exp Res.* nov 2011;35(11):1938-47.
35. Melendez RI. Intermittent (Every-Other-Day) Drinking Induces Rapid Escalation of Ethanol Intake and Preference in Adolescent and Adult C57BL/6J Mice: RAPID ESCALATION OF ETHANOL INTAKE. *Alcohol Clin Exp Res.* avr 2011;35(4):652-8.
36. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science.* 12 avr 1996;272(5259):263-7.
37. Besson M, Guiducci S, Granon S, Guilloux J-P, Guiard B, Repérant C, et al. Alterations in  $\alpha 5^*$  nicotinic acetylcholine receptors result in midbrain- and hippocampus-dependent behavioural and neural impairments. *Psychopharmacology (Berl).* sept 2016;233(18):3297-314.
38. Morel C, Fattore L, Pons S, Hay YA, Marti F, Lambomez B, et al. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry.* août 2014;19(8):930-6.
39. Hone AJ, McIntosh JM, Azam L, Lindstrom J, Lucero L, Whiteaker P, et al.  $\alpha 3 \beta 4^*$  Subtype as the Predominant Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in Human Adrenal Chromaffin Cells. *Mol Pharmacol.* nov 2015;88(5):881-93.
40. Wu P-C, Fann M-J, Kao L-S. Characterization of Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem.* mars 2010;112(5):1210-22.
41. Bailey CDC, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK. The Nicotinic Acetylcholine Receptor 5 Subunit Plays a Key Role in Attention Circuitry and Accuracy. *J Neurosci.* 7 juill 2010;30(27):9241-52.
42. Howe WM, Brooks JL, Tierney PL, Pang J, Rossi A, Young D, et al.  $\alpha 5$  nAChR modulation of the prefrontal cortex makes attention resilient. *Brain Struct Funct.* mars 2018;223(2):1035-47.
43. Koukouli F, Rooy M, Tziotis D, Sailor KA, O'Neill HC, Levenga J, et al. Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nat Med.* mars 2017;23(3):347-54.

44. Viñals X, Molas S, Gallego X, Fernández-Montes RD, Robledo P, Dierssen M, et al. Overexpression of  $\alpha 3/\alpha 5/\beta 4$  nicotinic receptor subunits modifies impulsive-like behavior. *Drug Alcohol Depend.* mai 2012;122(3):247-52.
45. Quina LA, Harris J, Zeng H, Turner EE. Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. *J Comp Neurol.* 15 août 2017;525(12):2632-56.
46. Wolfman SL, Gill DF, Bogdanic F, Long K, Al-Hasani R, McCall JG, et al. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nat Commun.* déc 2018;9(1):2710.
47. Oni EN, Halikere A, Li G, Toro-Ramos AJ, Swerdel MR, Verpeut JL, et al. Increased nicotine response in iPSC-derived human neurons carrying the CHRNA5 N398 allele. *Sci Rep.* oct 2016;6(1):34341.
48. Correa VL, Flores RJ, Carcoba LM, Arreguin MC, O'Dell LE. Sex differences in cholinergic systems in the interpeduncular nucleus following nicotine exposure and withdrawal. *Neuropharmacology.* nov 2019;158:107714.
49. Leggio L, Kenna GA, Fenton M, Bonenfant E, Swift RM. Typologies of Alcohol Dependence. From Jellinek to Genetics and Beyond. *Neuropsychol Rev.* mars 2009;19(1):115-29.
50. Moss HB, Chen CM, Yi H. Subtypes of alcohol dependence in a nationally representative sample. *Drug Alcohol Depend.* déc 2007;91(2-3):149-58.
51. Augier E, Barbier E, Dulman RS, Licheri V, Augier G, Domi E, et al. A molecular mechanism for choosing alcohol over an alternative reward. *Science.* 22 juin 2018;360(6395):1321-6.
52. Sneddon EA, White RD, Radke AK. Sex Differences in Binge-Like and Aversion-Resistant Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019;43(2):243-9.
53. Maskos U. The nicotinic receptor alpha5 coding polymorphism rs16969968 as a major target in disease: Functional dissection and remaining challenges. *J Neurochem.* 2020;154(3):241-50.

## Chapitre III : impact de la délétion et du SNP D398N de la sous-unité $\alpha 5$ -nAChR sur les comportements prosociaux

### I- Article 3

#### **“Alcohol-prone $\alpha 5$ -nicotinic receptor mutant mice display sex-dependent opposite profiles in emotion recognition and pro-social tasks”**

Léa Tochon, Cécile Pageze, Jean-Louis Guillou et Vincent David

Dans le chapitre précédent nous avons démontré que de nombreuses caractéristiques phénotypiques des souris mutantes  $\alpha 5$ KI, rappellent celles du TUAL de type I de Cloninger; et de nombreuses caractéristiques phénotypiques des souris mutantes  $\alpha 5$ KO reflètent celles observées dans le TUAL de type II de Cloninger. Néanmoins, un élément important manquait dans ces profils, et il s’agissait des compétences sociales. En effet, les individus inclus dans le type I sont décrits comme « désireux d’aider les autres » et « sensibles aux signaux sociaux » tandis qu’à l’opposé, ceux du type II présentent des « troubles de la personnalité antisociale » et un « comportement agressif » (voir criminel). Dans cette troisième publication (faisant office de chapitre 3), nous avons donc vérifié si les profils sociaux des mutants  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO présentent des similitudes avec ceux des profils de TUALs de type I et II décrits par Cloninger et ses collaborateurs.

Des souris mâles et femelles  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO ont été évaluées dans les tests appelés : ASDT pour “affective state discrimination task”, et RTT pour “restrainer tube task”. Le premier permet d’évaluer la capacité à reconnaître les émotions chez les autres, et le second la capacité d’y répondre en exprimant un comportement prosocial de libération d’un congénère piégé.

Nos résultats indiquent une importante interaction entre le sexe et le génotype dans la capacité des souris  $\alpha 5$ KO et  $\alpha 5$ KI à différencier des états émotionnels et à démontrer un comportement d’aide envers un congénère piégé. Ceux-ci renforcent davantage le parallèle femelles  $\alpha 5$ KI/type I et les mâles  $\alpha 5$ KO/type II.

**Alcohol-prone  $\alpha 5$ -nicotinic receptor mutant mice display sex-dependent opposite profiles  
in emotion recognition and pro-social tasks**

Léa Tochon<sup>1\*</sup>, Cécile Pagèze<sup>1</sup>, Jean-Louis Guillou<sup>1</sup>, Vincent David<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, CNRS, EPHE, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

\* Correspondence to Léa Tochon ([lea.tochon@u-bordeaux.fr](mailto:lea.tochon@u-bordeaux.fr)) or Vincent David ([vincent.david@u-bordeaux.fr](mailto:vincent.david@u-bordeaux.fr)) Université de Bordeaux INCIA CNRS UMR 5287, bât B2, allée Geoffroy St Hilaire 33615 Pessac, France

**Running Title:** Socioemotional profiles of  $\alpha 5$  nicotinic mutant mice

**Keywords:** Prosocial behaviour, Emotion Discrimination, Alcohol Abuse,  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor

## ABSTRACT

A single nucleotide polymorphism of the accessory  $\alpha 5$ -subunit of nicotinic receptors in humans offers promising leads into understanding the genetic component underlying the development and sustainment of alcohol use disorders. Two types of genetic manipulations of the  $\alpha 5$  subunit in mice, using a strain with a genetic knock-in of the most common human polymorphism on the one hand and a strain with a genetic knock-out of the same subunit on the other, have led to the finding that they are more prone to alcohol over-consumption while displaying opposite profiles of anxiety-related behavior and behavioural control. We used a modified protocol of the affective state discrimination task for emotional recognition and an adaptation of the restrainer tube test for pro-social behaviour to unravel an opposite social emotional profile which interacts with sex in mice with a genetic knock-in ( $\alpha 5$ SNP) and a knock-out ( $\alpha 5$ KO), offering a first insight into opposite patterns of social deficits linked to alcohol use disorders at a preclinical level.

## 1 INTRODUCTION

Alcohol Use Disorder (AUD) is one of the most prevalent and dangerous substance abuse disorders in our modern society with the World Health Organization reporting that 5% of deaths around the world can be accounted for by alcohol misuse<sup>1</sup>. The health and societal burden that AUDs pose have motivated the search for genetic and environmental predisposing factors linked to the likelihood of developing and maintaining the disorder to target treatment solutions.

Human genome wide studies have recently been able to show a link between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the gene encoding for the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha 5$ -nAChR), and the likelihood of developing AUDs<sup>2</sup>. Genetic manipulations of the expression of  $\alpha 5$ \*nAChRs conducted in rodents have linked the silencing of the  $\alpha 5$ -subunit gene, through a genetic knock-out (KO) procedure, with differences in alcohol self-administration and alcohol tolerance compared to control mice<sup>3,4</sup>. These gene silencing studies have enabled to start outlining the role that the  $\alpha 5$  subunit may play in different aspects of alcohol consumption<sup>3,4</sup>. However, little is known about the functional consequences of  $\alpha 5$ -nAChR polymorphisms on alcohol-related behaviours. So far, we are aware of one study demonstrating that transgenic rats expressing the most common human SNP of  $\alpha 5$  (rs16969968), through a genetic knock-in ( $\alpha 5$ KI) procedure, also display an increased risk of relapse for alcohol self-administration<sup>5</sup>. A previous study from our lab confirmed that, both  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI mutant mice self-administer more alcohol than wild-type mice, and display opposite emotional profiles, exhibiting a decrease versus an increase in anxiety-like response respectively, as assessed with the elevated plus maze task<sup>6</sup>.

In humans, several classifications of AUDs into different subtypes have been proposed, based on different characteristics such as age of onset, personality traits, and biological sex<sup>7</sup>. Two contrasting models have emerged at each pole of the AUD typology continuum and are referred to as Type I and Type II respectively by Cloninger and colleagues (1996)<sup>8</sup>: '*Sensation-seeking alcoholism*' (Cloninger's *Type II*) is described in young men (<25-years-old) who display traits of aggressive behaviour and impulsivity and whose use disorder is, in part, attributed to sensation seeking. At the other end of the continuum, '*Avoidance alcoholism*' (Cloninger's *Type I*) is attributed, in a converse manner to middle-aged individuals (more represented by women) who are prone to social anxiety and who are thought to indulge alcohol in a 'self-medicating' way to cope with their symptoms<sup>8</sup>.



Previous data has shown striking behavioural similarities between  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI mutant mice and the two opposite human subtypes of AUD as described by Cloninger and colleagues in 1996. However, one remaining issue about the relevance of these mouse models with regards to the human typology of AUD concerns the social cognition profile of these  $\alpha 5$ -nAChR mutants. Moreover, while social deficits are considered as key factors in the onset and/or the sustainment of AUDs<sup>9,10</sup>, the types of impairment can differ across subtypes. There is therefore a need for better characterization of pre-consummatory traits, such as social deficits, at a preclinical level to better understand different forms of vulnerability to the development of AUDs. Additionally, the  $\alpha 5$ -nAChR subunit is present either on the pre-synaptic or post-synaptic element of neurons in key brain structures linked to social cognition and socio-emotional processing such as the prefrontal cortex<sup>11</sup> and the ventral hippocampus<sup>12</sup>.

In light of those considerations, this study aimed at using a behavioural approach to characterize emotion recognition abilities<sup>13</sup> and pro-social helping behaviour<sup>14</sup> in  $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI mice to investigate the functional impact of either a polymorphic variation or a null mutation of the  $\alpha 5$ -nAChR subunit on social cognition. In line with previous results from our lab showing that these nicotinic mutants exhibit opposite emotional profiles of anxiety, impulsivity and aggression<sup>6</sup>, we hypothesized that they would perform differentially on prosocial behaviour and emotion recognition tasks with the potential of furthering the analogy made between both mutant strains and the two types of AUDs proposed by Cloninger and colleagues<sup>8</sup>.

## 2 MATERIALS & METHODS

### 2.1 Animals and housing

The two mutant strains ( $\alpha 5$ KO and  $\alpha 5$ KI respectively) express two different mutations of the *CHRNA5* gene encoding for the  $\alpha 5$  subunit of nicotinic receptors ( $\alpha 5$ -nAChR) with a C57BL/6J background. They were initially provided by our collaborators at the Pasteur Institute (Paris), and were bred in the animal facility of the lab for 8 generations with a cross-breeding with heterozygous mice from the Pasteur Institute at the 4<sup>th</sup> generation. The  $\alpha 5$ KO mice carry a deletion of the gene (*CHRNA5*) coding for the  $\alpha 5$  subunit of nicotinic receptors ( $\alpha 5$ -nAChRs). The  $\alpha 5$ KI mice express a polymorphic variant of the *CHRNA5* gene coding for the

$\alpha 5$  subunit of nAChRs defined as a single nucleotide substitution (replacement of the aspartate 398 by an asparagine: D398N), corresponding to the most frequent  $\alpha 5$ -SNP found in the Western Population (rs16969968)<sup>15</sup>. Wild-type mice were obtained from the same litter as the  $\alpha 5$ -mutants, genotype identifications were conducted at 7 post-natal days (P7) through PCR analysis of tail samples by the genotyping platform of the Neurocentre Magendie in Bordeaux. For the experiments, the mice were housed in collective cages (4 to 8 per cage) with access to water and food *ad libitum* in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The lighting of the cages followed a 12-hour day/night cycle in such a way to allow testing to occur from 7:00 AM to 07:00 PM during the mice's day time, following approval of the Local Ethics Committee and in agreement with the CEE Directive 86/609/EEC.

## 2.2 Group repartition

Each mouse underwent both behavioural tests: the mice started with the affective state discrimination task (ASDT) and they were then tested on the restrainer tube test (RTT) 4 weeks later. Both male and female mutants ( $\alpha 5\text{KO}$ : 8  $\sigma$  5  $\text{♀}$ ;  $\alpha 5\text{KI}$ : 7  $\sigma$  9  $\text{♀}$ ) as well as WT littermate mice (9  $\sigma$  9  $\text{♀}$ ) were included.

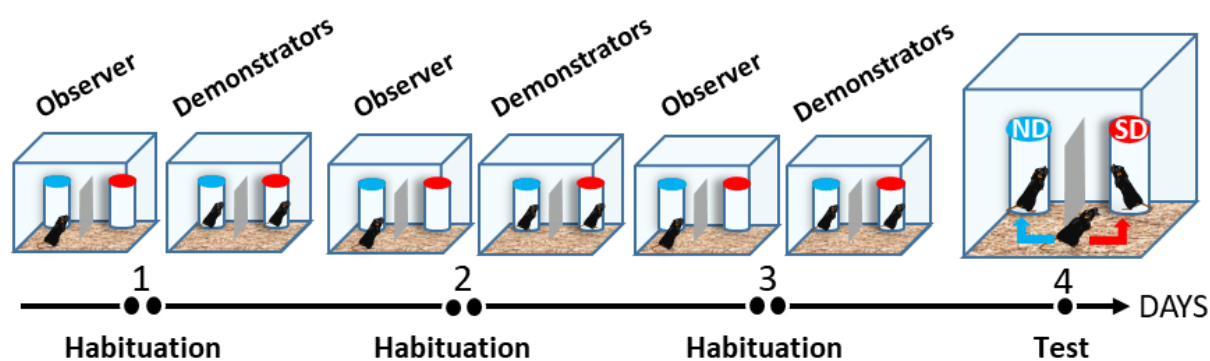
## 2.3 The Affective State Discrimination Task (ASDT)

We used an adaptation of the ASDT protocol described by Scheggia and colleagues (2019) which consist in determining the preferential approach tendency in observer mice when exposed to two unfamiliar demonstrator mice in different affective states<sup>13</sup>. Briefly, the observer was introduced in a cage (29 x 35 x 19 cm) containing two demonstrator mice placed in transparent plastic cylinders (H:21 cm; D:10 cm) with perforated holes at the bottom to allow for breathing and sensory interaction with the environment. A metal separator (2mm x 21 cm x 18 cm) was placed in the middle of the cage in order to mark off the two areas of interest corresponding to each demonstrator and blocking their reciprocal view of each other. Demonstrators were WT mice and were sex-matched to the observer. The entire testing arena was wiped down with warm water and the litter was changed between each subject to eliminate any odors left by the mice. At the end of each testing day, the entire apparatus was wiped down with Ethanol (70%).

**Habituation.** All the mice (demonstrators and observers) were handled for 5 minutes a day over 3 days to become familiar with the experimenter based on Marcotte and collaborators (2021)<sup>16</sup>. They were then habituated to the testing zone for 10 minutes a day over another 3

days. For the test zone habituation, observer mice were gently placed in the ASDT arena and allowed to freely explore in the absence of the demonstrator mice inside each cylinder. During the habituation, the mice's movements were tracked with a tracking Software (Anymaze, Stoelting). After the observer mouse's habituation trial ended, its allocated pair of demonstrator mice were subsequently gently placed inside their corresponding cylinder for 10 minutes (ND for neutral demonstrator and SD for stressed demonstrator).

**Testing:** For the purpose of creating different affective states in mice, the demonstrators were divided into 2 groups: *Neutral and Stress*. *Stress* demonstrators (SD) underwent a restraint procedure for 15 minutes prior to the beginning of the test which consisted in constraining them inside a 50mL custom-made tube (Falcon®) perforated at the end to allow for breathing. After 15 minutes of restraint, the stressed demonstrator was immediately placed in one of the two cylinders which was marked by a red-lid for identification. *Neutral* demonstrators (ND) were not further handled in a way to avoid altering their emotional state and were directly transferred from their home cage to the other cylinder which was marked with a blue lid. For each test trial, ND and SD mice were randomly allocated either to the right or left cylinder relative to the central separator, during both habituation and testing trials, to avoid the confounding variable of spatial preference. The observer was then gently introduced inside the arena and its exploration was recorded for 10 minutes using the tracking system Anymaze (Stoelting). *Demonstrator zones (SD and ND zones)* were outlined using the tracking software and consisted in a square perimeter of 2 cm around and including the cylinders. Parameters of interest such as: time spent and number of entries inside the zone were automatically recorded. In addition, sniffing of the demonstrators and grooming were scored *a posteriori* blindly using the off-line recordings.



**Figure 1.** Time course and protocol of the Affective State Discrimination Task (ASDT)

## 2.4 The Restrainer Tube Test (RTT)

To assess helping-like behaviour across mutants we based our testing procedure on the ones used by Bartal et al. (2011)<sup>17</sup> and Fontes-Dutra and colleagues (2019)<sup>18</sup> in their studies measuring the willingness of rats to free their cagemate trapped in a tube and its adaptation to mice by Ueno et al. (2019)<sup>14</sup>. The test was carried out over 5 days following 4 different phases: *Self-freeing training* (Day 1 & 2), *Chocolate versus Empty tube* (Day 3), *Cagemate versus Empty tube* (Day 4) and a competition trial: *Cagemate versus Chocolate tube* (Day 5) (Figure 2).

**Self-freeing training.** During this phase, the mouse was placed in a 50mL plastic tube (Falcon®) closed off with a paper door at the extremity facing the head of the animal inside the testing cage, the mouse therefore learned to free itself from the inside of the tube by chewing through the paper door. The training was done three times a day over two days (Day 1 & 2). All the mice successfully learned how to open the tube from the inside after 2 days of training.

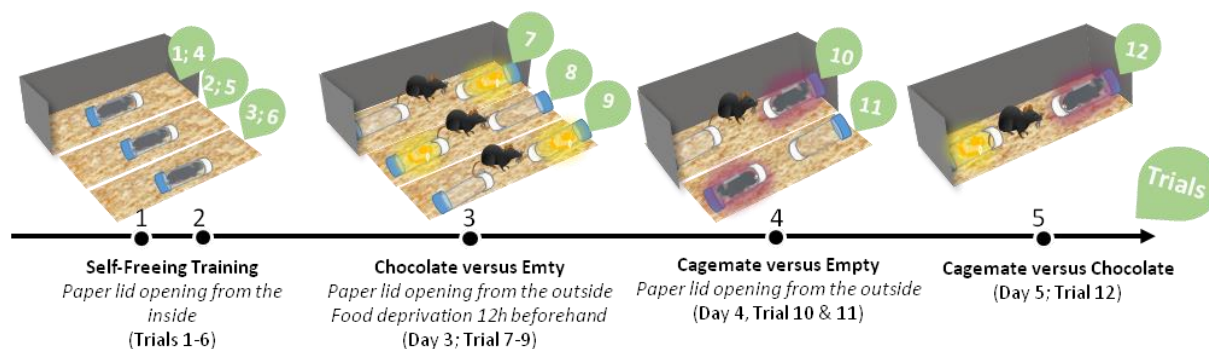
**Chocolate Opening Training.** During this next phase the mouse was trained to open the paper door on a tube from the outside to access white chocolate chips (3 x 25 mg chips). In order to motivate the animals for the task, they were food-deprived during the 12 hours preceding the training. The mouse was placed inside the testing cage with an empty and a chocolate containing tube closed off with a paper lid and was left to roam freely until it had opened the chocolate tube and eaten the chocolate chips. This training was done 3 times over one day (Day 3).

**Cagemate Freeing Training.** Each test mouse was assigned a sex-matched '*trapped cagemate*' consisting in a heterozygous (+/-) littermate that was trapped inside a paper sealed tube at its rear so that the trapped mouse could not free itself. The test mouse was placed in the cage with the cagemate-containing tube as well as an empty paper-sealed tube. In order to free its cagemate, the test mouse needed to chew through the paper door from the outside. The session ended 5 minutes after the mouse had successfully freed its cagemate, or after a maximum of 90 minutes had elapsed. The training was repeated twice over one day.

**Chocolate versus Cagemate trial.** The final trial of the test consisted in placing the mouse in the testing arena in the presence of a chocolate-containing tube (3x 25 mg white chocolate chips) and a cagemate-containing tube, both closed off with a paper lid. We theorized that the

first tube opened by the test mouse would therefore be the one containing the most subjective value.

For all trials, the latency to open the tubes as well as the order of opening of the tubes was recorded. Additionally, the number of white chocolate chips eaten by the test mouse was counted to account for sharing behaviour. A digital camera was placed above the testing apparatus to record the Chocolate versus Cagemate Trial with a behavioural tracking system (Anymaze, Stoelting). *Tube zones* were outlined with the software which consisted in a rectangular perimeter of 1 cm around each tube, and accordingly parameters such as time spent in the tube zones and number of entries inside each tube zone was recorded.



**Figure 2. Time course and detailed protocol of the Restraint Tube Task (RTT)**

**Score for Empathy-like behaviour:** To assess the empathy-like profile of nicotinic mutants as compared to WT controls, a score was calculated according to two factors: namely, *Cagemate Prioritization (CP)* which allocated a score between -3 and 3 to the mice depending on whether the cagemate tube (+1), the chocolate tube (-1) or the empty tube (-1) was opened first during trials *cagemate versus empty* and *cagemate versus chocolate*. The second factor was *social-contact positivity (SCP)* and allocated a score between -3 and 3 to mice depending on whether interacting (+1), disinterested (0) or aggressive (-1) behaviour was displayed towards the cagemate after the test. The interaction type was categorized in real-time during the test by the experimenter: *Interactive* behaviour was attributed when a minimum of 10 sniffings were observed, on the contrary when less than 10 sniffings were observed and the mice spent most of the interaction time at opposite sides of the cage, the interaction was considered as *disinterested*. *Aggressive* behaviour was considered when a minimum of 2 or more aggressive events were recorded between the test mouse and the cagemate (Chasings and/or biting). In the latter case, the session was immediately stopped. Score formula:

$$SCORE_{empathy-like} = \frac{CP + SCP}{2}$$

## 2.5 Statistical Analysis

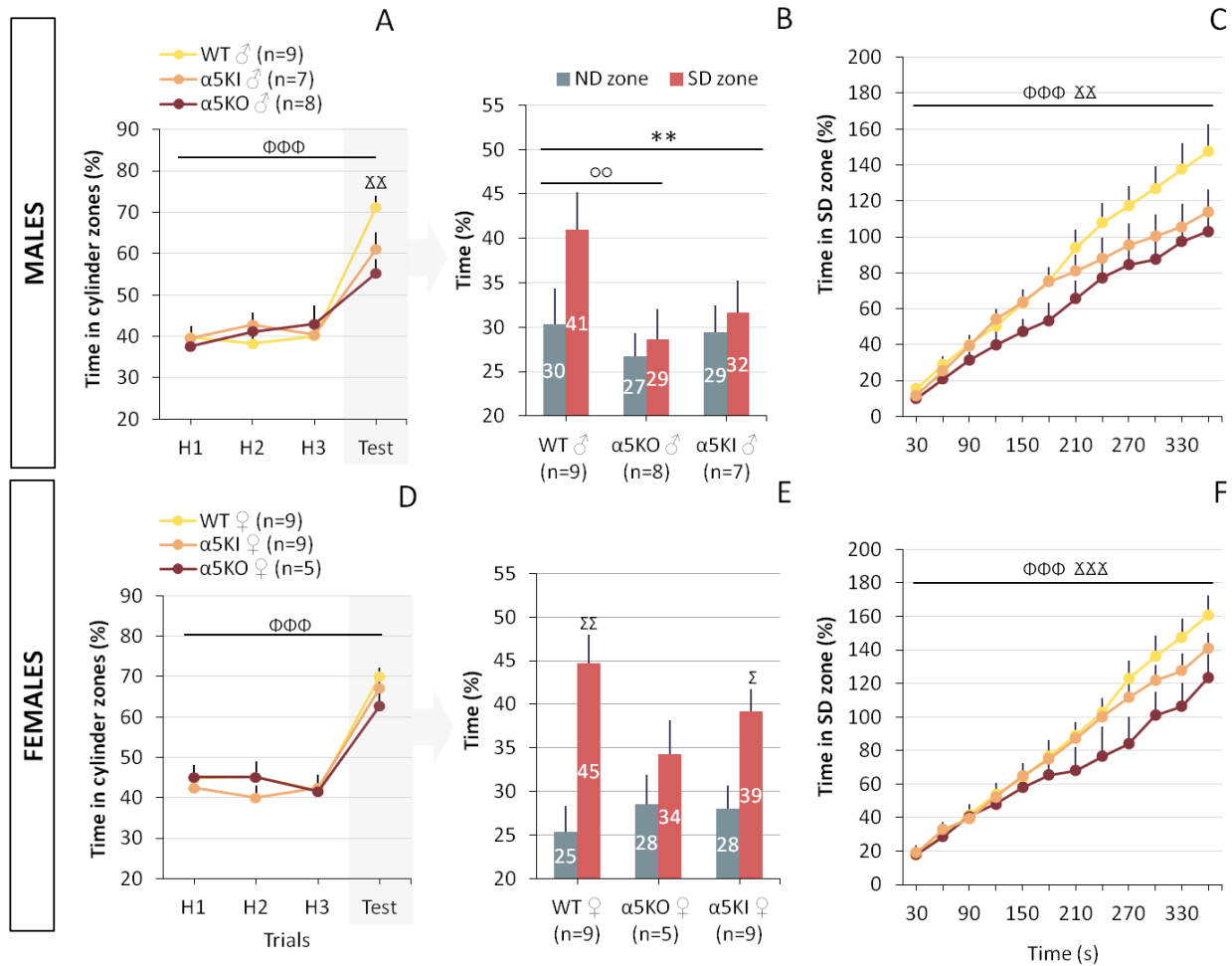
Behavioural performances were analyzed using an ANOVA with one or multiple factors (genotype/repeated measures), followed by appropriate post-hoc tests (Bonferonni/Dunn) to compare the different groups. Frequencies of specific behavioural responses across groups in the ASDT were compared using Chi Square ( $\chi^2$ ) tests. The empathy-score results were analyzed across all groups using a non-parametric test (Kruskal-Wallis) and genotype comparisons within gender groups were analyzed using unpaired t-tests.

## 3 RESULTS

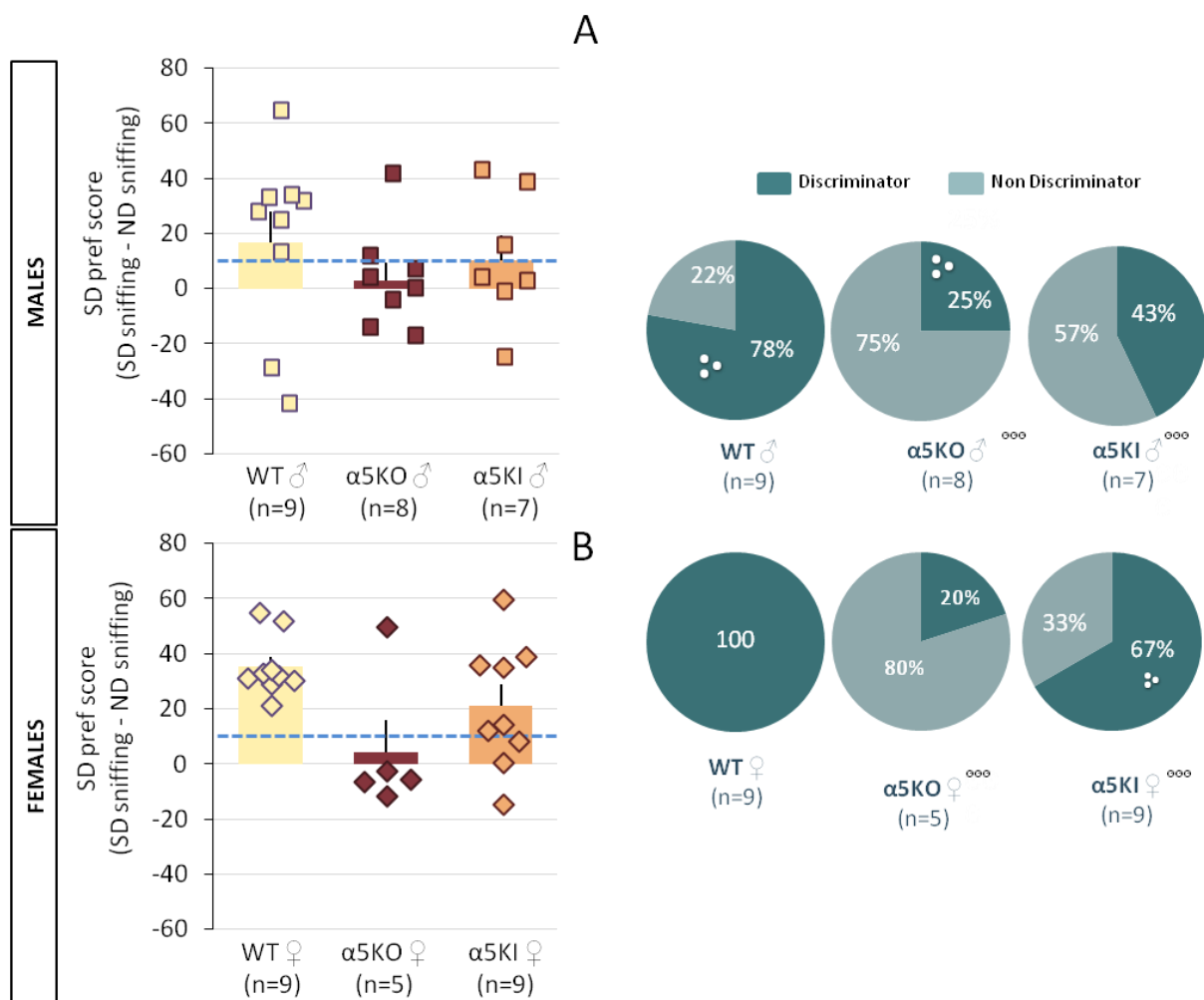
### 3.1 $\alpha$ 5KO and $\alpha$ 5KI Mice Have Different Emotional Discrimination Profiles

In the Affective State Discrimination Task (ASDT), we aimed at testing the ability of two  $\alpha$ 5-nAChR mutants to discriminate between two unfamiliar mice (demonstrators) in different affective states, either a state of psychological stress induced by 15 minutes of constriction inside a tube, or a neutral state. The results showed that all our groups are sensitive to the presence of demonstrator mice inside the cylinders on each side of the ASDT arena during the test. The proportion of time spent in the demonstrator zones was higher during the test trial compared to the three habituation trials for all groups (Trial effect:  $F_{(3,123)} = 116,46$ ;  $p < 0,0001$ ). However, the introduction of a demonstrator inside the cylinders elicited more exploration in WT mice compared to  $\alpha$ 5-mutants in the two sex groups (genotype x trials:  $F_{(6,123)} = 2,85$ ;  $p = 0,012$ ). These results, suggest that all groups were able to discriminate between empty cylinders and cylinders containing a demonstrator mouse (Fig. 3A, 3D).

However, the proportion of time spent in the SD zone relative to the ND zone during the test was higher in WT mice in both sex groups ( $t(17) = 3,14$ ,  $p = 0,006$ ), thus revealing their ability to detect a stressed demonstrator. Female  $\alpha$ 5KI were also able to discriminate between SD and ND demonstrators ( $t(8) = 2,36$ ,  $p = 0,046$ ) but not their male counterparts ( $p = 0,70$ ). However, both male and female  $\alpha$ 5KO mice spent an equivalent amount of time in each zone ( $p > 0,33$  in males and females) (Fig. 3B) suggesting that both  $\alpha$ 5 mutations impair affective state discrimination except in female  $\alpha$ 5KI mice (Fig.3E).



**Figure 3. Genotype and Sex-dependent effects in emotion discrimination abilities.** Proportion of time spent in the cylinder zones surrounding the demonstrators during the three habituation trials and the test day across  $\alpha 5$ mutants and controls in males (**A**) and females (**D**). Proportion of time spent in the neutral demonstrator (ND) zone (Blue) and stress demonstrator (SD) zone (Red) respectively during the test across  $\alpha 5$ -mutants and controls in males (**B**) and females (**E**). Proportion of time spent in the SD zone during the test across time, segments of 30 seconds for  $\alpha 5$ -mutants and controls in males (**C**) and females (**F**) ΦΦΦ Trial Effect  $p \leq 0.01$  (RM-ANOVA); ΣΣ $p \leq 0.001$ : Scheffe post-hoc, ΣΣΣ $p \leq 0.001$  : genotype x trial interaction (ANOVA), \*\* $p \leq 0.01$ : genotype effect (ANOVA) ; oo  $p \leq 0.01$ :  $\alpha 5$ KO vs WT (Scheffé post-hoc); Σ  $p \leq 0,05$ ; ΣΣ  $p \leq 0,01$ : SD vs ND (t- test; paired).



**Figure 4. Impairment of exploratory behaviour towards a stressed demonstrator in nicotinic mutants.** SD preference score corresponding to the number of sniffings inside the ND zone subtracted to the number of sniffing inside the SD zone across α5mutants and controls in males (A) and females (B). A cut-off score is set at 10 to differentiate between discriminators (Preference score > 10) and non-discriminators (Preference score < 10) (C) ∴ p<0,05: discriminators vs non discriminators(X<sup>2</sup>); ○○○ p<0,001: profile x genotype (X<sup>2</sup> vs WT).

The recording of the percentage of time spent in the SD zone throughout the session enabled us to visualize the kinetic of the interest exhibited towards the stress demonstrator along the 6-minute duration of the trial (Fig. 3C, 3F). The ANOVA indicated a significant genotype effect ( $F_{(2,41)}=3,30, p=0,046$ ) and a significant genotype x time interaction ( $F_{(22, 451)}= 4,76, p<0,0001$ ), without any significant main effect for sex. Indeed, the time spent in the SD zone remained constant throughout the 6-minute session in WT, indicating a sustained interest for the SD. There was however significantly less exploration of the SD zone by the end of the session in α5KO ( $p>0,041$  from  $t=210$  s) but not in α5KI ( $p>0.13$ ) indicating either a decrease in the

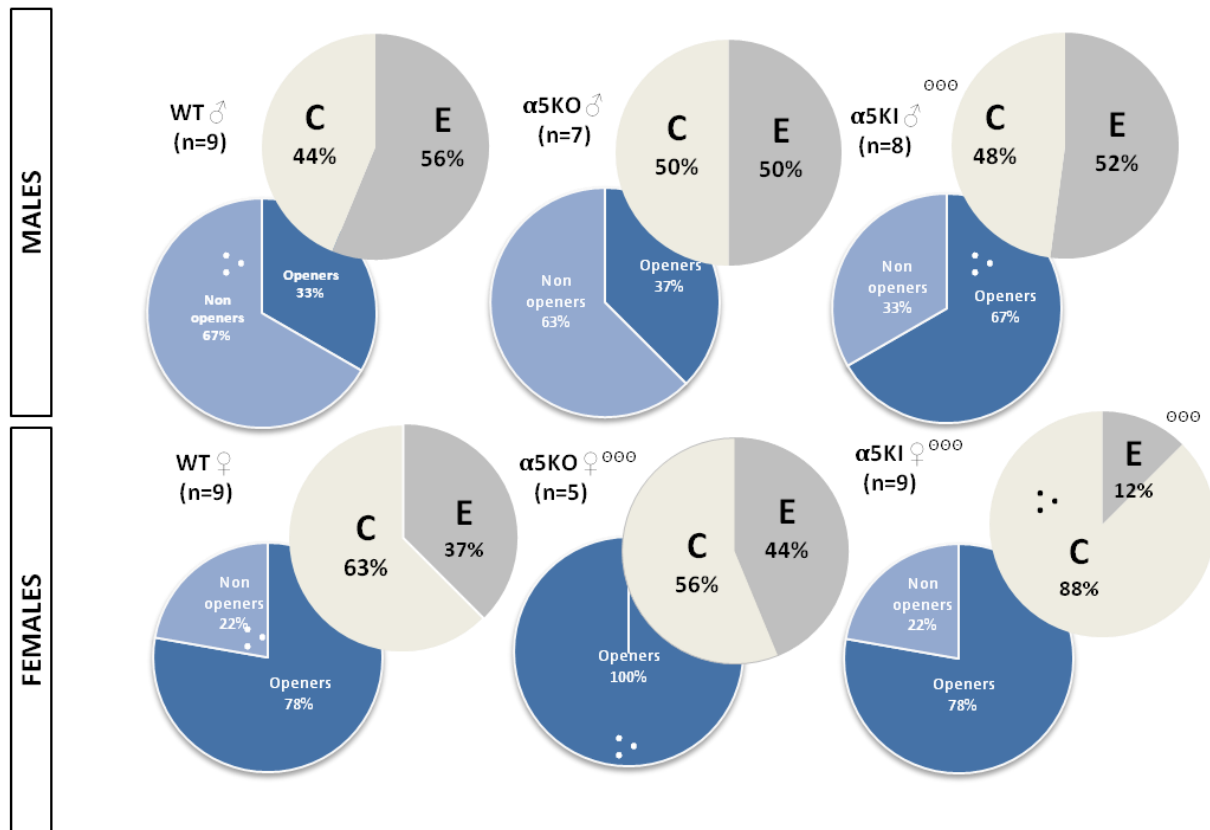


interest towards the SD and/or a lack of awareness of the stressed state of the demonstrator through time only in  $\alpha 5$ KO. We did not, however, find such main effect of genotype on the kinetic of the exploration time towards the ND, indicating a specificity of the impairment towards emotional discrimination and not social disinterest in  $\alpha 5$ KO mice.

Furthermore, a quantification of sniffing behaviour towards SD vs ND allowed us to establish a preference score for the SD (SD sniffing – ND sniffing) and by using a cut-off score of 10 sniffings, we could categorize each group into discriminators (Pref. Score >10) versus non-discriminators (Pref. Score <10), individual values are shown in Figure 4A and 4B and their discriminative profile in 4C. Female WT were unanimous affective discriminators whereas 22% of male WT were non-discriminators (Male vs Female:  $\chi^2=40,99$ ,  $n=18$ ,  $p<0,0001$ ). Moreover, these results further confirmed that male and female  $\alpha 5$ KO, and at a lesser extent  $\alpha 5$ KI, are worst discriminators (WT vs KO:  $\chi^2_{(1,17)}=4.2$ ,  $p=0.0031$ ; WT vs KI:  $\chi^2_{(1,16)}=3.7$ ,  $p=0.0031$ ) (4C).

### 3.2 $\alpha 5$ KO and $\alpha 5$ KI Mice Display Opposite Cagemate Freeing Profiles

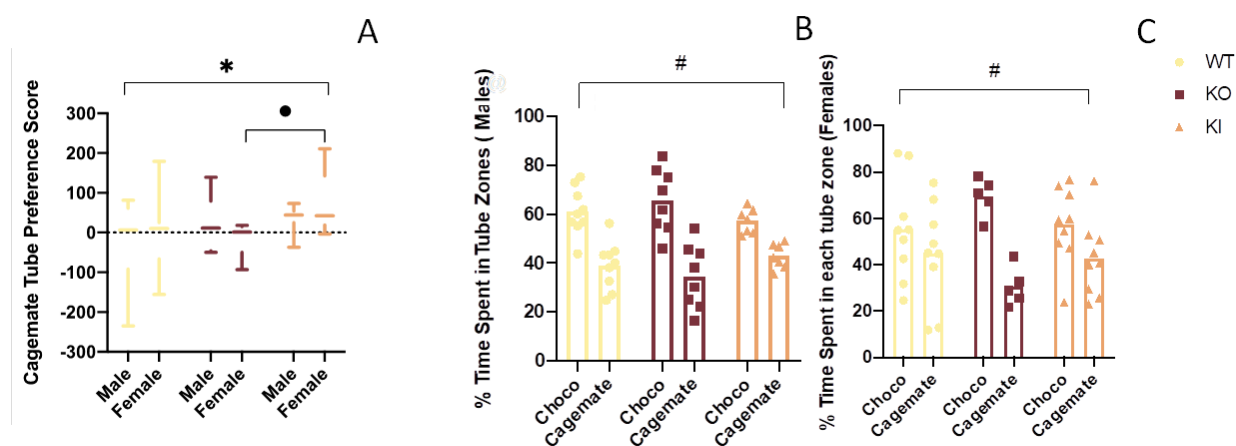
In this task, we aimed at investigating the pro-social profile of  $\alpha 5$  mutants. Over the first two days of the test, the mice underwent training to learn how to open a paper-sealed tube first on the inside, while trapped inside the tube and from the outside when they were confronted with a tube containing white chocolate chips after being food deprived for 12 hours. The results showed that all mice, regardless of genotype efficiently learned how to open the paper sealed tube from the inside as witnessed by the decrease in their latency to self-freeing (Trial effect:  $F_{(5,205)}=13,52$ ,  $p<0,0001$ ). Additionally, females were quicker to free themselves between the first and second day of training compared to males (Trial x sex interaction:  $F_{(4,1,5)}=2,89$ ,  $p=0,015$ , post-hoc:  $p<0,0001$ ). Moreover, during the Chocolate versus Empty trial all the mice regardless of genotype or sex were quicker to open the chocolate containing tube on the sixth trial compared to the first (Trial effect:  $F_{(3,102)}=12,78$ ,  $p<0,0001$ ; *Post-Hoc* Bonferroni/Dun;  $p<0.0001$ ), indicating that they all efficiently learnt how to open a paper sealed chocolate-containing tube from the outside.



**Figure 5. Nicotinic mutants display an opposite cagemate freeing profile which interacts with sex.** Pie charts of the proportions of so-called ‘openers’ considered as such when they open the cagemate-containing tube at least twice over the three trials (light blue) and so-called ‘non-openers’ considered as such when they fail to open the cagemate tube more than once over the three trials (dark blue) along with the proportion of cagemate tube openings (light grey) versus empty tube openings (Dark Grey) in the trials containing a cagemate tube and the trials containing empty tubes respectively for Male WT, α5KO and α5KI mice (A,B and C) and Female WT, α5KO and α5KI mice (D, E, F).<sup>\*\*\*</sup>: Genotype \* Profile ( $X^2$  against WT)  $p < 0.05$  ; ∴: Openers versus Non-Openers ( $X^2$ )  $p < 0.05$ .

Concerning the cagemate tube opening behaviour (*Cagemate versus Empty* and *Cagemate versus Chocolate*), a distinction of opening profiles was done based on whether a minimum of 2 successful cagemate freeing events occurred out of the total 3 trials. Results are shown in Figure 5. Interestingly, WT and α5KO mice displayed similar opening profiles with both WT and α5KO females freeing their trapped cagemate more than their males counterparts did ( $X^2_{(1,18)} = 40.99$ ,  $p < 0.0001$ ;  $X^2_{(1,12)} = 3.03$ ,  $p = 0.08$ ) (Fig. 5A, 5D). Nevertheless, α5KO females were unanimous openers whereas 22% of the WT were non openers ( $X^2_{(1,14)} = 27.72$ ,  $p < 0.0001$ ). On the other hand, male and female α5KI were both majoritarily openers (Fig.5B, 5E) insofar as female α5KI mirrored the WT opening profile whereas male α5KI displayed an

opposite profile compared to WT. Looking at the relative proportion of empty tube opening, the results showed that all groups opened both tubes with a similar frequency, except female  $\alpha 5$ KI who predominantly opened more cagemate tubes (88%) than empty tubes (12%), ( $\chi^2(1, 18) = 16.39, p < 0.0001$ ). This result indicates that in contrast to all other groups, the tube opening behaviour of  $\alpha 5$ KI females was guided by the presence of a cagemate inside the tube.



**Figure 6. Mice prefer Chocolate over Cagemate containing tubes, but  $\alpha 5$ KI female mice show increased pro-social behaviour.** Cagemate vs Tube Preference Score corresponding to the number of entries inside the cagemate tube zone subtracted to the number of entries inside the chocolate tube zone across male and female groups of  $\alpha 5$  mutants and WT (A). Proportion of time spent in each tube zone during the Cagemate versus Chocolate trial for males (B) and females (C). \* Genotype effect (WT vs KI)  $p < 0.05$  (ANOVA); • Genotype effect in KO and KI females (Bonferoni, *Post-Hoc*)  $p < 0.05$ ; #: Tube effect  $p < 0.05$  (ANOVA).

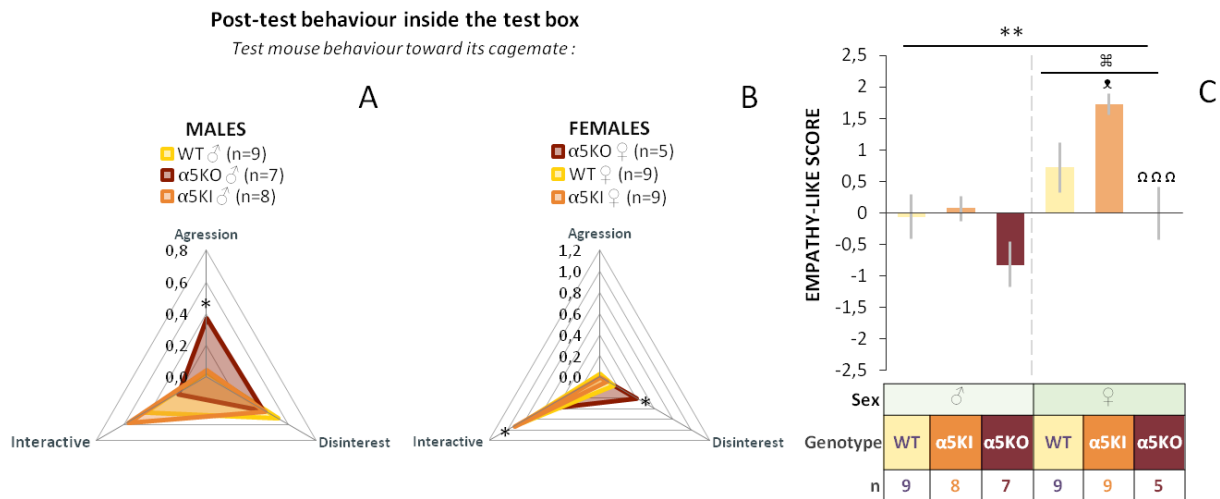
### 3.3 Nicotinic Mutants Display Opposite Profiles Relating to their Preference for the Cagemate Tube

Looking more closely at the behaviour of our groups in the case of a competition between two value-containing tubes, we placed our test mice in the testing arena with a white chocolate chip containing tube versus a cagemate containing tube. Our results suggest that all our groups regardless of sex spent more time in the surrounding of a chocolate containing tube compared to the cagemate tube ( $F_{(2,1)}=29.51, p < 0.0001$ ) (Fig. 6B, 6C). Additionally, a cagemate tube preference score expressed as the number of entries inside the chocolate tube zone subtracted to the entries inside the cagemate tube zone indicated a main genotype effect in the preference for the cagemate tube ( $F_{(2,1)}=3.43, p=0.042$ ) with  $\alpha 5$ KI mice displaying a preference for the cagemate tube compared to controls (*Post-Hoc*:  $p=0.012$ ) (Fig. 6A).

Furthermore, in females, a differentiation between  $\alpha 5\text{KI}$  and  $\alpha 5\text{KO}$  groups was found with the former showing a higher preference for the cagemate tube compared to the latter (Post-Hoc Bonferroni/Dunn;  $p=0.031$ ). These results consolidate the findings that  $\alpha 5\text{KI}$  and  $\alpha 5\text{KO}$  display opposite social emotional profiles with female  $\alpha 5\text{KI}$  displaying more prosocial behaviour compared to  $\alpha 5\text{KO}$ .

### **3.4 Nicotinic Mutants Display Opposite Interaction Profiles with the Trapped Cagemate**

A scoring of the interaction behaviour between our test mice with the cagemate inside the testing arena immediately following the exit of the cagemate from the tube (end of the test) allowed us to further characterize the social profile of  $\alpha 5$  mutants. Our results show a striking opposition between  $\alpha 5\text{KO}$  and  $\alpha 5\text{KI}$  mice depending on sex (Fig. 7C). On the one hand, male  $\alpha 5\text{KO}$  exerted higher levels of aggression towards their cagemate compared to  $\alpha 5\text{KI}$  males ( $F_{(2,21)}=5.27$ ,  $p=0.013$ ) (Fig. 7A). Female  $\alpha 5\text{KI}$ , on the other hand, tended to partake in more interactive behaviour ( $F_{(2,20)}=3,68$ ;  $p=0.043$ ) compared to  $\alpha 5\text{KO}$  who were predominantly disinterested by the cagemate ( $F_{(2,20)}=3,68$ ;  $p=0.043$ ) (Fig. 7B). To sum up the parameters of this test, a score for empathy-like behaviour was calculated considering cagemate prioritization and social interaction positivity in reference to female WT. The results show that males displayed less empathy-like behaviour compared to females as shown through their lower empathy score. Moreover,  $\alpha 5\text{KO}$  groups had the lowest empathy score (Kruskal-Wallis non-parametric test:  $H(2)=11.19$ ;  $p=0.0037$ ) compared to their sex-matched controls. However,  $\alpha 5\text{KI}$  strains displayed an opposite profile depending on sex, with females having a significantly higher score ( $t=2,34$ ;  $df=16$ ;  $p=0.034$ ) while the males showed no difference compared to controls ( $t=0.285$ ;  $df=14$ ;  $p=0.77$ ) (Fig. 7C).



**Figure 7. α5 mutants display opposite interaction profiles with the freed cagemate during the 5 minutes after the test.** Representation of the frequency of aggression, neutral or disinterested interaction for male WT, α5KI and α5KO mice **(A)** and female WT, α5KI and α5KO mice **(B)**. Empathy-like score for empathy across male and female nicotinic mutants and controls **(C)**. The empathy-like score is calculated according to two factors: Cagemate prioritization (depending on which tube is opened first between cagemate, chocolate and empty) and social-contact positivity according to which type of interaction the mice partake in with the cagemate following the test (between aggression, interactive and disinterested) \* Genotype effect  $p < 0.05$  (ANOVA); \*\* Genotype effect (Kruskal-Wallis non-parametric test)  $p < 0.05$ ; # Genotype effect in females (Kruskal-Wallis)  $p < 0.05$ ; x t-test WT vs KI (unpaired)  $p < 0.05$ ; Ω Ω Ω: t-test KI vs KO (unpaired)  $p < 0.01$ .

## 4 DISCUSSION

The present study aimed at further characterizing two strains of transgenic mice with nicotinic mutations involved in alcohol abuse in light of a comparison to Cloninger's Type I (Socially Avoidant) and Type II (Sensation Seeking) forms of Alcohol Use Disorder (AUD). Since results from our lab<sup>6</sup> have already shown that α5KI mice are hyper-anxious while α5KO display a hypo-anxious and impulsive phenotype in line with the social-emotional profile of Type I and Type II Alcoholics respectively, the aim of this study was to investigate the profile of both α5-mutants with regards to emotional discrimination capabilities as well as prosocial behaviour which are central to the human typologies.

The Affective State Discrimination Task aimed at testing the capability of mice to discriminate between a neutral demonstrator and a stressed demonstrator, as part of an emotion recognition task. Our results showed a striking interaction between genotype and sex

in  $\alpha 5$  mutants' ability to identify a stressed unfamiliar conspecific. Indeed, females were better discriminators than males generally speaking, both  $\alpha 5KI$  and  $\alpha 5KO$  mice were found to be worse discriminators compared to sex-matched controls. These results are in line with a previous study showing that male  $\alpha 5KI$  mice display a social deficit in a three-chamber sociability test as expressed through a reduction of approach of a novel unfamiliar mouse compared to controls<sup>11</sup>.

While our results are in line with our hypothesis that  $\alpha 5KO$  are less sensitive to the anxiety of a peer due to their own hypo-anxious profile, we expected that  $\alpha 5KI$  mice might be more sensitive to the stressed demonstrator due to their higher emotional arousability linked to their hyper-anxious profile. However, individuals with Type I AUD are avoidant of social interaction and risk compared to Type II. Based on this consideration it is possible that  $\alpha 5KI$  do not engage in exploratory behaviour towards the stressed demonstrator, that is unfamiliar to them, due to an aversion of risk. Indeed, a stressed unfamiliar mouse can be considered as presenting a threat with the odor, pheromones or vocalization that they generate, making  $\alpha 5KI$  mice avoidant of the stressed demonstrator. Conversely however,  $\alpha 5KO$  mice's deficit in discrimination between two demonstrators in different affective state is in line with the social detachment trait allocated to the Type II AUD profile<sup>8</sup>.

The Restrainer Tube Test (RTT) aimed at exploring prosocial behaviour through the testing of helping-like behaviour. For this elaborate social task, the mice underwent training and succeeded in learning how to open a paper sealed tube both from the inside and from the outside, regardless of their genotype or sex. However, when looking at their cagemate freeing behaviour, an interplay between genotype and sex was found. Strikingly, an opposite profile of prosocial behaviour was witnessed between male and female controls, suggesting that female mice partake in more prosocial behaviour compared to males who lack prosocial tendencies. Moreover, while the preceding test suggested that  $\alpha 5KO$  and  $\alpha 5KI$  mutants are not able to discriminate well between a state of stress and a neutral affective state; both  $\alpha 5$ -mutants had the highest proportion of cagemate freeing in females, suggesting higher rates of prosocial behaviour compared to controls. In males, however,  $\alpha 5KI$  were found to differ from controls and  $\alpha 5KO$  in their higher rate of cagemate freeing behaviour. These results suggest that  $\alpha 5KI$  mice are generally more helping of a trapped cagemate regardless of sex. Unlike in the ASDT task, in this prosocial task, the trapped mouse was a littermate of the test mouse, meaning they were acquainted with each other. In light of this consideration, it is possible that  $\alpha 5KI$  strains did not perceive the freeing of the cagemate as a risk compared to

the approach of an unfamiliar stressed demonstrator during the ASDT, which would explain why in the first task they were found to be bad affective state discriminators. Moreover, while female  $\alpha 5\text{KO}$  tended to open the cagemate tube more, both male and female  $\alpha 5\text{KO}$  mice opened empty tubes as much as they opened cagemate-containing tube, it is therefore possible that they free their cagemate because they enjoy the task of tube opening and are not necessarily motivated by the prosocial act of freeing the cagemate. In contrast, female  $\alpha 5\text{KI}$  mice overwhelmingly opened more cagemate tubes than empty ones, further validating the idea that this strain opens cagemate tubes due to their content, which can be interpreted as acting in a prosocial way. The score for empathy-like behaviour enabled us to get a good overview of the interaction of sex and mutation for the display of pro-social behaviour across our groups. While null mutants scored negatively in both sexes, female  $\alpha 5\text{KI}$  scored positively compared to controls rendering them the genotype with the most display of empathy-like behaviour.

Taken together the results of our study put forward a complex interaction between gender and genotype in the expression of emotional discrimination and prosocial behaviour which further differentiates  $\alpha 5\text{KO}$  and  $\alpha 5\text{KI}$  mutants and fits with the reverse personality profile of two extremes on the AUD spectrum: Type I and Type II AUDs as proposed by the typology of Cloninger and colleagues (1996). The profile of male but not female  $\alpha 5\text{KO}$  mirrors the emotional profile of Type II patients with their deficit in emotional discrimination along with their lack of display of prosocial behaviour which can be translated by emotional detachment in the human typology. Male  $\alpha 5\text{KO}$  also differ from their  $\alpha 5\text{KI}$  counterparts due to their higher display of aggression during social interaction with a peer, which further fits the impulsive, sensation seeking profile of Type II Alcoholics<sup>8</sup>. On the other hand, female but not male  $\alpha 5\text{KI}$  mice parallel the predominately female typology of Type I AUD due to their socially aware and emotionally dependent profile shown through their emotional discrimination and display of prosocial behaviour along with their higher rates of disinterested interaction with peers. By using two social-emotional tasks based on the identification of distress in an unfamiliar and a familiar mouse, we propose that previous studies showing  $\alpha 5\text{KI}$  mice display a deficit in sociability may be hidden by the fact that these mice are wary of risk, as presented in the form of an unfamiliar demonstrator. From a therapeutic standpoint, these results show that mice with a human genetic vulnerability linked to AUD have different socio-emotional phenotypes, which is a crucial point to take into consideration in translational research on AUD. Indeed, it further justifies the need for specificity in the treatment offers for

AUDs. While Type I patients may benefit from anxiety-reducing therapy or medication to treat the underlying motive for drinking, Type II alcoholics could benefit from a different approach that would focus on social cognitive skills to reduce the impulsive nature of disordered drinking. Further research will need to be done in the future to investigate the functional impact of either  $\alpha 5$ -nAChR mutation at the neural network level.

## REFERENCES

1. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Wang JC, Gruzca R, Cruchaga C, et al. Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. 2009; **14**(5): 501-10.
3. Santos N, Chatterjee S, Henry A, et al. The  $\alpha 5$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Plays an Important Role in the Sedative Effects of Ethanol But Does Not Modulate Consumption in Mice. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*. 2012; **37**(4): 655-662.
4. Dawson A, Wolstenholme J, Roni M, et al. Knockout of alpha 5 nicotinic acetylcholine receptors subunit alters ethanol-mediated behavioral effects and reward in mice. *Neuropharmacology*. 2018; **138**: 341-348.
5. Besson M, Forget B, Correia C et al. Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in CHRNA5: a role in alcohol dependence and feeding behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2019; **44**(11): 1906-1916
6. Tochon L, Henkous N, Besson M, et al. Mice expressing allelic variant or deletion of CHRNA5 show increased alcohol consumption but opposite motivational profiles: preclinical support for Cloninger's alcoholism typology. **In preparation for *Biological psychiatry*, 2021.**
7. Leggio L, Kenna GA, Fenton M, et al. Typologies of alcohol dependence. From Jellinek to genetics and beyond. *Neuropsychol Rev*. 2009; **19**(1): 115-29.
8. Cloninger CR, Sigvardsson S, Bohman M. Type I and type II alcoholism: An update. *Alcohol Health & Research World*. 1996; **20**(1): 18-23.
9. Lyvers M, McCann K, Coundouris S et al. Alexithymia in Relation to Alcohol Use, Emotion Recognition, and Empathy: The Role of Externally Oriented Thinking. *The American Journal Of Psychology*. 2018; **131**(1): 41.
10. Le Berre AP. Emotional processing and social cognition in alcohol use disorder. *Neuropsychology*. 2019; **33**(6), 808-821.
11. Koukouli F, Rooy M, Tziotis D et al. Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nat Med*. 2017; **23**(3): 347-354.
12. Hsu YW, Tempest L, Quina LA, et al. Medial habenula output circuit mediated by  $\alpha 5$  nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. *J Neurosci*. 2013; **33**(46): 18022-35.
13. Scheggia D, Managò F, Maltese F, et al. Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice. *Nature Neuroscience*. 2019; **23**(1), 47-60.



14. Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, et al. Helping-Like Behaviour in Mice Towards Conspecifics Constrained Inside Tubes. *Scientific Reports*. 2019; **9**(1).
15. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *The American journal of psychiatry*. 2008; **165**(9): 1163–1171.
16. Marcotte M, Bernardo A, Linga N, et al. Handling Techniques to Reduce Stress in Mice. *J Vis Exp*. 2021; (175).
17. Bartal I, Decety J, Mason P. Empathy and Prosocial Behavior in Rats. *Science*. 2011; **334**(6061): 1427-1430.
18. Fontes-Dutra M, Della-Flora Nunes G, Santos-Terra J, et al. Abnormal empathy-like prosocial behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*. 2019; **364**: 11-18.

## II- Expériences complémentaires

### 1. **Le $\alpha$ 5-SNP D398N entraîne une augmentation de la transmission BLA-CA1v et BLA-CA1d alors que la délétion de la sous-unité $\alpha$ 5-nAChR diminue la transmission BLA-CA1v**

Comme présenté en introduction de cette thèse, la sous-unité accessoire  $\alpha$ 5 des nAChRs est présente dans les régions ventrale et dorsale de l'hippocampe (HPC), ce qui nous amène à nous interroger sur le rôle de la sous-unité  $\alpha$ 5-nAChR dans la cognition sociale impliquant l'HPC. Des études ont démontré que la plasticité synaptique au sein de l'HPC est modulée par les  $\alpha$ 5\*nAChRs (Besson et al., 2016; Placzek et al., 2009). Les projections du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) à l'hippocampe ventral (HPCv), et plus particulièrement au CA1 ventral (CA1v), sous-tendent les comportements liés à l'anxiété, et la photo-modulation de cette voie induit des déficits sociaux (Y. Yang & Wang, 2017). De plus, en raison de ses connexions au cortex préfrontal (PFC), l'HPCv est considéré comme central dans la fonction sociale, comme la reconnaissance d'un congénère et l'apprentissage par les autres basé sur la « mémoire sociale » (Tzakis & Holahan, 2019). Par conséquent, les différences dans les profils émotionnels liés aux mutations de la sous-unité  $\alpha$ 5-nAChR pourraient être liées à une activité différentielle des voies BLA-CA1d et/ou BLA-CA1v.

Dans le but d'évaluer l'impact de l'absence ou du polymorphisme D398N de la sous-unité  $\alpha$ 5-nAChR sur la plasticité dans les voies BLA-CA1d et BLA-CA1v, nous avons débuté des enregistrements extracellulaires *in vivo* sur les mâles  $\alpha$ 5KO,  $\alpha$ 5KI et WT dont les données comportementales sont présentées dans l'article 3. Six semaines après leur dernier essai dans le test du RTT, 34 mâles ont été enregistrés dans les conditions décrites ci-après.

- **Matériel et méthodes**

#### **Implantation des électrodes de stimulation et d'enregistrement par chirurgie stéréotaxique.**

Deux électrodes d'enregistrement intra-crânielles ont été positionnées dans le CA1 ventral et dorsal par rapport au Bregma selon les coordonnées suivantes : vCA1, AP -3.08 mm, L 3.06 mm, DV -3.4 mm; dCA1, AP -2.0 mm, L 1.50 mm, DV -1.50. Une électrode de stimulation a été positionnée dans le BLA selon les coordonnées : AP -1.16 mm, L 3.3 mm, DV -4.9 mm. La mise en place de ces 3 électrodes a été réalisée sous anesthésie générale (induite par une injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral à 8%, à un volume de 0.1ml/10g de souris) et après placement de l'animal sur un cadre stéréotaxique. De la lidocaïne HCL (Xylocaïne®, 5%) a été utilisé comme anesthésique local au niveau du scalp et les yeux ont été protégés à l'aide d'un gel (OcryGel®). Un tapis chauffant a été utilisé pour contrôler la température corporelle et prévenir toute hypothermie induite par l'anesthésie.

### **Enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez des souris anesthésiées.**

Nous avons dans un premier temps enregistré les potentiels de champs évoqués (PCEs) simultanément dans les CA1v/d via la stimulation du BLA (chocs rectangulaires biphasiques, 100 $\mu$ s). Le signal de l'activité évoquée a été enregistré grâce à des amplificateurs opérationnels JFET, amplifié 1000 fois et filtré (1-1000 Hz ; A-M Systems) puis stocké par l'intermédiaire d'un micro-ordinateur 11 (interface CED 1401) pour une analyse ultérieure. Une courbe entrée/sortie (amplitude du signal enregistré dans le CA1d ou CA1v en fonction de l'intensité de la stimulation du BLA) a été établie pour chaque souris. Une activité basale (pré stimulation à haute fréquence) a ensuite été enregistrée pendant 20 min à une intensité de stimulation générant 50 à 70% de l'amplitude maximale dans les deux structures cérébrales (préalablement déterminée par la courbe entrée/sortie).

### **Stimulation à haute fréquence**

Afin de vérifier l'existence de modifications de la plasticité des voies BLA-CA1v/d chez les mutants  $\alpha 5$ , un protocole de stimulation à haute fréquence (SHF ; 5 trains de stimulation de 5 chocs de 100 Hz) du BLA a été appliqué après les 20 min d'enregistrement en condition basale. La SHF a ensuite été immédiatement suivie d'un enregistrement de 50 minutes à 0,05 Hz. Les changements induits par la SHF ont été estimés en pourcentage de variation par rapport aux signaux pré SHF. L'amplitude de chaque PCE dans le CA1v et le CA1d est mesurée de l'astérisque rouge à N1 et N2 respectivement (**Figure 24**). Afin de vérifier l'effet des tâches comportementales sur la plasticité, 5 mâles WT naïfs aux tâches sociales ont également été enregistrés en tant que contrôles.

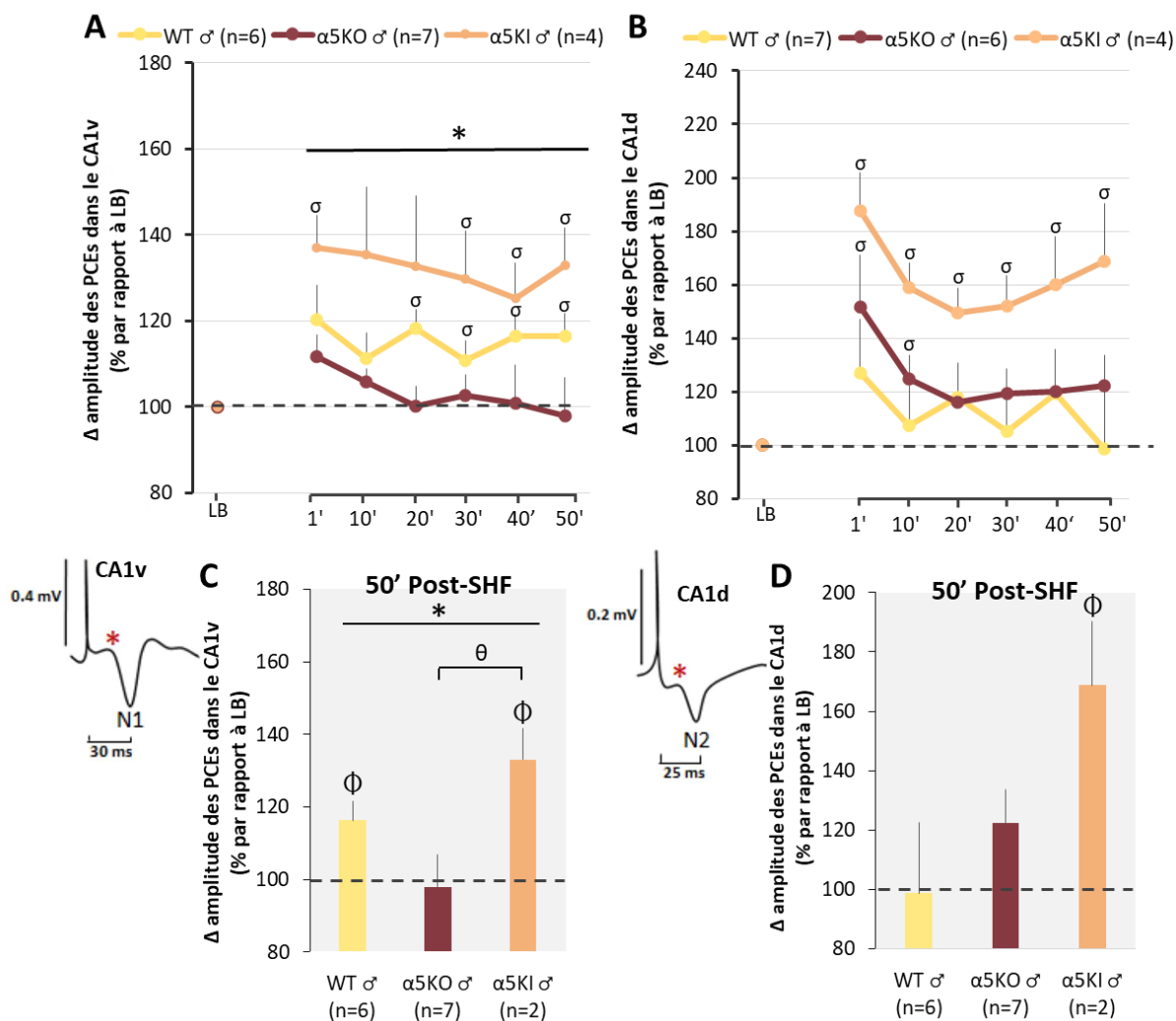
### **Analyses statistiques**

Les données électrophysiologiques (réponses évoquées exprimées en pourcentage de variation d'amplitude par rapport aux réponses basales  $\pm$  DS) des différents groupes ont été testées en tant que variables dépendantes dans une ANOVA à mesure répétée (délais post SHF) avec le génotype comme variable indépendante. La variation de l'amplitude de la réponse évoquée par la SHF par rapport aux réponses de base (pré SHF) a été analysée pour chaque groupe à l'aide d'un t tests à échantillons appariés. Le niveau de significativité statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .

- **Résultats**

**Voie BLA-CA1v.** L'analyse de la variation des potentiels de champs évoqués (PCEs) dans le CA1v après stimulation à haute fréquence (SHF) du BLA par rapport aux mesures de base révèle que les souris WT présentent une augmentation significative et à long terme (>50 minutes) de l'amplitude des PCEs dans la voie BLA-CA1v ( $t=3.07$ ,  $df=4$ ,  $p=0,037$  ; **Figure 24C**). Les mâles  $\alpha 5KI$  présentent, comme les WT, une potentialisation à long terme de l'amplitude des PCEs. En revanche, les souris  $\alpha 5KO$  ne présentent pas d'augmentation significative de la réponse par rapport à la ligne de base, quel que soit le délai post SHF. Ces observations sont soutenues par un effet de génotype significatif sur la variation de

l'amplitude des PCEs dans le CA1v ( $F(2,13)=6.6$  ;  $p=0,010$  ; Bonferroni/Dunn post-hoc,  $\alpha 5KI$  vs  $\alpha 5KO$  :  $p=0,033$ ).



**Figure 24. Modulation différentielle des voies BLA-CA1d et BLA-CA1v chez les mutants  $\alpha 5$ .** La variation de l'amplitude des PCEs dans le CA1v (**A**) et le CA1d (**B**) est exprimée en pourcentage de variation par rapport à la ligne de base chez les mâles WT,  $\alpha 5KO$  et  $\alpha 5KI$  à 1, 10, 20, 30, 40 et 50 minutes après la SHF du BLA. PCEs : potentiels de champs évoqués ; SHF : stimulation à haute fréquence. Histogrammes montrant la variation des PCEs dans le CA1v (**C**) et CA1d (**D**) 50 minutes après la SHF du BLA. Représentation schématique du signal de PCE dans le CA1v (en bas à gauche) et dans le CA1d (en bas à droite) avec l'artefact de stimulation. L'amplitude est mesurée de l'astérisque rouge à N1 et N2 dans le CA1v et CA1d, respectivement. \* $p<0,05$  : effet génotype (ANOVA) ;  $\sigma p<0,05$  : versus ligne de base (t test apparié) ;  $\theta p<0,05$  :  $\alpha 5KO$  vs  $\alpha 5KI$  (post-hoc Bonferroni/Dunn) ;  $\Phi p<0,05$  : 50min post SHF vs ligne de base (t test apparié).

**Voie BLA-CA1d.** Contrairement au CA1v, les mâles WT ne présentent pas d'augmentation significative de l'amplitude des PCEs par rapport à la ligne de base (**Figure 24B**). Ces derniers ne présentent pas non plus de potentialisation significative de la réponse dans le CA1d suite à la SHF du BLA (**Figure 24D**).

Contrairement à la voie BLA-CA1v, les souris  $\alpha$ 5KO présentent une potentialisation significative de la voie BLA-CA1d aux délais de 1 minute ( $t=2.65$ ,  $df=5$ ,  $p=0,022$ ) et 10 minutes ( $t=2.67$ ,  $df=5$ ,  $p=0,022$ ) post SHF. Les deux mutants  $\alpha$ 5 présentent une augmentation significative dans le CA1d, à court terme chez les  $\alpha$ 5KO (à 10 min) et à long terme chez les  $\alpha$ 5KI (à 50 min :  $t=3.19$ ,  $df=3$ ,  $p=0,049$  ; **Figure 24B et D**). Ces résultats montrent que la transmission amygdalo-hippocampique est plus potentialisable (CA1v/d), chez les souris  $\alpha$ 5KI que chez les souris WT et  $\alpha$ 5KO. A l'inverse, les mâles  $\alpha$ 5KO présentent un déficit dans la potentialisation de la voie BLA-CA1v après une SHF, mais pas dans la transmission à court terme dans la voie BLA-CA1d.

- **Discussion**

Notre étude électrophysiologique des voies amygdalo-hippocampiques dorsale et ventrale, connues pour être impliquées dans les comportements socio-émotionnels, a révélé d'importantes différences entre les mâles  $\alpha$ 5KI et  $\alpha$ 5KO. En effet, alors que la transmission neuronale des voies BLA-CA1v/d est plus potentialisable chez les souris  $\alpha$ 5KI, nous avons constaté que les souris  $\alpha$ 5KO présentent un déficit spécifique de la transmission entre le BLA et la région ventrale du CA1, comme le montre l'absence de potentialisation significative suite à une SHF. Ce déficit n'est pas observé dans la région dorsale du CA1 (du moins à court terme). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi les mâles  $\alpha$ 5KO présentent un déficit dans la reconnaissance émotionnelle et dans l'expression de comportements prosociaux puisque les voies BLA-CA1v sont supposées impliquées dans le traitement socio-émotionnel (Y. Yang & Wang, 2017). A l'inverse, la potentialisation plus élevée des voies amygdalo-hippocampiques chez les souris  $\alpha$ 5KI pourrait expliquer pourquoi celles-ci présentent de meilleures performances dans les tâches prosociales. De plus, nos résultats montrent qu'après une SHF du BLA les souris  $\alpha$ 5KI présentent une potentialisation à long terme dans les deux régions du CA1, comme le montre l'augmentation significative de l'amplitude des PCEs par rapport à la ligne de base au délai 50 minutes. Ces résultats suggèrent en outre une transmission plus potentialisable dans les voies BLA-CA1 des mâles  $\alpha$ 5KI que dans celles des mâles WT et  $\alpha$ 5KO. Les substrats neuronaux d'une potentialisation plus élevée dans la voie BLA-CA1v, voie impliquée dans les comportements sociaux, peuvent représenter un point de départ pour expliquer la forte sensibilité aux signaux sociaux qui caractérise les alcooliques de type I (Cloninger et al., 1996). D'autres études électrophysiologiques incluant des groupes de femelles devront être menées pour confirmer ces résultats intéressants.

---

## DISCUSSION GENERALE

---

# Le circuit des $\alpha 5^*$ nAChRs et les comportements associés à la consommation d'alcool

## I- L'ATV et l'IPN

Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié la sous-unité  $\alpha 5$  du récepteur cholinergique nicotinique (nAChR). Celle-ci fait partie des sous-unités les moins exprimées au niveau du système nerveux central (SNC), n'est pas essentielle à la formation du récepteur nAChR, ne peut pas en former un fonctionnel sans les autres sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et ne contribue pas au site de liaison de l'agoniste endogène de son récepteur : l'acétylcholine (ACh) (Albuquerque et al., 2009; Corringer et al., 2012; Gotti et al., 2006; Zoli et al., 2018). Sa fonction au sein du SNC est finalement très peu connue. Pourtant, plusieurs études pangénomiques récentes ont mis en évidence des corrélations entre des mutations du gène *CHRNA5* codant pour cette sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR et le risque de troubles liés à l'usage d'alcool (TUALs) (Hällfors et al., 2013; Joslyn et al., 2008; J. C. Wang et al., 2009). De façon intéressante, la relative faible expression de la sous-unité  $\alpha 5$  est restreinte à des structures cérébrales (Brown et al., 2007), dont certaines appartiennent au circuit cérébral de la récompense, ou à d'autres réseaux impliqués dans la régulation de la consommation d'alcool : le noyau interpedonculaire (IPN), l'aire tegmentale ventrale (ATV), le cortex préfrontal (CPF), l'hippocampe (HPC), le thalamus (TH), l'hypothalamus (HPT), le tubercule olfactif (TO) et le colliculus inférieur (CI). On sait aujourd'hui que sa présence améliore significativement l'efficacité des récepteurs  $\alpha 4\beta 2^*$ nAChRs exprimés au sein de ces structures (Scholze & Huck, 2020). Au cœur du circuit des récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs se trouvent ainsi deux centres d'intégration de signaux récompensants/aversifs: l'ATV et l'IPN (L. Wills & Kenny, 2021). Alors que l'ATV, riche en neurones dopaminergiques, est largement associée à une motivation accrue pour la nouveauté, le renforcement et les états affectifs positifs ; l'IPN est une région du cerveau régissant une motivation réduite pour la nouveauté et dirigée vers la familiarité, ainsi que l'aversion et les états affectifs négatifs. Ce sont les deux structures, en particulier l'IPN, exprimant le plus densément la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans : une population neuronale GABAergique pour l'IPN (plus spécifiquement dans son sous-noyau rostral, l'IPR) (Hsu et al., 2013; Morton et al., 2018) et dopaminergique pour l'ATV (plus spécifiquement dans sa partie postérieure, ~ sous-noyaux parabrachial pigmenté, PBP et paranigral, PN) (Klink et al., 2001; Zhao-Shea et al., 2011a). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les récepteurs

$\alpha 5^*nAChRs$  jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des neurones dopaminergiques dans le système cérébral de la récompense (Exley et al., 2012; Faure et al., 2014; Grieder et al., 2017; Morel et al., 2014b; Xiao et al., 2020). Dans le cadre de ma thèse, nous avons en plus démontré chez la souris, que les récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  interviennent dans l'activité évoquée *in vitro* par l'alcool des neurones dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN ; témoignant de leur rôle potentiellement crucial dans les systèmes cérébraux de la récompense et de l'aversion. A l'appui, nous avons démontré à l'échelle comportementale, que la délétion du gène *CHRNA5* diminue à la fois les effets récompensants de solutions d'alcool à faibles concentrations, et les effets aversifs de solutions d'alcool à fortes concentrations. Ce qui a pour conséquence de significativement augmenter chez la souris l'auto-administration, intracérébrale ou orale, de solutions fortement alcoolisées. Nous avons aussi constaté que la réexpression neurospécifique de récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  dans les neurones GABAergiques de l'IPN de souris dépourvues du gène *CHRNA5* ( $\alpha 5KO$ ), réduit la consommation de solutions fortement alcoolisées initialement observée chez ces mutants. Dans ce projet, nous avons ainsi démontré que les récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  contribuent aux propriétés récompensantes/aversives de l'alcool et également à l'activité neuronale induite par l'alcool au niveau des systèmes cérébraux de la récompense (ATV) et de l'aversion (IPN). Les  $\alpha 5^*nAChRs$  offrent la possibilité de caractériser d'avantage ces réseaux dont l'interaction a été étonnement peu étudiée.

## II- ATV ↔ IPN ?

Des données anatomiques suggèrent que l'IPN innerve de façon directe et indirecte l'ATV, notamment via l'habénula médiane ou MHb (Claudio Cuello et al., 1978; Hayakawa et al., 1981; B. J. Morley, 1986). L'ATV envoie également des efférences en direction de la MHb qui envoie en retour ses projections les plus denses sur l'IPN (Herkenham & Nauta, 1977; McLaughlin et al., 2017; Phillipson & Pycocock, 1982). Néanmoins l'implication fonctionnelle de ces connexions n'a pas encore été caractérisée. Des études récentes suggèrent en plus l'existence de projections dopaminergiques du noyau paranigral de l'ATV innervant la partie caudale de l'IPN (DeGroot et al., 2020; Molas, Zhao-Shea, et al., 2017). Cette voie mésointerpedonculaire a été impliquée dans la régulation des comportements associés à l'anxiété et à la préférence pour la nouveauté, qui sont fortement engagées dans la recherche d'alcool. D'après nos données, il serait intéressant d'étudier l'implication de cette voie dans le comportement d'auto-administration d'alcool et de vérifier si les récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  de



l'ATV sont exprimés dans cette population dopaminergique spécifique projetant sur l'IPN. En outre, une autre étude récente a démontré qu'un sous-ensemble spécifique de neurones GABAergiques interpédunculaires exprimant la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR, appelés  $\alpha 5$ -Amigo1, régulent la préférence pour la nicotine. Ces **neurones  $\alpha 5$ -Amigo1** semblent envoyer de longues projections au noyau tegmental latérodorsal (LDTg), qui est l'une des principales sources d'innervation cholinergique des neurones dopaminergiques de l'ATV (Ables et al., 2017). Sur la base de nos données, il serait intéressant d'explorer le rôle de ces neurones GABAergiques interpédunculaires  $\alpha 5$ -Amigo1 dans la signalisation associée à l'alcool. Aussi, la découverte de ces neurones  $\alpha 5$ -Amigo1 démontre que les neurones GABAergiques de l'IPN ne codent pas seulement l'aversion mais peuvent aussi être impliqués dans les effets récompensants ou la motivation positive. De façon similaire, même si les mécanismes sont encore mal compris, de plus en plus d'études viennent étayer le rôle de la DA et des neurones dopaminergiques de l'ATV dans la modulation et le codage des expériences aversives (Lammel et al., 2014; Pignatelli & Bonci, 2015). Les récepteurs  $\alpha 5$ \*nAChRs pourraient ainsi permettre **l'identification et l'étude des rôles spécifiques de sous-populations neuronales, notamment dopaminergiques de l'ATV et GABAergiques de l'IPN**, et ainsi de mieux définir les réseaux neuronaux sous-tendant la signalisation de la récompense et de l'aversion.

### III- ? $\leftrightarrow$ ATV $\leftrightarrow$ IPN $\leftrightarrow$ ?

Les récepteurs  $\alpha 5$ \*nAChRs pourraient également sous-tendre les comportements associés à la consommation d'alcool via la modulation d'un autre système que le système dopaminergique du circuit de la récompense : le **système sérotoninergique**. L'IPN envoie en effet de nombreuses projections en direction des noyaux du raphé, dont la fonction la plus importante et la plus connue est la libération de sérotonine. De façon intéressante, les neurones GABAergiques  $\alpha 5$ -Amigo1 de l'IPN projettent sur les noyaux médian (MnR), paramédian (PMnR) et dorsal du raphé (DRN). De plus en plus de données issues d'études précliniques et cliniques impliquent les systèmes sérotoninergiques (5-HT) dans la physiopathologie des TUALs (Marcinkiewicz, 2015). L'hypofonction 5-HT, par exemple, est associée à un alcoolisme précoce qui conduit à la consommation impulsive d'alcool. L'hyperfonction 5-HT, d'autre part, est associée à l'anxiété et peut jouer un rôle dans la consommation d'alcool à des fins d'automédication. De plus, une étude récente a révélé que la stimulation optogénétique des afférences 5-HT du DRN sur le NAc est récompensante (Z. Liu et al., 2014). Etant donné la ressemblance frappante que nous mettons en évidence entre

les phénotypes des souris mutées au niveau de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR et les phénotypes associés à une hypo/hyperfonction 5-HT (comportements impulsifs et agressifs des souris  $\alpha 5$ KO et à l'inverse, anxieux des souris  $\alpha 5$ KI), nous suggérons que les récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs de la voie IPN  $\rightarrow$  DRN pourraient jouer un rôle crucial dans l'expression de ces phénotypes et donc dans les comportements associés à l'abus d'alcool.

La fonction et l'implication d'autres voies intéressantes pourraient également être éclaircies par l'étude des récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs. Ces derniers sont en effet également exprimés dans les interneurons GABA VIP (exprimant le peptide vasoactif intestinal) des couches I/III et les neurones pyramidaux de la couche VI du cortex préfrontal (CPF) qui est impliqué dans la perte de contrôle vis-à-vis de la consommation d'alcool. Ils sont aussi présents au niveau du CA1 ventral et du subiculum de l'hippocampe (HPC) qui jouent notamment un rôle crucial dans les aspects socio-émotionnels ; des facteurs importants dans le développement des TUALs. De plus, une étude récente a démontré l'existence de projections sérotoninergiques de l'IPR innervant la partie ventrale de l'HPC (Sherafat et al., 2020). Pour finir, les récepteurs  $\alpha 5^*$ nAChRs sont exprimés dans l'hypothalamus (HPT), le thalamus (TH), le tubercule olfactif (TO) et le colliculus inférieur (CI) dont l'implication dans les comportements associés à l'alcool ont été suggérés mais restent mal compris (Bordia & Zahr, 2020; Huang et al., 2018; Ikemoto, 2007; Z. Zhang et al., 2017).

Un point particulièrement important reste à éclaircir via l'étude de ces réseaux : pourquoi les lignées mutantes  $\alpha 5$ KI et  $\alpha 5$ KO, dont les modifications génétiques affectent la même protéine (la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR), consomment toutes deux significativement plus d'alcool à forte dose que leur congénères non mutées (WT), mais expriment des phénotypes comportementaux opposés ? Le  $\alpha 5$ -SNP D398N du gène *CHRNA5* (souris  $\alpha 5$ KI) semble induire une perte seulement partielle de la fonction de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR, en comparaison avec sa délétion (souris  $\alpha 5$ KO). Il est alors possible que dans l'un ou l'autre de ces cas, des **mécanismes de compensation différentiels** soient mis en place et que ceux-ci ne concernent que certaines voies spécifiques, notamment la voie GABAergiques  $\alpha 5$ -Amigo<sup>1</sup> de l'IPN projetant sur les noyaux du raphé. De manière générale, compte tenu de la distribution généralisée des récepteurs nAChRs, les délétions de sous-unités individuelles dans des modèles murins sont, à l'exception de la sous-unité  $\alpha 3$ , étonnamment bien tolérées (Champtiaux & Changeux, 2004; N. Wang et al., 2002). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette observation : la neurotransmission ou modulation cholinergique qui agit en parallèle d'autres neurotransmetteurs, peut en cas de déficit, être compensée par ces derniers ; la fonction

d'une sous-unité manquante pourrait être remplie par des sous-unités normalement transcrites ; ou la délétion/l'altération d'un gène de sous-unité nAChR pourrait être compensée par la régulation d'autres ARNm de sous-unité nAChR. Il a été démontré que la délétion du gène CHRNA5 de la sous-unité  $\alpha 5$  n'affecte pas les niveaux d'ARNm des autres sous-unités nAChRs qui l'accompagnent, ni dans le SNC, ni dans le ganglion cervical supérieur (David et al., 2010; Putz et al., 2008; Salas et al., 2003). Il est donc tout à fait possible que la neurotransmission dans certaines voies spécifiques soit régulée à la baisse ou à la hausse : (1) seulement dans le cas de l'absence de  $\alpha 5$ -nAChR ; (2) seulement dans le cas de la présence de sa version mutée  $\alpha 5^{\text{D398N}}$ -nAChR; ou (3) dans les deux cas mais de façon différente. L'étude des effets comportementaux associés à la manipulation par exemple optogénétique ou chémogénétique des différents réseaux  $\alpha 5$ \*nAChRs mentionnés ci-haut, ou bien leur analyse électrophysiologique chez les souris  $\alpha 5\text{KI}$  et  $\alpha 5\text{KO}$ , permettrait de déterminer si certaines voies régulées à la hausse ou à la baisse sont à l'origine des fortes différences phénotypiques.

#### IV- Dimorphisme sexuel dans les circuits et fonctions des $\alpha 5$ \*nAChRs

Comme souligné dans la revue Moen et Lee, 2021, les sujets femelles sont historiquement sous-représentés dans la recherche préclinique. Une méta-analyse historique de 2011 a révélé que seulement 20% des publications en neurosciences incluaient les deux sexes (Beery & Zucker, 2011). Des analyses plus récentes ont montré des améliorations modérées avec ~50% des publications en neurosciences rapportant l'utilisation de sujets masculins et féminins en 2017, bien que seulement 15% de ces études utilisant les deux sexes incluaient explicitement le sexe comme variable expérimentale (Mamlouk et al., 2020; Woitowich et al., 2020). De même, relativement peu d'études ont spécifiquement abordé le rôle des récepteurs nAChRs dans les comportements associés à l'alcool en utilisant à la fois des animaux mâles et femelles : une recherche PubMed avec le mot-clé « récepteur nicotinique » répertorie plus de 22 400 publications de 1990 à 2021, tandis que l'utilisation des mots-clés « récepteur nicotinique » et « sexe » ne renvoie qu'à ~320 résultats. Pourtant, il est aujourd'hui connu que les hommes et les femmes diffèrent dans leur vulnérabilité aux drogues, notamment à travers les différentes phases du développement de l'addiction (J. B. Becker & Koob, 2016; Lynch, 2018). Pour toutes ces raisons, nos travaux ont été menés chez des sujets des deux sexes, et ceux-ci ont chacun été étudié comme groupe à part entière. Globalement, les effets de la délétion ou du  $\alpha 5$ -SNP D398N du gène CHRNA5 ont des

conséquences similaires chez les souris mâles et femelles, mais nous avons observé plusieurs différences qualitatives et/ou quantitatives importantes.

La délétion constitutive des récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  augmente significativement l'auto-administration intra-ATV de solutions d'alcool à fortes concentrations chez les deux sexes. Cependant, les femelles ont montré une acquisition plus rapide que les mâles, aussi bien de la préférence ( $\alpha 5KO$ ), que de l'évitement (WT) pour l'alcool à plus forte dose. Fait intéressant, les femelles ont tendance à progresser plus rapidement dans le développement d'un TUAL par rapport aux hommes (Agabio et al., 2017). Cependant, l'auto-administration élevée rapidement acquise chez les femelles  $\alpha 5KO$  semble transitoire. Pour déterminer si cette cinétique reflète une vulnérabilité plus élevée ou plus faible au développement d'un potentiel TUAL, il serait instructif d'évaluer leur auto-administration d'alcool après une période d'abstinence forcée, ou de répéter ces expériences avec un paradigme d'auto-administration intermittent (tous les deux jours au lieu de jours consécutifs). Nous avons également mis en évidence d'importantes différences entre les sexes dans l'activité de l'IPN, avec des réponses évoquées par l'alcool dans les neurones GABAergiques de l'IPN opposées entre les mâles et les femelles WT (non retrouvées entre les mâles et les femelles  $\alpha 5KO$ ). Une étude récente a révélé qu'une exposition chronique à la nicotine entraîne une augmentation des niveaux de transcription de *chrna5* dans l'IPN, mais seulement chez les femelles (Correa et al., 2019). De plus, par rapport aux rats, les rates présentent un plus grand nombre de cellules actives dans la partie centrale de l'IPN en réponse à un sevrage nicotinique; et cette activation de l'IPN induite par le sevrage est corrélée à des états affectifs négatifs chez les femelles, mais pas chez les mâles (Matos-Ocasio et al., 2021b). Des mécanismes sexe-spécifiques impliquant les  $\alpha 5^*nAChRs$  pourraient donc contribuer à des réponses différentielles à la nicotine mais aussi à l'alcool et à leur sevrage, entre les hommes et les femmes.

L'expression de la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$  dans l'IPN est modulée de façon dose-dépendante par la progestérone (Gangitano et al., 2009). Il pourrait donc être intéressant d'évaluer si les réponses évoquées par l'alcool dans les neurones GABAergiques de l'IPN des femelles WT varient au cours du cycle œstral. En revanche, il est important de noter qu'un rôle des hormones sexuelles dans l'expression et la fonction des  $nAChRs$  n'implique pas nécessairement une variabilité comportementale tout au long du cycle œstral. L'idée selon laquelle les mesures des résultats chez les rongeurs femelles sont intrinsèquement plus variables que chez les mâles en raison du cycle œstral a été réfutée à de nombreuses reprises (Beery, 2018). Plusieurs études ont démontré que l'auto-administration d'alcool chez les rates

adultes ne varie pas selon la phase de l'œstrus (Donny et al., 2000; Priddy et al., 2017); cependant, une étude a rapporté une augmentation de la recherche de nicotine chez des rates adolescentes soumises à un sevrage nicotinique pendant la phase de l'œstrus (Lynch et al., 2019). L'effet sexe-dépendant le plus rapporté dans la littérature est que les rongeurs femelles consomment de plus grandes quantités d'alcool que les mâles dans les paradigmes chroniques de 2BC (« 2-bottle choice »), de DID (« drinking-in-the-dark ») ou opérants (Lynch, 2018; Nieto & Kosten, 2017; O'Rourke et al., 2016; Priddy et al., 2017; Szumlinski et al., 2019).

En accord avec la littérature, nous avons constaté que les souris femelles boivent d'avantage d'alcool que les mâles dans un protocole intermittent de 2BC (avec des solutions alcoolisées entre 3 et 40%). Toutefois, nous n'avons pas constaté cet effet dans le protocole d'auto-administration intra-ATV d'alcool; les femelles WT s'auto-administrent même significativement moins que les mâles WT pour l'une des doses testée (56mg%). Ce qui suggère que l'hypothèse seule d'un dimorphisme sexuel au niveau de l'ATV et de ces cibles n'explique pas la plus forte consommation orale observée chez les femelles, et que d'autres structures et réseaux entrent en jeu. Comme dans le paradigme intra-ATV, la délétion ou le  $\alpha 5$ -SNP D398N du gène *CHRNA5* augmente significativement l'auto-administration orale d'alcool à fortes doses chez les deux sexes, mais pour des solutions d'alcool à 40% chez des femelles et à 60% chez les mâles. De plus, la réexpression neurospécifique de la sous-unité  $\alpha 5$ -nAChR dans les neurones GABAergiques de l'IPN réduit significativement la consommation d'alcool chez les mâles  $\alpha 5$ KO, mais pas chez les femelles  $\alpha 5$ KO. Ces données montrant une interaction entre les mutations de *CHRNA5* et le sexe renforcent l'hypothèse que des mécanismes sexe-spécifiques impliquant les  $\alpha 5$ -nAChRs pourraient contribuer aux réponses différentielles associées à l'alcool, entre les mâles et les femelles. Comprendre les différences entre les sexes en matière de vulnérabilité à l'abus d'alcool et les mécanismes neuronaux à l'origine de ces différences est essentiel pour acquérir une compréhension complète du comportement et développer des traitements pour les hommes et les femmes diagnostiqués avec un TUAL. Mais comme discuté ci-après, le sexe n'est pas seul facteur qu'il devient essentiel d'appréhender dans les recherches autour de l'alcool...

## Mutants $\alpha 5$ -nAChRs : modèles précliniques de TUALs spécifiques ?

### I- Vers une meilleure appréhension de l'hétérogénéité des TUALs : les sous-types

Un TUAL est le résultat d'une combinaison de facteurs biologiques/génétiques, comportementaux et environnementaux ; autant de combinaisons possibles qui peuvent générer différentes motivations à consommer de l'alcool et donc différentes formes de TUALs, notamment entre les hommes et les femmes. Pour faire face à cette hétérogénéité, des chercheurs tentent d'en identifier les sous-types sur la base de plusieurs caractéristiques : le sexe, l'âge, les antécédents familiaux, le profil de consommation, les traits de personnalité et les troubles psychiatriques associés. Depuis 1960 à nos jours, au moins 12 typologies différentes du TUAL, comprenant deux à cinq sous-types, ont été proposées (Leggio et al., 2009). En particulier, deux d'entre elles ont été établies à partir d'échantillons communautaires et pas seulement de patients cherchant à recevoir un traitement : (1) la classification de Cloninger basée sur les données d'une grande étude d'adoption en Suède (Cloninger et al., 1996) ; (2) et la classification de l'institut national américain pour l'abus d'alcool et l'alcoolisme (NIAAA), basée sur les données d'une enquête épidémiologique représentative à l'échelle des Etats-Unis d'Amérique (Moss et al., 2007).

#### 1. Les sous-types I et II de Cloninger

Cloninger identifie deux sous-types de TUALs : le « type I » et le « type II ».

Le **type I** est caractérisé par l'apparition de problèmes de consommation après 25 ans, et est associé à une personnalité anxieuse, une forte dépendance à la récompense, un fort évitement du risque/des stimuli aversifs et une faible recherche de nouveauté (expliquant l'initiation tardive). L'individu peut s'abstenir de consommer mais perd le contrôle après une période prolongée de consommation d'alcool motivée par la réduction de l'anxiété. Pour que l'alcoolisme de type I s'exprime, l'individu doit à la fois être génétiquement prédisposé et être élevé ou évoluer dans un milieu dysfonctionnel. Ce sous-type est d'avantage représenté chez les femmes que chez les hommes.

A l'opposé, le **type II** se caractérise par l'apparition précoce d'une consommation anormale (avant 25 ans) et affecte majoritairement des hommes dont la consommation d'alcool est

motivée par l'effet euphorisant. L'individu est incapable de s'abstenir de boire et présente des comportements impulsifs, de prise de risque voire d'ordre criminels. Ce type est associé à une personnalité antisociale, avec une faible dépendance à la récompense, une recherche de nouveauté élevée, un faible évitement des stimuli aversifs et souvent, à la consommation d'autres drogues. D'après les études de Cloninger, la prédisposition génétique de ce type d'alcoolisme s'exprimait chez les fils de pères alcooliques par un risque neuf fois plus élevé que dans la population générale, indépendamment du milieu postnatal.

Une étude publiée en 2014 et basée sur des données du projet GARP (« Gothenburg Alcohol Research Project »), a renforcé la pertinence du type II dont le trait le plus caractéristique semble être la « recherche de nouveauté » (Wennberg et al., 2014). Néanmoins cet article souligne que le type I est un groupe très hétérogène qui pourrait être divisé en différents sous-types. De façon intéressante, la typologie de Cloninger semble aussi s'appliquer aux consommateurs d'alcool non dépendants comme les « binge drinkers » (Gierski et al., 2017).

## 2. Les 5 sous-types de TUALs du NIAAA

La typologie du NIAAA (Moss et al., 2007), la plus récente, distingue quant à elle cinq sous-types : « jeune adulte », « jeune antisocial », « fonctionnel », « familial intermédiaire » et « chronique sévère ». Brièvement :

Le sous-type **jeune adulte** représente environ 31.5% des personnes souffrants de TUALs et inclut des buveurs jeunes adultes présentant un taux relativement faible d'abus d'autres substances ou d'autres troubles mentaux, ainsi qu'un faible taux de TUAL familial. Ceux-ci ne cherchent généralement pas d'aide pour leur problème d'alcool.

Le sous-type **jeune antisocial** (~21%) comprend des individus au milieu de leur vingtaine qui ont commencé précocement à boire régulièrement. Plus de la moitié proviennent de familles où des problèmes de TUALs sont rapportés, et près de la moitié souffrent de trouble de la personnalité antisociale (TPAS). Plusieurs d'entre eux souffrent de dépression majeure, de trouble bipolaire, de problèmes d'anxiété et d'addiction à d'autres drogues (plus particulièrement à la nicotine ou à la cocaïne). Environ un tiers recherche de l'aide pour leur problème d'alcool.

Le sous-type **fonctionnel** (~19.5%) concerne des individus d'âge moyen, avec une famille et un emploi stable. Environ un tiers ont une histoire multigénérationnelle de TUALs, environ un quart ont fait une dépression majeure au cours de leur vie et près de 50% sont des fumeurs.

Le sous-type **familial intermédiaire** (~19.5%) inclut des individus d'âge moyen dont la moitié proviennent de familles avec un TUAL multigénérationnel. Près de la moitié ont déjà fait une dépression, et 20% ont un trouble bipolaire. La plupart fument la cigarette et un cinquième ont des problèmes avec l'usage de la cocaïne et de la marijuana. Seulement 25% cherchent un traitement pour leur problème d'alcool.

Le sous-type **chronique sévère** (~9%) est représenté par des individus d'âge moyen ayant développé précocement une consommation anormale d'alcool et présentant des taux élevés de TPAS et de criminalité. Près de 80% viennent de familles avec des problèmes multigénérationnels de TUALs. Ils présentent les plus hauts taux de troubles psychiatriques incluant la dépression, le trouble bipolaire et les troubles anxieux ainsi que des taux élevés de dépendance à la cigarette, au cannabis, à la cocaïne et aux opiacés (héroïne). Deux tiers de ceux-ci cherchent de l'aide, ce qui en fait le sous-type le plus prévalent dans la patientèle des traitements des TUALs.

L'ensemble des différents résultats que nous avons recueillis suggère qu'il pourrait être très intéressant de développer des modèles précliniques pour les différents sous-types de TUALs humains. Nos données indiquent que les lignées mutantes  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$  dont les modifications génétiques affectent la même protéine (la sous-unité  $\alpha 5-nAChR$ ), consomment toutes deux significativement plus d'alcool à forte dose que leur congénères non mutées (WT), tout en exhibant des traits comportementaux opposés. De façon frappante, de nombreuses caractéristiques phénotypiques des souris mutantes  $\alpha 5KI$  correspondent à celles du TUAL de type I de Cloninger, et de nombreuses caractéristiques des souris mutantes  $\alpha 5KO$  reflètent celles observées dans le type II de Cloninger (**Figure 25**). Les souris  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$  pourraient-elles permettre le développement de modèles précliniques pertinents pour les TUALs de type I et II, respectivement ? Evidemment, le TUAL semble s'exprimer chez l'humain de plus de deux formes différentes : au moins cinq d'après le NIAAA. Mais les typologies de Cloninger et du NIAAA partagent, comme avec plusieurs autres typologies proposées, de nombreuses similitudes. Les sous-types « fonctionnel » et « familial intermédiaire » du NIAAA, caractérisés par une forte composante dépressive et un développement tardif pourraient correspondre à deux sous-groupes du Type I de Cloninger. Tandis que les sous-types « jeune antisocial » et



« chronique sévère » (et éventuellement « jeunes adultes ») caractérisés par une très forte influence génétique, une apparition précoce et des TPAS, pourraient correspondre à des sous-groupes du Type II de Cloninger. Et même si cette typologie à cinq sous-types venait à être renforcée et validée chez l'humain, serait-il possible de capturer toute cette complexité dans des modèles précliniques ? Initier cette démarche en débutant avec un modèle binaire comme celui de Cloninger, modéliser au moins deux extrêmes de ce spectre continu de manifestations de TUALs, pourrait déjà permettre l'identification de cibles thérapeutiques et l'élaboration de thérapies plus spécifiques à certaines populations de patients souffrant de TUALs.

Les sous-types de TUALs de Cloninger

Caractéristiques	TYPE I	$\alpha$ 5KI mice	TYPE II	$\alpha$ 5KO mice
Âge d'initiation	Après 25	?	Avant 25	?
Distribution par genre	$\text{♀} \geq \text{♂}$	Similaire, plus prononcé chez les ♀	$\text{♂} > \text{♀}$	Similaire, plus prononcé chez les ♂
Anxiété	+	+ (avec $\uparrow$ CORT)	-	- (avec $\downarrow$ CORT)
Recherche de nouveauté (recherche de sensation chez l'humain)	-	-	+	=
Impulsivité (opposée au contrôle comportemental)	-	-	+	+
Compétences sociales / "empathie"	+	+	-	-
Agressivité	-	-	+	+

**Figure 25. TUALs de type I/II et souris  $\alpha$ 5KI/ $\alpha$ 5KO.** Tableau résumant les similitudes entre les profils définissant les sous-types de TUALs I et II de Cloninger (Cloninger et al., 1996) et les phénotypes comportementaux des souris mutantes  $\alpha$ 5KO et  $\alpha$ 5KI. CORT : corticostérone (biomarqueur associé au stress).

## II- Souris transgéniques $\alpha$ 5KI/ $\alpha$ 5KO comme modèles précliniques des TUALs de type I/II ?

### 1. La pertinence des modèles murins transgéniques $\alpha$ 5KI et $\alpha$ 5KO

La génétique joue un rôle crucial dans l'étiologie des TUALs. Les souris  $\alpha$ 5KI et  $\alpha$ 5KO sont basées sur des mutations humaines associées à une augmentation du risque de

développer des troubles de l'usage d'alcool, ce qui leur confère au moins un critère de validité conceptuelle (bien qu'insuffisant à lui seul) en tant que modèle préclinique de TUAL. Et comme mentionné plus haut, plusieurs de leurs critères leur confèrent une validité d'apparence pertinente avec les TUALs de type I et II. Les mutants  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$  présentent en effet des comportements de consommation d'alcool anormaux, avec une **surconsommation de solutions fortement alcoolisées** par rapport à leurs congénères WT. Associée à ce profil de consommation d'alcool, les mutants  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$  présentent des phénotypes particuliers rappelant les profils respectifs associés aux TUALs de type I et II. En accord avec leurs plus faibles niveaux de corticostérone (« hormone du stress »), les souris  **$\alpha 5KO$**  présentent un phénotype hypoanxieux dans les tests du labyrinthe en croix surélevé (EPM) et du step-down (SD), et impulsif dans le SD. Elles montrent également de mauvaises performances sociales dans les tests de reconnaissance des émotions (ASDT, « affective state discrimination task ») et d'aide vis-à-vis d'un congénère piégé (RTT, « restrainer tube test »). Dans ce dernier test, les mâles  $\alpha 5KO$  présentent également des comportements agressifs envers leurs congénères, tandis que les femelles  $\alpha 5KO$  interagissent juste significativement moins que les WT. À l'inverse, les mâles et les femelles  **$\alpha 5KI$**  ne présentent pas de phénotype impulsif et ont tendance à être hyperanxieux, à en juger par l'augmentation du pourcentage de « freezing » (réponse de peur) dans le SD, la diminution du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM et les niveaux plus élevés de corticostérone en condition basale. Les mâles  $\alpha 5KI$  présentent également une plus faible préférence pour la nouveauté que leurs congénères WT. Concernant leur profil social, les mâles et les femelles présentent de moins bonnes performances dans le test de reconnaissance émotionnelle (ASDT). Néanmoins, dans ce protocole, les souris « démonstratrices » des états affectifs négatifs (stress) ou neutres à différencier, sont inconnues à la souris testée. Il est possible que les  $\alpha 5KI$  explorent moins le démonstrateur stressé, qui ne leur est pas familier, en raison de leur hyperanxiété et plus faible prise de risque. En effet, une souris inconnue stressée peut être considérée comme une menace de par les différents signaux de détresse qu'elle génère (odeurs, phéromones, vocalisations), ce qui pourrait favoriser un certain évitement du démonstrateur stressé chez les souris  $\alpha 5KI$  et dissimuler leur capacité à différencier les états affectifs de leurs congénères. De plus, les performances des souris  $\alpha 5KI$  dans le test social du RTT sont similaires aux WT chez les mâles, et même meilleures que celles des WT chez les femelles : les femelles  $\alpha 5KI$  présentent un score « d'empathie » significativement supérieur à celui des WT. L'ensemble de ces données renforce la **ressemblance souris  $\alpha 5KI$ /alcooliques de type I**, et **souris  $\alpha 5KO$ /alcooliques de type II**. Il serait intéressant de tester la validité prédictive de ces

modèles  $\alpha 5KI/\alpha 5KO$  en évaluant leur réponse à des traitements reconnus pour diminuer la consommation d'alcool. Le problème c'est qu'on ne sait pas encore comment les différents sous-types de TUALs réagissent à ceux-ci.

## 2. Les limites de cette translation/comment la renforcer

### a. Côté préclinique

L'un des problèmes récurrents dans les modèles précliniques des TUALs est de juger si ceux-ci expriment des comportements correspondant aux critères d'addiction évalués chez l'homme. Les mutants  $\alpha 5$  présentent une surconsommation d'alcool malgré des concentrations normalement aversives chez les WT. Il est maintenant essentiel de renforcer leur pertinence en évaluant si ceux-ci présentent d'**autres comportements addictifs associés à la consommation d'alcool** tels que : la préférence pour l'alcool parmi d'autres options récompensantes, le maintien de la consommation d'alcool en dépit de punitions (par exemple de l'ajout de concentrations croissantes de quinine dans une solution d'alcool à 20%), la recherche compulsive d'alcool dans un modèle opérant à ratio progressif ou encore la sévérité du sevrage et le comportement de rechute après une période d'abstinence. Dans le protocole intermittent de 2BC, nous n'avons pas constaté de différence significative entre le niveau de consommation des mutants  $\alpha 5$  et celui des WT pendant les 30 premières minutes suivant la présentation de l'alcool à 40 et 60% ; ce qui laisse suggérer que le profil de surconsommation des mutants  $\alpha 5$  n'est pas compulsif ou similaire à du « binge drinking » et qu'il s'opère tout au long des 24h. Mais cela n'exclut pas que les mutants  $\alpha 5$  présentent de brefs épisodes de consommation excessives ou qu'ils en présentent plus que les WT, à d'autres délais ou avec d'autres concentrations d'alcool. L'utilisation de liquomètres dans le 2BC permettrait de mieux cerner la microstructure de leur consommation d'alcool et donc l'aspect compulsif ou non de leur consommation (Vengeliene et al., 2013). L'utilisation d'un autre type de paradigme comme l'auto-administration opérante ou le DID pourrait également permettre la mise en évidence de ce type de différences.

En dehors du critère de « consommation anormale d'alcool » qu'il faut renforcer, il y a également des caractéristiques typologiques que nous n'avons pas évaluées. Notamment, **l'importance de l'âge** dans l'apparition de la consommation anormale d'alcool, qui est un critère redondant de différenciation des sous-types de TUALs (Leggio et al., 2009) : elle est précoce dans le type II et tardive dans le type I de Cloninger. Il serait intéressant d'étudier les

profils de consommation d'alcool de souris  $\alpha 5KI$  et  $\alpha 5KO$  adolescentes, et de vérifier si la surconsommation est accentuée chez les jeunes  $\alpha 5KO$ , et à l'inverse si celle-ci est absente ou réduite chez les jeunes  $\alpha 5KI$ . Aussi, certaines **spécificités neurobiologiques** ont été mise en évidence chez les individus souffrant de TUALs de type II : un plus faible niveau d'activité de l'enzyme MOA (monoamine oxydase intervenant dans le métabolisme de la sérotonine, 5-HT) (Knorrning et al., 1985; Sullivan et al., 1990), de plus faibles niveaux de 5-HT (Virkkunen & Linnoila, 1990), et une plus faible amplitude de l'onde cérébrale P300 qui est induite en cas d'erreur de prédiction de la récompense (ERP) (Branchey et al., 1988; Cloninger, 1987). Il serait particulièrement intéressant de vérifier la présence de ces marqueurs chez les souris  $\alpha 5KO$ .

Mais de façon importante, un seul facteur même génétique, n'est pas suffisant pour engendrer un TUAL. Les modèles murins  $\alpha 5KO$  et  $\alpha 5KI$  offrent l'opportunité d'étudier **l'interaction entre la mutation du gène CHRNA5 et des facteurs environnementaux**. Par exemple, il serait intéressant d'étudier comment les phénotypes addictifs de ces mutants évoluent dans un environnement sur enrichit (grandes cages collectives avec différents refuges et jouets renouvelés) (Mariano et al., 2017). Le système de tracking *Live Mouse Tracker* (Partie II, II.2.a) permettrait un suivi détaillé de leurs activités sociales et de consommation d'alcool dans cet environnement (Chaumont et al., 2018). A l'inverse, il serait intéressant de suivre leur consommation dans un environnement négatif, par exemple pendant (et/ou après) un protocole de stress chronique léger et imprédictible (Monteiro et al., 2015). De plus, selon les travaux de Cloninger, les facteurs environnementaux (« environnement dysfonctionnel ») jouent un rôle fondamental dans le développement d'un TUAL de type I, mais moindre dans le développement d'un TUAL de type II. Il serait intéressant de vérifier si un stress chronique altère de façon plus importante le comportement de consommation d'alcool chez les souris  $\alpha 5KI$  que chez les souris  $\alpha 5KO$ . Ces différentes expériences proposées incluant les facteurs environnementaux et l'âge pourraient faire émerger des similitudes plus marquées entre les jeunes mâles  $\alpha 5KO$  et le type II, et les femelles adultes matures  $\alpha 5KI$  et le type I.

De façon importante, plusieurs SNP du gène CHRNA5 ont été associés au risque de développer un TUAL. Il serait intéressant d'étudier et de comparer les effets de certains d'entre eux avec ceux du  $\alpha 5$ -SNP D398N (rs196969968) et de la délétion du gène ( $\alpha 5KO$ ). En particulier, le  $\alpha 5$ -SNP rs588765 semble corrélé au risque de TUALs (Hällfors et al., 2013; J. C. Wang et al., 2009) ; plus clairement que le  $\alpha 5$ -SNP rs16969968 que j'ai eu l'occasion d'étudier au cours de cette thèse, et qui a engendré des résultats plutôt mitigés entre les études cliniques. Cependant, à

ma connaissance il n'existe pas encore de souris transgéniques exprimant ce polymorphisme rs588765 du gène CHRNA5.

#### b. Côté clinique

Des études cliniques et d'association pangénomiques ont montré que les humains porteurs de certains SNP du gène CHRNA5 ont une vulnérabilité accrue au développement du TUAL (Chen et al., 2009; Choquet et al., 2013; J. C. Wang et al., 2009), à l'apparition précoce d'une consommation abusive d'alcool (I. R. Schlaepfer et al., 2008), et présentent également un plus faible niveau de réponse à l'alcool, ce qui peut également augmenter leur vulnérabilité à développer un TUAL (Joslyn et al., 2008). En revanche, les différentes études examinant spécifiquement l'influence du  $\alpha 5$ -SNP D398N sur les TUALs ont abouti à des conclusions divergentes (Brynildsen & Blendy, 2021). Au moins une étude a identifié une association entre le  $\alpha 5$ -SNP et des symptômes du TUAL (Chen et al., 2009), tandis que d'autres n'ont trouvé aucune association (Hällfors et al., 2013; Sherva et al., 2010; J. C. Wang et al., 2009). Mais chez les souris, le  $\alpha 5$ -SNP D398N confère un phénotype particulier proche du TUAL de type I et donc peut-être des sous-types « fonctionnel » ou « familial intermédiaire », c'est-à-dire d'une sous-population d'alcooliques pas forcément diagnostiquée, qui ne cherche pas à se faire soigner et donc peut être sous représentée dans les études pangénomiques. Si le  $\alpha 5$ -SNP D398N est effectivement associé à ce genre de profils chez les humains, il est possible qu'une importante proportion de porteurs du  $\alpha 5$ -SNP D398N et souffrant ainsi d'une forme spécifique de TUAL ne remplissent pas les critères d'inclusion. Ou bien, si cette population est effectivement au moins en partie représentée dans ces études, il est possible que bien qu'existante, la corrélation n'émerge pas en raison de l'importante proportion d'individus souffrant d'autres formes de TUALs dont l'étiologie génétique, si il y a, peut être tout à fait différente. Aussi, dans le cas du  $\alpha 5$ -SNP D398N, si on émet l'hypothèse qu'il génère une forme tardive de TUAL, sa possible corrélation avec les TUALs peut ne pas être détectée s'il y a une forte proportion de jeunes porteurs. Il serait extrêmement intéressant de réaliser ces études d'associations entre variants génétiques et sous-types de TUALs (et non pas juste TUALs quel que soit la manière dont les sujets les expriment). Cependant, cette démarche nécessiterait des échantillons de sujets beaucoup plus conséquents, ce qui limite considérablement sa mise en œuvre. Mais tenter de prendre un peu plus en compte l'hétérogénéité des TUALs exprimés par les sujets inclus dans des études de criblage génétique ou encore d'imagerie cérébrale

permettrait de mieux appréhender cette hétérogénéité et de déceler des effets qui n'émergent pas forcément lorsque tous les sujets sont confondus.

## Intérêts thérapeutiques

### I- Les $\alpha 5^*nAChRs$ : une cible thérapeutique potentielle ?

L'une des stratégies pour palier à l'efficacité insuffisante des pharmacothérapies actuellement disponibles en matière de traitement des TUALs, est l'identification de nouvelles cibles moléculaires et le développement de nouveaux composés pour ces cibles (L. A. Ray et al., 2018). Cette stratégie est cohérente avec la complexité phénotypique et l'hétérogénéité des TUALs, qui nécessitent de multiples cibles moléculaires pouvant traiter efficacement plusieurs voies de risque (Litten et al., 2015a). Étant donné l'implication des récepteurs  $\alpha 5^*nAChRs$  dans les comportements associés à l'abus d'alcool, ceux-ci pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. Comme proposé par plusieurs chercheurs (Z. Jin et al., 2014; Kuryatov et al., 2011; Maskos, 2020), la perte partielle de fonction induite par les  $\alpha 5$ -SNPs du gène CHRNA5, comme le D398N, pourrait être restaurée par des « modulateurs allostériques positifs » (PAM) des récepteurs à haute affinité  $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*nAChRs$ . Les PAM auraient la propriété de ne pas se lier au site orthostérique et donc n'interféreraient pas avec l'action de l'ACh (<https://anr.fr/Project-ANR-17-CE11-0030>). Il serait intéressant de favoriser le développement de ces PAM $\alpha 5$  et de tester si leur administration est en mesure de restaurer certains phénotypes ainsi qu'une consommation « normale » d'alcool chez les souris a5KI.

### II- Identifier les traitements pharmacologiques spécifiques à chaque sous-type à l'aide de modèles précliniques

Une autre stratégie consiste à mieux comprendre l'étiologie et l'évolution des TUALs, ainsi que de déterminer si différents sous-types de buveurs peuvent mieux réagir à certains traitements (Litten et al., 2015a). Nos données suggèrent que des modèles précliniques murins exprimant des mutations humaines peuvent aussi aider à mieux comprendre les motivations, pouvant être opposées, à consommer de l'alcool. Celles-ci sont parfois difficiles

à identifier chez l'humain, étant donné que l'individu souffre généralement déjà d'un TUAL lors de son étude, or il peut être difficile de déterminer si des traits ou conditions psychiatriques ont contribué au développement du TUAL ou s'ils en sont des conséquences. Le développement de modèles précliniques pour les différents sous-types de TUALs permettrait une identification plus précise des mécanismes neuropharmacologiques et moléculaires sous-tendant l'addiction à l'alcool et donc des cibles thérapeutiques potentielles. Cela représenterait une avancée majeure vers l'élaboration de thérapies pharmacologiques/comportementales personnalisées plus efficaces.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---



- 23andMe Research Team, HUNT All-In Psychiatry, Liu, M., Jiang, Y., Wedow, R., Li, Y., Brazel, D. M., Chen, F., Datta, G., Davila-Velderrain, J., McGuire, D., Tian, C., Zhan, X., Choquet, H., Docherty, A. R., Faul, J. D., Foerster, J. R., Fritsche, L. G., Gabrielsen, M. E., ... Vrieze, S. (2019). Association studies of up to 1.2 million individuals yield new insights into the genetic etiology of tobacco and alcohol use. *Nature Genetics*, *51*(2), 237-244.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0307-5>
- Abdel-Magid, A. F. (2015). Allosteric Modulators : An Emerging Concept in Drug Discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *6*(2), 104-107. <https://doi.org/10.1021/ml5005365>
- Ables, J. L., Görlich, A., Antolin-Fontes, B., Wang, C., Lipford, S. M., Riad, M. H., Ren, J., Hu, F., Luo, M., Kenny, P. J., Heintz, N., & Ibañez-Tallon, I. (2017). Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular  $\alpha 5$  nicotinic neurons regulates nicotine preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(49), 13012-13017.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1717506114>
- Addolorato, G., Leggio, L., Ferrulli, A., Cardone, S., Vonghia, L., Mirijello, A., Abenavoli, L., D'Angelo, C., Caputo, F., Zambon, A., Haber, P. S., & Gasbarrini, G. (2007). *Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis : Randomised, double-blind controlled study*. *370*, 8.
- Agabio, R., Pisanu, C., Gessa, G. L., & Franconi, F. (2017). Sex Differences in Alcohol Use Disorder. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(24), 2661-2670.  
<https://doi.org/10.2174/0929867323666161202092908>
- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., & Okamoto, H. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature Neuroscience*, *13*(11), 1354-1356. <https://doi.org/10.1038/nn.2654>
- Ahmed, S. H. (2012). The science of making drug-addicted animals. *Neuroscience*, *211*, 107-125.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.014>

- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., & Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *The Journal of Comparative Neurology*, *520*(18), 4051-4066. <https://doi.org/10.1002/cne.23167>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors : From Structure to Function. *Physiological Reviews*, *89*(1), 73-120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Alkondon, M., & Pereira, E. F. R. (1997). *Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation Modulates  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Release from CA1 Neurons of Rat Hippocampal Slices*. *283*, 16.
- Allain, F., Minogianis, E.-A., Roberts, D. C. S., & Samaha, A.-N. (2015). How fast and how often : The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *56*, 166-179. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.06.012>
- Antolin-Fontes, B., Ables, J. L., Görlich, A., & Ibañez-Tallon, I. (2015). The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology*, *96*, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.019>
- Anton, R. F., Myrick, H., Baros, A. M., Latham, P. K., Randall, P. K., Wright, T. M., Stewart, S. H., Waid, R., & Malcolm, R. (2009). Efficacy of a Combination of Flumazenil and Gabapentin in the Treatment of Alcohol Dependence : Relationship to Alcohol Withdrawal Symptoms. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *29*(4), 334-342. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e3181aba6a4>
- Anton, R. F., O'Malley, S. S., Ciraulo, D. A., Cisler, R. A., Couper, D., Donovan, D. M., Gastfriend, D. R., Hosking, J. D., Johnson, B. A., LoCastro, J. S., Longabaugh, R., Mason, B. J., Mattson, M. E., Miller, W. R., Pettinati, H. M., Randall, C. L., Swift, R., Weiss, R. D., Williams, L. D., ... COMBINE Study Research Group, for the. (2006). Combined Pharmacotherapies and Behavioral Interventions for Alcohol Dependence : The COMBINE Study: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, *295*(17), 2003. <https://doi.org/10.1001/jama.295.17.2003>
- Aracri, P., Consonni, S., Morini, R., Perrella, M., Rodighiero, S., Amadeo, A., & Becchetti, A. (2010). Tonic Modulation of GABA Release by Nicotinic Acetylcholine Receptors in Layer V of the

Murine Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 20(7), 1539-1555.

<https://doi.org/10.1093/cercor/bhp214>

Augier, E., Barbier, E., Dulman, R. S., Licheri, V., Augier, G., Domi, E., Barchiesi, R., Farris, S., Nätt, D., Mayfield, R. D., Adermark, L., & Heilig, M. (2018). A molecular mechanism for choosing alcohol over an alternative reward. *Science*, 360(6395), 1321-1326.

<https://doi.org/10.1126/science.aao1157>

Augier, E., Flanigan, M., Dulman, R. S., Pincus, A., Schank, J. R., Rice, K. C., Kejun, C., Heilig, M., & Tapocik, J. D. (2014). Wistar rats acquire and maintain self-administration of 20 % ethanol without water deprivation, saccharin/sucrose fading, or extended access training.

*Psychopharmacology*, 231(23), 4561-4568. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3605-3>

Auriacombe, M. (2016). 6 LE CRAVING : MARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DES ADDICTIONS ? 6.

Azam, L., Chen, Y., & Leslie, F. M. (2007). Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*, 144(4), 1347-1360.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.011>

Baddick, C. G., & Marks, M. J. (2011). An autoradiographic survey of mouse brain nicotinic acetylcholine receptors defined by null mutants. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 828-841.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.04.019>

Bailey, C. D. C., De Biasi, M., Fletcher, P. J., & Lambe, E. K. (2010). The Nicotinic Acetylcholine Receptor 5 Subunit Plays a Key Role in Attention Circuitry and Accuracy. *Journal of Neuroscience*, 30(27), 9241-9252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2258-10.2010>

Baisden, R. H. (1979). RETROGRAD DEMONSTRATION OF HYPOTHALAMIC AFFERENTS FROM THE PERIPHERAL AND RETICULAR NUCLEI. 5.

Baker, T. B., Piper, M. E., McCarthy, D. E., Majeskie, M. R., & Fiore, M. C. (2004). Addiction Motivation Reformulated : An Affective Processing Model of Negative Reinforcement. *Psychological Review*, 111(1), 33-51. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.111.1.33>

- Baler, R. D., & Volkow, N. D. (2006). Drug addiction : The neurobiology of disrupted self-control. *Trends in Molecular Medicine*, *12*(12), 559-566.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.005>
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S. P., Lanteri, C., Godeheu, G., Tassin, J.-P., Mombereau, C., Faure, P., & Tronche, F. (2013). Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons. *Science*, *339*(6117), 332-335.  
<https://doi.org/10.1126/science.1226767>
- Barrett, S. P., Tichauer, M., Leyton, M., & Pihl, R. O. (2006). Nicotine increases alcohol self-administration in non-dependent male smokers. *Drug and Alcohol Dependence*, *81*(2), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2005.06.009>
- Batel, P., Pessione, F., Maitre, C., & Rueff, B. (1995). Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction*, *90*(7), 977-980.  
<https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1995.tb03507.x>
- Baudonnat, M., Guillou, J.-L., Husson, M., Bohbot, V. D., Schwabe, L., & David, V. (2017). Morphine Reward Promotes Cue-Sensitive Learning : Implication of Dorsal Striatal CREB Activity. *Frontiers in Psychiatry*, *8*, 87. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00087>
- Baudonnat, M., Guillou, J.-L., Husson, M., Vandesquille, M., Corio, M., Decorte, L., Faugere, A., Porte, Y., Mons, N., & David, V. (2011). Disrupting Effect of Drug-Induced Reward on Spatial But Not Cue-Guided Learning : Implication of the Striatal Protein Kinase A/cAMP Response Element-Binding Protein Pathway. *Journal of Neuroscience*, *31*(46), 16517-16528.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1787-11.2011>
- Bayer, H. M., & Glimcher, P. W. (2005). Midbrain Dopamine Neurons Encode a Quantitative Reward Prediction Error Signal. *Neuron*, *47*(1), 129-141.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.020>
- Becker, H. C. (2014). Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse. In *Neurobiology of Alcohol Dependence* (p. 377-410). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405941-2.00019-5>

- Becker, H. C., & Ron, D. (2014). Animal models of excessive alcohol consumption : Recent advances and future challenges. *Alcohol*, 48(3), 205-208.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.04.001>
- Becker, J. B., & Koob, G. F. (2016). Sex Differences in Animal Models : Focus on Addiction. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 242-263. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011163>
- Beery, A. K. (2018). Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 23, 143-149.  
<https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.016>
- Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
- Behzadi, G., Kalén, P., Parvopassu, F., & Wiklund, L. (1990). *AFFERENTS TO THE MEDIAN RAPHE NUCLEUS OF THE RAT: RETROGRADE CHOLERA TOXIN AND WHEAT GERM CONJUGATED HORSERADISH PEROXIDASE TRACING, AND SELECTIVE D-[3 HIASPARTATE LABELLING OF POSSIBLE EXCITATORY AMINO ACID INPUTS*. 24.
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., DeLoach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*, 162(3), 622-634.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Beiranvand, F., Zlabinger, C., Orr-Urtreger, A., Ristl, R., Huck, S., & Scholze, P. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors control acetylcholine and noradrenaline release in the rodent habenulo-interpeduncular complex : Nicotinic receptors in the habenula-IPN complex. *British Journal of Pharmacology*, 171(23), 5209-5224. <https://doi.org/10.1111/bph.12841>
- Bejczy, A. de, Löf, E., Walther, L., Guterstam, J., Hammarberg, A., Asanovska, G., Franck, J., Isaksson, A., & Söderpalm, B. (2015). Varenicline for Treatment of Alcohol Dependence : A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(11), 2189-2199. <https://doi.org/10.1111/acer.12854>

- Belin-Rauscent, A., Fouyssac, M., Bonci, A., & Belin, D. (2016). How Preclinical Models Evolved to Resemble the Diagnostic Criteria of Drug Addiction. *Biological Psychiatry*, *79*(1), 39-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.01.004>
- Bell, R. L., Eiler, B. J. A., Cook, J. B., & Rahman, S. (2009). Nicotinic receptor ligands reduce ethanol intake by high alcohol-drinking HAD-2 rats. *Alcohol*, *43*(8), 581-592.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.09.027>
- Berrettini, W., Yuan, X., Tozzi, F., Song, K., Francks, C., Chilcoat, H., Waterworth, D., Muglia, P., & Mooser, V. (2008).  $\alpha$ -5/ $\alpha$ -3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular Psychiatry*, *13*(4), 368-373. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002154>
- Berridge, K. C. (2012). From prediction error to incentive salience : Mesolimbic computation of reward motivation: From prediction error to incentive salience. *European Journal of Neuroscience*, *35*(7), 1124-1143. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.07990.x>
- Berry, A. S., White, R. L., Furman, D. J., Naskolnakorn, J. R., Shah, V. D., D'Esposito, M., & Jagust, W. J. (2019). Dopaminergic Mechanisms Underlying Normal Variation in Trait Anxiety. *The Journal of Neuroscience*, *39*(14), 2735-2744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2382-18.2019>
- Besson, M., Forget, B., Correia, C., Blanco, R., & Maskos, U. (2019). Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in *CHRNA5* : A role in alcohol dependence and feeding behavior. *Neuropsychopharmacology*, *44*(11), 1906-1916.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0462-0>
- Besson, M., Guiducci, S., Granon, S., Guilloux, J.-P., Guiard, B., Repérant, C., Faure, P., Pons, S., Cannazza, G., Zoli, M., Gardier, A. M., & Maskos, U. (2016). Alterations in  $\alpha$ 5\* nicotinic acetylcholine receptors result in midbrain- and hippocampus-dependent behavioural and neural impairments. *Psychopharmacology*, *233*(18), 3297-3314.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-016-4362-2>
- Bhutada, P., Mundhada, Y., Ghodki, Y., Dixit, P., Umathe, S., & Jain, K. (2012). Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice : Effects of exposure to stress and modulation by mecamylamine. *Journal of Psychopharmacology*, *26*(2), 315-323. <https://doi.org/10.1177/0269881111431749>

- Bianco, I. H., & Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei : A conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1519), 1005-1020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0213>
- Bierut, L. J., Stitzel, J. A., Wang, J. C., Hinrichs, A. L., Grucza, R. A., Xuei, X., Saccone, N. L., Saccone, S. F., Bertelsen, S., Fox, L., Horton, W. J., Breslau, N., Budde, J., Cloninger, C. R., Dick, D. M., Foroud, T., Hatsukami, D., Hesselbrock, V., Johnson, E. O., ... Goate, A. M. (2008). Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *American Journal of Psychiatry*, *165*(9), 1163-1171. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111711>
- Bito-Onon, J. J., Simms, J. A., Chatterjee, S., Holgate, J., & Bartlett, S. E. (2011). Varenicline, a partial agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, reduces nicotine-induced increases in 20% ethanol operant self-administration in Sprague-Dawley rats : Varenicline Effects in SD rats. *Addiction Biology*, *16*(3), 440-449. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00309.x>
- Bohbot, V. D., Del Balso, D., Conrad, K., Konishi, K., & Leyton, M. (2013). Caudate nucleus-dependent navigational strategies are associated with increased use of addictive drugs. *Hippocampus*, *23*(11), 973-984. <https://doi.org/10.1002/hipo.22187>
- Boileau, I., Assaad, J.-M., Pihl, R. O., Benkelfat, C., Leyton, M., Diksic, M., Tremblay, R. E., & Dagher, A. (2003). Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse*, *49*(4), 226-231. <https://doi.org/10.1002/syn.10226>
- Bordia, T., & Zahr, N. M. (2020). The Inferior Colliculus in Alcoholism and Beyond. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *14*, 606345. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.606345>
- Bossert, J. M., Marchant, N. J., Calu, D. J., & Shaham, Y. (2013). The reinstatement model of drug relapse : Recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology*, *229*(3), 453-476. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3120-y>
- Boulter, J., O'Shea-Greenfield, A., Duvoisin, R. M., Connolly, J. G., Wada, E., Jensen, A., Gardner, P. D., Ballivet, M., Deneris, E. S., & McKinnon, D. (1990). Alpha 3, alpha 5, and beta 4 : Three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a

- gene cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4472-4482.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39588-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39588-2)
- Bouvard, A., Dupuy, M., Schweitzer, P., Revranche, M., Fatseas, M., Serre, F., Misdrahi, D., Auriacombe, M., & Swendsen, J. (2018). Feasibility and validity of mobile cognitive testing in patients with substance use disorders and healthy controls : Mobile Cognitive Testing in Patients With SUD. *The American Journal on Addictions*, 27(7), 553-556.  
<https://doi.org/10.1111/ajad.12804>
- Branchey, M. H., Buydens-Branchey, L., & Lieber, C. S. (1988). P3 in alcoholics with disordered regulation of aggression. *Psychiatry Research*, 25(1), 49-58. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(88\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0165-1781(88)90157-6)
- Breslau, N., Johnson, E. O., Hiripi, E., & Kessler, R. (2001). Nicotine Dependence in the United States : Prevalence, Trends, and Smoking Persistence. *Archives of General Psychiatry*, 58(9), 810.  
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.9.810>
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D. I., & Ungless, M. A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4894-4899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811507106>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control : Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815-834.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Brown, R. W. B., Collins, A. C., Lindstrom, J. M., & Whiteaker, P. (2007). Nicotinic  $\alpha 5$  subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *Journal of Neurochemistry*, 0(0), 070615193023002-??? <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04700.x>
- Brynildsen, J. K., & Blendy, J. A. (2021). Linking the CHRNA5 SNP to drug abuse liability : From circuitry to cellular mechanisms. *Neuropharmacology*, 186, 108480.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108480>
- Bunzeck, N., & Düzel, E. (2006). Absolute Coding of Stimulus Novelty in the Human Substantia Nigra/VTA. *Neuron*, 51(3), 369-379. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.021>



- Bunzeck, N., Guitart-Masip, M., Dolan, R. J., & Duzel, E. (2014). Pharmacological Dissociation of Novelty Responses in the Human Brain. *Cerebral Cortex*, *24*(5), 1351-1360.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhs420>
- Cai, L. X., Pizano, K., Gundersen, G. W., Hayes, C. L., Fleming, W. T., Holt, S., Cox, J. M., & Witten, I. B. (2020). Distinct signals in medial and lateral VTA dopamine neurons modulate fear extinction at different times. *eLife*, *9*, e54936. <https://doi.org/10.7554/eLife.54936>
- Calabresi, P., Lacey, M. G., & North, R. A. (1989). Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. *British Journal of Pharmacology*, *98*(1), 135-140. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb16873.x>
- Caprioli, D., Zeric, T., Thorndike, E. B., & Venniro, M. (2015). Persistent palatable food preference in rats with a history of limited and extended access to methamphetamine self-administration : Methamphetamine versus food choice. *Addiction Biology*, *20*(5), 913-926.  
<https://doi.org/10.1111/adb.12220>
- Carnicella, S., Yowell, Q. V., & Ron, D. (2011). Regulation of Operant Oral Ethanol Self-Administration : A Dose-Response Curve Study in Rats: REGULATION OF OPERANT ORAL ETHANOL SELF-ADMINISTRATION. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *35*(1), 116-125. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01328.x>
- Carr, D. B., & Sesack, S. R. (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse*, *38*(2), 114-123. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200011\)38:2<114::AID-SYN2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200011)38:2<114::AID-SYN2>3.0.CO;2-R)
- Champtiaux, N., & Changeux, J.-P. (2004). Knockout and knockin mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. In *Progress in Brain Research* (Vol. 145, p. 233-251). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45016-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45016-4)
- Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Léna, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novère, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M., & Changeux, J.-P. (2003). Subunit Composition of Functional Nicotinic Receptors in Dopaminergic Neurons Investigated with Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, *23*(21), 7820-7829.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07820.2003>

- Changeux, J.-P., & Edelman, S. J. (1998). Allosteric Receptors after 30 Years. *Neuron*, 21(5), 959-980.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80616-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80616-9)
- Chatterjee, S., Santos, N., Holgate, J., Haass-Koffler, C. L., Hopf, F. W., Kharazia, V., Lester, H., Bonci, A., & Bartlett, S. E. (2013). The  $\alpha 5$  Subunit Regulates the Expression and Function of  $\alpha 4^*$ -Containing Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Ventral-Tegmental Area. *PLoS ONE*, 8(7), e68300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068300>
- Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., Ferguson, D., Tsai, H.-C., Pomeranz, L., Christoffel, D. J., Nectow, A. R., Ekstrand, M., Domingos, A., Mazei-Robison, M. S., Mouzon, E., Lobo, M. K., Neve, R. L., Friedman, J. M., Russo, S. J., ... Han, M.-H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, 493(7433), 532-536. <https://doi.org/10.1038/nature11713>
- Chaumont, F. de, Ey, E., Torquet, N., Lagache, T., Dallongeville, S., Imbert, A., Legou, T., Sourd, A.-M. L., Faure, P., Bourgeron, T., & Olivo-Marin, J.-C. (2018). *Live Mouse Tracker : Real-time behavioral analysis of groups of mice* [Preprint]. *Animal Behavior and Cognition*.  
<https://doi.org/10.1101/345132>
- Chen, X., Chen, J., Williamson, V. S., An, S.-S., Hettema, J. M., Aggen, S. H., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2009). Variants in nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 5$  and  $\alpha 3$  increase risks to nicotine dependence. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 150B(7), 926-933. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30919>
- Chi, H., & de Wit, H. (2003). Mecamylamine Attenuates the Subjective Stimulant-Like Effects of Alcohol in Social Drinkers: *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 27(5), 780-786.  
<https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000065435.12068.24>
- Choquet, H., Joslyn, G., Lee, A., Kasberger, J., Robertson, M., Brush, G., Schuckit, M. A., White, R., & Jorgenson, E. (2013). Examination of Rare Missense Variants in the *CHRNA5-A3-B4* Gene Cluster to Level of Response to Alcohol in the San Diego Sibling Pair Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(8), 1311-1316. <https://doi.org/10.1111/acer.12099>

- Ciccarelli, A., Calza, A., Panzanelli, P., Concas, A., Giustetto, M., & Sassoè-Pognetto, M. (2012). Organization of GABAergic Synaptic Circuits in the Rat Ventral Tegmental Area. *PLoS ONE*, 7(10), e46250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046250>
- Ciuraszkiewicz, A., Schreibmayer, W., Platzter, D., Orr-Urtreger, A., Scholze, P., & Huck, S. (2013). Single-channel properties of  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  and  $\alpha 3\beta 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors in mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits. *The Journal of Physiology*, 591(13), 3271-3288. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246595>
- Clark, A., Lindgren, S., Brooks, S. P., Watson, W. P., & Little, H. J. (2001). Chronic infusion of nicotine can increase operant self-administration of alcohol. *Neuropharmacology*, 41(1), 108-117. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00037-5)
- Clarke, P. B. S., & Reuben, M. (1996). Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine : Mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *British Journal of Pharmacology*, 117(4), 595-606. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15232.x>
- Claudio Cuello, A., Emson, P. C., Paxinos, G., & Jessell, T. (1978). Substance P containing and cholinergic projections from the habenula. *Brain Research*, 149(2), 413-429. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90484-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90484-5)
- Cloninger, C. R. (1987). Neurogenetic Adaptive Mechanisms in Alcoholism. *Science*, 236(4800), 410-416. <https://doi.org/10.1126/science.2882604>
- Cloninger, C. R., Sigvardsson, S., & Bohman, M. (1996). Type I and Type II Alcoholism : An Update. *Alcohol Health and Research World*, 20(1), 18-23.
- Conrad, L. C. A., Leonard, C. M., & Pfaff, D. W. (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat : An autoradiographic and degeneration study. *The Journal of Comparative Neurology*, 156(2), 179-205. <https://doi.org/10.1002/cne.901560205>
- Contestabile, A., Villani, L., Fasolo, A., Franzoni, M. F., Gribaudo, L., Øktedalen, O., & Fonnum, F. (1987). Topography of cholinergic and substance P pathways in the habenulo-interpeduncular system of the rat. An immunocytochemical and microchemical approach. *Neuroscience*, 21(1), 253-270. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90337-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90337-X)

- Contestabile, R. A., & Flumerfelt, B. A. (1981). Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway : An HRP study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *196*(2), 253-270.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901960206>
- Cooper, E., Couturier, S., & Ballivet, M. (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*, *350*(6315), 235-238.  
<https://doi.org/10.1038/350235a0>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*, *14*(3), 687-697. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Corbit, L. H., Nie, H., & Janak, P. H. (2012). Habitual Alcohol Seeking : Time Course and the Contribution of Subregions of the Dorsal Striatum. *Biological Psychiatry*, *72*(5), 389-395.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.02.024>
- Corradi, J., & Bouzat, C. (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors : Implications for Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*, *90*(3), 288-299.  
<https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>
- Correa, V. L., Flores, R. J., Carcoba, L. M., Arreguin, M. C., & O'Dell, L. E. (2019). Sex differences in cholinergic systems in the interpeduncular nucleus following nicotine exposure and withdrawal. *Neuropharmacology*, *158*, 107714.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107714>
- Corringer, P.-J., Novère, N. L., & Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *40*(1), 431-458.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.431>
- Corringer, P.-J., Poitevin, F., Prevost, M. S., Sauguet, L., Delarue, M., & Changeux, J.-P. (2012). Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels : From Bacteria to Brain. *Structure*, *20*(6), 941-956. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.003>
- Crabbe, J. C., Harkness, J. H., Spence, S. E., Huang, L. C., & Metten, P. (2012). Intermittent Availability of Ethanol Does Not Always Lead to Elevated Drinking in Mice. *Alcohol and Alcoholism*, *47*(5), 509-517. <https://doi.org/10.1093/alcalc/ags067>

- Crabbe, J. C., Spence, S. E., Brown, L. L., & Metten, P. (2011). Alcohol preference drinking in a mouse line selectively bred for high drinking in the dark. *Alcohol*, 45(5), 427-440.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.12.001>
- Crews, F. T., & Boettiger, C. A. (2009). Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(3), 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.018>
- Dajas-Bailador, F., & Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6), 317-324.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.04.006>
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Levin, N., Walker, C.-D., Bradbury, M. J., Suemaru, S., & Scribner, K. S. (1994). Corticosteroids and the Control of Function in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746(1), 22-31.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb39206.x>
- Damaj, M. I., Kao, W., & Martin, B. R. (2003). Characterization of Spontaneous and Precipitated Nicotine Withdrawal in the Mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 526-534. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054908>
- Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699-729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>
- Dautan, D., Souza, A. S., Huerta-Ocampo, I., Valencia, M., Assous, M., Witten, I. B., Deisseroth, K., Tepper, J. M., Bolam, J. P., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2016). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nature Neuroscience*, 19(8), 1025-1033. <https://doi.org/10.1038/nn.4335>
- David, R., Ciuraszkiewicz, A., Simeone, X., Orr-Urtreger, A., Papke, R. L., McIntosh, J. M., Huck, S., & Scholze, P. (2010). Biochemical and functional properties of distinct nicotinic acetylcholine receptors in the superior cervical ganglion of mice with targeted deletions of nAChR subunit genes. *European Journal of Neuroscience*, 31(6), 978-993. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07133.x>

- Dawson, A., Wolstenholme, J. T., Roni, M. A., Campbell, V. C., Jackson, A., Slater, C., Bagdas, D., Perez, E. E., Bettinger, J. C., De Biasi, M., Miles, M. F., & Damaj, M. I. (2018). Knockout of alpha 5 nicotinic acetylcholine receptors subunit alters ethanol-mediated behavioral effects and reward in mice. *Neuropharmacology*, *138*, 341-348.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.031>
- Dawson, D. A., Goldstein, R. B., Patricia Chou, S., June Ruan, W., & Grant, B. F. (2008). Age at First Drink and the First Incidence of Adult-Onset DSM-IV Alcohol Use Disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *32*(12), 2149-2160. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00806.x>
- De Biasi, M., & Salas, R. (2008). Influence of Neuronal Nicotinic Receptors over Nicotine Addiction and Withdrawal. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(8), 917-929.  
<https://doi.org/10.3181/0712-MR-355>
- de Chaumont, F., Ey, E., Torquet, N., Lagache, T., Dallongeville, S., Imbert, A., Legou, T., Le Sourd, A.-M., Faure, P., Bourgeron, T., & Olivo-Marin, J.-C. (2019). Real-time analysis of the behaviour of groups of mice via a depth-sensing camera and machine learning. *Nature Biomedical Engineering*, *3*(11), 930-942. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0396-1>
- DeGroot, S. R., Zhao-Shea, R., Chung, L., Klenowski, P. M., Sun, F., Molas, S., Gardner, P. D., Li, Y., & Tapper, A. R. (2020). Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *Biological Psychiatry*, *88*(11), 855-866.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.018>
- de Jong, J. W., Afjei, S. A., Pollak Dorocic, I., Peck, J. R., Liu, C., Kim, C. K., Tian, L., Deisseroth, K., & Lammel, S. (2019). A Neural Circuit Mechanism for Encoding Aversive Stimuli in the Mesolimbic Dopamine System. *Neuron*, *101*(1), 133-151.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.005>
- de Kloet, S. F., Mansvelder, H. D., & De Vries, T. J. (2015). Cholinergic modulation of dopamine pathways through nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, *97*(4), 425-438. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.014>

- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., & Piazza, P. V. (2004). Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. *Science*, *305*(5686), 1014-1017. <https://doi.org/10.1126/science.1099020>
- Devine, E. G., Ryan, M. L., Falk, D. E., Fertig, J. B., & Litten, R. Z. (2016). An exploratory evaluation of Take Control : A novel computer-delivered behavioral platform for placebo-controlled pharmacotherapy trials for alcohol use disorder. *Contemporary Clinical Trials*, *50*, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2016.08.006>
- Dhafer, R., McConnell, K. K., Rodd, Z. A., McBride, W. J., & Bell, R. L. (2012). Daily patterns of ethanol drinking in adolescent and adult, male and female, high alcohol drinking (HAD) replicate lines of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *102*(4), 540-548. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.04.017>
- Dickinson, A., Wood, N., & Smith, J. W. (2002). Alcohol Seeking by Rats : Action or Habit? *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, *55*(4b), 331-348. <https://doi.org/10.1080/0272499024400016>
- Didone, V., Masson, S., Quoilin, C., Seutin, V., & Quertemont, E. (2014). Correlation between ethanol behavioral sensitization and midbrain dopamine neuron reactivity to ethanol : Ethanol sensitization. *Addiction Biology*, *21*(2), 387-396. <https://doi.org/10.1111/adb.12216>
- DiFranza, J. R., & Guerrera, M. P. (1990). Alcoholism and smoking. *Journal of Studies on Alcohol*, *51*(2), 130-135. <https://doi.org/10.15288/jsa.1990.51.130>
- Donny, E. C., Caggiula, A. R., Rowell, P. P., Gharib, M. A., Maldovan, V., Booth, S., Mielke, M. M., Hoffman, A., & McCallum, S. (2000). Nicotine self-administration in rats : Estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology*, *151*(4), 392-405. <https://doi.org/10.1007/s002130000497>
- Dyr, W., McBRIDE, W. J., & Lumeng, L. (1993). *Effects of and D 2 Dopamine Receptor Agents on Ethanol Consumption in the High-Alcohol-Drinking (HAD) Line of Rats*. 6.
- Eckart, C., Woźniak-Kwaśniewska, A., Herweg, N. A., Fuentemilla, L., & Bunzeck, N. (2016). Acetylcholine modulates human working memory and subsequent familiarity based recognition via alpha oscillations. *NeuroImage*, *137*, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.05.049>

- Eddie, D., Hunter-Reel, D. A., Epstein, E. E., & Cohn, A. M. (2015). Pathways to Vulnerability for Alcohol Problem Severity in a Treatment-seeking Sample: *Addictive Disorders & Their Treatment*, 14(2), 82-94. <https://doi.org/10.1097/ADT.0000000000000045>
- Edwards, S., & Koob, G. F. (2013). Escalation of drug self-administration as a hallmark of persistent addiction liability. *Behavioural Pharmacology*, 24(5 and 6), 356-362. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283644d15>
- Everitt, B. J., Giuliano, C., & Belin, D. (2018). Addictive behaviour in experimental animals : Prospects for translation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1742), 20170027. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0027>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction : From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481-1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2016). Drug Addiction : Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On. *Annual Review of Psychology*, 67(1), 23-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122414-033457>
- Exley, R., McIntosh, J. M., Marks, M. J., Maskos, U., & Cragg, S. J. (2012). Striatal 5 Nicotinic Receptor Subunit Regulates Dopamine Transmission in Dorsal Striatum. *Journal of Neuroscience*, 32(7), 2352-2356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4985-11.2012>
- Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing : Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behavioural Brain Research*, 348, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.018>
- Falk, D. E. (2006). *An Epidemiologic Analysis of Co-Occurring Alcohol and Tobacco Use and Disorders*. 29(3), 10.
- Falk, D. E., Castle, I.-J. P., Ryan, M., Fertig, J., & Litten, R. Z. (2015). Moderators of Varenicline Treatment Effects in a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial for Alcohol Dependence : An Exploratory Analysis. *Journal of Addiction Medicine*, 9(4), 296-303. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000133>



- Falk, D. E., Ryan, M. L., Fertig, J. B., Devine, E. G., Cruz, R., Brown, E. S., Burns, H., Salloum, I. M., Newport, D. J., Mendelson, J., Galloway, G., Kampman, K., Brooks, C., Green, A. I., Brunette, M. F., Rosenthal, R. N., Dunn, K. E., Strain, E. C., Ray, L., ... the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Clinical Investigations Group (NCIIG) Study Group. (2018). Gabapentin Enacarbil Extended-Release for Alcohol Use Disorder : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multisite Trial Assessing Efficacy and Safety. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *acer.13917*. <https://doi.org/10.1111/acer.13917>
- Fallon, J. H., Schmued, L. C., Wang, C., Miller, R., & Banales, G. (1984). Neurons in the ventral tegmentum have separate populations projecting to telencephalon and inferior olive, are histochemically different, and may receive direct visual input. *Brain Research*, *321*(2), 332-336. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90188-4)
- Farokhnia, M., Deschaine, S. L., Sadighi, A., Farinelli, L. A., Lee, M. R., Akhlaghi, F., & Leggio, L. (2021). A deeper insight into how GABA-B receptor agonism via baclofen may affect alcohol seeking and consumption : Lessons learned from a human laboratory investigation. *Molecular Psychiatry*, *26*(2), 545-555. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0287-y>
- Farook, J. M., Lewis, B., Gaddis, J. G., Littleton, J. M., & Barron, S. (2009). Effects of Mecamylamine on Alcohol Consumption and Preference in Male C57BL/6J Mice. *Pharmacology*, *83*(6), 379-384. <https://doi.org/10.1159/000219488>
- Faure, P., Tolu, S., Valverde, S., & Naudé, J. (2014). Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience*, *282*, 86-100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.040>
- Feduccia, A. A., Chatterjee, S., & Bartlett, S. E. (2012). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors : Neuroplastic changes underlying alcohol and nicotine addictions. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00083>
- Fergusson, D. M., Boden, J. M., Horwood, L. J., Miller, A. L., & Kennedy, M. A. (2011). MAOA , abuse exposure and antisocial behaviour : 30-year longitudinal study. *British Journal of Psychiatry*, *198*(6), 457-463. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.086991>

- Fiorillo, C. D., Tobler, P. N., & Schultz, W. (2003). Discrete Coding of Reward Probability and Uncertainty by Dopamine Neurons. *Science*, *299*(5614), 1898-1902.  
<https://doi.org/10.1126/science.1077349>
- Fischer, H., Orr-Urtreger, A., Role, L. W., & Huck, S. (2005). Selective deletion of the  $\alpha 5$  subunit differentially affects somatic-dendritic *versus* axonally targeted nicotinic ACh receptors in mouse : Nicotinic receptor  $\alpha 5$  subunit in the SCG. *The Journal of Physiology*, *563*(1), 119-137.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.075788>
- Flores-Bonilla, A., De Oliveira, B., Silva-Gotay, A., Lucier, K., & Richardson, H. N. (2021). *SHORTENING TIME FOR ALCOHOL ACCESS DRIVES UP FRONT-LOADING BEHAVIOR, BRINGING CONSUMPTION IN MALE RATS TO THE LEVEL OF FEMALES* [Preprint]. Neuroscience.  
<https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446588>
- Floresco, S. B., West, A. R., Ash, B., Moore, H., & Grace, A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, *6*(9), 968-973. <https://doi.org/10.1038/nn1103>
- Forget, B., Scholze, P., Langa, F., Morel, C., Pons, S., Mondoloni, S., Besson, M., Durand-de Cuttoli, R., Hay, A., Tricoire, L., Lambolez, B., Mourot, A., Faure, P., & Maskos, U. (2018). A Human Polymorphism in CHRNA5 Is Linked to Relapse to Nicotine Seeking in Transgenic Rats. *Current Biology*, *28*(20), 3244-3253.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.044>
- Forman, S. A., & Zhou, Q. (1999). Novel Modulation of a Nicotinic Receptor Channel Mutant Reveals that the Open State Is Stabilized by Ethanol. *Molecular Pharmacology*, *55*(1), 102-108.  
<https://doi.org/10.1124/mol.55.1.102>
- Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion : Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*, *76*, 533-544.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.008>
- Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J., & Kenny, P. J. (2011). Habenular  $\alpha 5$  nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*, *471*(7340), 597-601.  
<https://doi.org/10.1038/nature09797>

- Frahm, S., Antolin-Fontes, B., Görlich, A., Zander, J.-F., Ahnert-Hilger, G., & Ibañez-Tallon, I. (2015). An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. *ELife*, *4*, e11396. <https://doi.org/10.7554/eLife.11396>
- Frahm, S., Ślimak, M. A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.-F., Tsetlin, V., Maskos, U., & Ibañez-Tallon, I. (2011). Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of  $\beta 4$  and  $\alpha 5$  Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. *Neuron*, *70*(3), 522-535. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.013>
- Fritz, B. M., & Boehm, S. L. (2016). Rodent models and mechanisms of voluntary binge-like ethanol consumption : Examples, opportunities, and strategies for preclinical research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *65*, 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.05.012>
- Fucile, S., Barabino, B., Palma, E., Grassi, F., Limatola, C., Mileo, A. M., Alemà, S., Ballivet, M., & Eusebi, F. (1997). A5 Subunit forms functional  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  nAChRs in transfected human cells: *NeuroReport*, *8*(11), 2433-2436. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707280-00005>
- Galeeva, A., & Tuohimaa, P. (2001). Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. *Behavioural Brain Research*, *119*(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00341-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00341-7)
- Gallego, X., Ruiz-Medina, J., Valverde, O., Molas, S., Robles, N., Sabrià, J., Crabbe, J. C., & Dierssen, M. (2012). Transgenic over expression of nicotinic receptor alpha 5, alpha 3, and beta 4 subunit genes reduces ethanol intake in mice. *Alcohol*, *46*(3), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.11.005>
- Gangitano, D., Salas, R., Teng, Y., Perez, E., & De Biasi, M. (2009). Progesterone modulation of  $\alpha 5$  nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. *Genes, Brain and Behavior*, *8*(4), 398-406. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00476.x>
- Gao, F., Chen, D., Ma, X., Sudweeks, S., Yorgason, J. T., Gao, M., Turner, D., Eaton, J. B., McIntosh, J. M., Lukas, R. J., Whiteaker, P., Chang, Y., Steffensen, S. C., & Wu, J. (2019). Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptor is a highly sensitive target of alcohol. *Neuropharmacology*, *149*, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.021>

- Geisler, S., & Zahm, D. S. (2005). Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *Journal of Comparative Neurology*, *490*(3), 270-294. <https://doi.org/10.1002/cne.20668>
- George, A. A., Lucero, L. M., Damaj, M. I., Lukas, R. J., Chen, X., & Whiteaker, P. (2012). Function of Human  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptors Is Reduced by the  $\alpha 5$ (D398N) Variant. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(30), 25151-25162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.379339>
- Gerzanich, V., Wang, F., Kuryatov, A., & Lindstrom, J. (1998).  $\alpha 5$  Subunit Alters Desensitization, Pharmacology, Catecholamine Permeability and Catecholamine Modulation of Human Neuronal  $\alpha 3$  Nicotinic Receptors. *286*, 10.
- Gierski, F., Benzerouk, F., Wever, E. D., Duka, T., Kaladjian, A., Quaglino, V., & Naassila, M. (2017). Clonidine's Temperament and Character Dimensions of Personality and Binge Drinking Among College Students. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *41*(11), 1970-1979. <https://doi.org/10.1111/acer.13497>
- Gilman, J. M., Ramchandani, V. A., Davis, M. B., Bjork, J. M., & Hommer, D. W. (2008). Why We Like to Drink : A Functional Magnetic Resonance Imaging Study of the Rewarding and Anxiolytic Effects of Alcohol. *Journal of Neuroscience*, *28*(18), 4583-4591. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0086-08.2008>
- Giuliano, C., Peña-Oliver, Y., Goodlett, C. R., Cardinal, R. N., Robbins, T. W., Bullmore, E. T., Belin, D., & Everitt, B. J. (2018). Evidence for a Long-Lasting Compulsive Alcohol Seeking Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology*, *43*(4), 728-738. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.105>
- Gorlich, A., Antolin-Fontes, B., Ables, J. L., Frahm, S., Slimak, M. A., Dougherty, J. D., & Ibanez-Tallon, I. (2013). Reexposure to nicotine during withdrawal increases the pacemaking activity of cholinergic habenular neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(42), 17077-17082. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313103110>
- Gottesfeld, Z. (1983). Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula : A neurochemical study. *Brain Research*, *275*(2), 299-304. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90990-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90990-3)

- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., & Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology*, *78*(7), 703-711.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.024>
- Gotti, C., Moretti, M., Gaimarri, A., Zanardi, A., Clementi, F., & Zoli, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology*, *74*(8), 1102-1111.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.023>
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors : Native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, *27*(9), 482-491.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.07.004>
- Grady, S., Marks, M. J., Wonnacott, S., & Collins, A. C. (1992). Characterization of Nicotinic Receptor-Mediated [<sup>3</sup>H]Dopamine Release from Synaptosomes Prepared from Mouse Striatum. *Journal of Neurochemistry*, *59*(3), 848-856. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08322.x>
- Grady, S. R., Moretti, M., Zoli, M., Marks, M. J., Zanardi, A., Pucci, L., Clementi, F., & Gotti, C. (2009). Rodent Habenulo-Interpeduncular Pathway Expresses a Large Variety of Uncommon nAChR Subtypes, But Only the  $\alpha 4$  and  $\alpha 3 \beta 4$  Subtypes Mediate Acetylcholine Release. *Journal of Neuroscience*, *29*(7), 2272-2282. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5121-08.2009>
- Grady, S. R., Wageman, C. R., Patzlaff, N. E., & Marks, M. J. (2012). Low concentrations of nicotine differentially desensitize nicotinic acetylcholine receptors that include  $\alpha 5$  or  $\alpha 6$  subunits and that mediate synaptosomal neurotransmitter release. *Neuropharmacology*, *62*(5-6), 1935-1943. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.026>
- Grant, B. F. (1998). Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence : Results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *Journal of Substance Abuse*, *10*(1), 59-73. [https://doi.org/10.1016/S0899-3289\(99\)80141-2](https://doi.org/10.1016/S0899-3289(99)80141-2)

- Green, A. S., & Grahame, N. J. (2008). Ethanol drinking in rodents : Is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*, *42*(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.10.005>
- Grieder, T. E., Besson, M., Maal-Bared, G., Pons, S., Maskos, U., & van der Kooy, D. (2019). B2\* nAChRs on VTA dopamine and GABA neurons separately mediate nicotine aversion and reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(51), 25968-25973.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1908724116>
- Grieder, T. E., George, O., Yee, M., Bergamini, M. A., Chwalek, M., Maal-Bared, G., Vargas-Perez, H., & van der Kooy, D. (2017). Deletion of  $\alpha 5$  nicotine receptor subunits abolishes nicotinic aversive motivational effects in a manner that phenocopies dopamine receptor antagonism. *European Journal of Neuroscience*, *46*(1), 1673-1681. <https://doi.org/10.1111/ejn.13605>
- Gritton, H. J., Howe, W. M., Mallory, C. S., Hetrick, V. L., Berke, J. D., & Sarter, M. (2016). Cortical cholinergic signaling controls the detection of cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(8), E1089-E1097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516134113>
- Groenewegen, H. J., Ahlenius, S., Haber, S. N., Kowall, N. W., & Nauta, W. J. H. (1986). Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *249*(1), 65-102.  
<https://doi.org/10.1002/cne.902490107>
- Groot-Kormelink, P. J., Boorman, J. P., & Sivilotti, L. G. (s. d.). *Formation of functional  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  human neuronal nicotinic receptors in Xenopus oocytes : A reporter mutation approach*. *134*, 8.
- Guerrini, I., Quadri, G., & Thomson, A. D. (2014). Genetic and Environmental Interplay in Risky Drinking in Adolescents : A Literature Review. *Alcohol and Alcoholism*, *49*(2), 138-142.  
<https://doi.org/10.1093/alcalc/agu003>
- Guglielmotti, V., & Cristino, L. (2006). The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry. *Brain Research Bulletin*, *69*(5), 475-488. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.010>
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., &

- Deisseroth, K. (2014). Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell*, 157(7), 1535-1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>
- Gustafson, D. H., McTavish, F. M., Chih, M.-Y., Atwood, A. K., Johnson, R. A., Boyle, M. G., Levy, M. S., Driscoll, H., Chisholm, S. M., Dillenburg, L., Isham, A., & Shah, D. (2014). A Smartphone Application to Support Recovery From Alcoholism : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 71(5), 566. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.4642>
- Halladay, L. R., Kocharian, A., & Holmes, A. (2017). Mouse strain differences in punished ethanol self-administration. *Alcohol*, 58, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.05.008>
- Halladay, L. R., Kocharian, A., Piantadosi, P. T., Authement, M. E., Lieberman, A. G., Spitz, N. A., Coden, K., Glover, L. R., Costa, V. D., Alvarez, V. A., & Holmes, A. (2020). Prefrontal Regulation of Punished Ethanol Self-administration. *Biological Psychiatry*, 87(11), 967-978. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.10.030>
- Hällfors, J., Loukola, A., Pitkäniemi, J., Broms, U., Männistö, S., Salomaa, V., Lehtimäki, T., Raitakari, O., Madden, P. A., Heath, A. C., Martin, N. G., Korhonen, T., & Kaprio, J. (2013). *Scrutiny of the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 smoking behavior locus reveals a novel association with alcohol use in a Finnish population based study*. 4(2), 11.
- Hamill, G. S., & Jacobowitz, D. M. (1984). A study of afferent projections to the rat interpeduncular nucleus. *Brain Research Bulletin*, 13(4), 527-539. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90035-2)
- Hamill, G. S., & Lenn, N. J. (1984). The subnuclear organization of the rat interpeduncular nucleus : A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 222(3), 396-408. <https://doi.org/10.1002/cne.902220307>
- Hamilton, K. R., Felton, J. W., Risco, C. M., Lejuez, C. W., & MacPherson, L. (2014). Brief report : The interaction of impulsivity with risk-taking is associated with early alcohol use initiation. *Journal of Adolescence*, 37(8), 1253-1256. <https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2014.08.013>
- Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., Compton, W. M., Crowley, T., Ling, W., Petry, N. M., Schuckit, M., & Grant, B. F. (2013). DSM-5 Criteria for

- Substance Use Disorders : Recommendations and Rationale. *American Journal of Psychiatry*, 170(8), 834-851. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.12060782>
- Hauser, S. R., Knight, C. P., Truitt, W. A., Waeiss, R. A., Holt, I. S., Carvajal, G. B., Bell, R. L., & Rodd, Z. A. (2019). Adolescent Intermittent Ethanol Increases the Sensitivity to the Reinforcing Properties of Ethanol and the Expression of Select Cholinergic and Dopaminergic Genes within the Posterior Ventral Tegmental Area. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(9), 1937-1948. <https://doi.org/10.1111/acer.14150>
- Hayakawa, T., Seki, M., & Zyo, K. (1981). Studies on the Efferent Projections of the Interpeduncular Complex in Cats. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 58(1), 1-15. [https://doi.org/10.2535/ofaj1936.58.1\\_1](https://doi.org/10.2535/ofaj1936.58.1_1)
- Heilig, M., MacKillop, J., Martinez, D., Rehm, J., Leggio, L., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2021). Addiction as a brain disease revised : Why it still matters, and the need for consilience. *Neuropsychopharmacology*, 46(10), 1715-1723. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00950-y>
- Henderson, B. J., & Lester, H. A. (2015). Inside-out neuropharmacology of nicotinic drugs. *Neuropharmacology*, 96, 178-193. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.022>
- Hendrickson, L. M., Guildford, M. J., & Tapper, A. R. (2013). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors : Common Molecular Substrates of Nicotine and Alcohol Dependence. *Frontiers in Psychiatry*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00029>
- Hendrickson, L. M., Zhao-Shea, R., & Tapper, A. R. (2009). Modulation of ethanol drinking-in-the-dark by mecamylamine and nicotinic acetylcholine receptor agonists in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*, 204(4), 563-572. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1488-5>
- Hennessy, E. A., Tanner-Smith, E. E., Mavridis, D., & Grant, S. P. (2019). Comparative Effectiveness of Brief Alcohol Interventions for College Students : Results from a Network Meta-Analysis. *Prevention Science*, 20(5), 715-740. <https://doi.org/10.1007/s11121-018-0960-z>
- Herkenham, M., & Nauta, W. J. H. (1977). Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *The Journal of Comparative Neurology*, 173(1), 123-145. <https://doi.org/10.1002/cne.901730107>



- Herkenham, M., & Nauta, W. J. H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 187(1), 19-47. <https://doi.org/10.1002/cne.901870103>
- Herman, A. M., & Duka, T. (2019). Facets of impulsivity and alcohol use : What role do emotions play? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 106, 202-216. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.08.011>
- Hirth, N., Meinhardt, M. W., Noori, H. R., Salgado, H., Torres-Ramirez, O., Uhrig, S., Broccoli, L., Vengeliene, V., Roßmanith, M., Perreau-Lenz, S., Köhr, G., Sommer, W. H., Spanagel, R., & Hansson, A. C. (2016). Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 3024-3029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506012113>
- Ho, J. W., Poeta, D. L., Jacobson, T. K., Zolnik, T. A., Neske, G. T., Connors, B. W., & Burwell, R. D. (2015). Bidirectional Modulation of Recognition Memory. *Journal of Neuroscience*, 35(39), 13323-13335. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2278-15.2015>
- Hogarth, L. (2020). Addiction is driven by excessive goal-directed drug choice under negative affect : Translational critique of habit and compulsion theory. *Neuropsychopharmacology*, 45(5), 720-735. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0600-8>
- Hogarth, L., & Hardy, L. (2018). Depressive statements prime goal-directed alcohol-seeking in individuals who report drinking to cope with negative affect. *Psychopharmacology*, 235(1), 269-279. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4765-8>
- Holgate, J. Y., Shariff, M., Mu, E. W. H., & Bartlett, S. (2017). A Rat Drinking in the Dark Model for Studying Ethanol and Sucrose Consumption. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00029>
- Hollerman, J. R., & Schultz, W. (1998). Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neuroscience*, 1(4), 304-309. <https://doi.org/10.1038/1124>
- Holly, E. N., & Miczek, K. A. (2016). Ventral tegmental area dopamine revisited : Effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology*, 233(2), 163-186. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4151-3>

- Hone, A. J., McIntosh, J. M., Azam, L., Lindstrom, J., Lucero, L., Whiteaker, P., Passas, J., Blázquez, J., & Albillos, A. (2015).  $\alpha$ -Conotoxins Identify the  $\alpha 3 \beta 4^*$  Subtype as the Predominant Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in Human Adrenal Chromaffin Cells. *Molecular Pharmacology*, *88*(5), 881-893. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100982>
- Hong, L. E., Hodgkinson, C. A., Yang, Y., Sampath, H., Ross, T. J., Buchholz, B., Salmeron, B. J., Srivastava, V., Thaker, G. K., Goldman, D., & Stein, E. A. (2010). A genetically modulated, intrinsic cingulate circuit supports human nicotine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(30), 13509-13514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004745107>
- Hopf, F. W., Chang, S.-J., Sparta, D. R., Bowers, M. S., & Bonci, A. (2010). Motivation for Alcohol Becomes Resistant to Quinine Adulteration After 3 to 4 Months of Intermittent Alcohol Self-Administration : MOTIVATION FOR ALCOHOL BECOMES RESISTANT TO QUININE ADULTERATION. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *34*(9), 1565-1573. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01241.x>
- Hopf, F. W., & Lesscher, H. M. B. (2014). Rodent models for compulsive alcohol intake. *Alcohol*, *48*(3), 253-264. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.001>
- Howe, W. M., Brooks, J. L., Tierney, P. L., Pang, J., Rossi, A., Young, D., Dlugolenski, K., Guillmette, E., Roy, M., Hales, K., & Kozak, R. (2018). A5 nAChR modulation of the prefrontal cortex makes attention resilient. *Brain Structure and Function*, *223*(2), 1035-1047. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1601-1>
- Hsu, Y.-W. A., Tempest, L., Quina, L. A., Wei, A. D., Zeng, H., & Turner, E. E. (2013). Medial Habenula Output Circuit Mediated by 5 Nicotinic Receptor-Expressing GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus. *Journal of Neuroscience*, *33*(46), 18022-18035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2927-13.2013>
- Hsu, Y.-W. A., Wang, S. D., Wang, S., Morton, G., Zariwala, H. A., de la Iglesia, H. O., & Turner, E. E. (2014). Role of the Dorsal Medial Habenula in the Regulation of Voluntary Activity, Motor Function, Hedonic State, and Primary Reinforcement. *Journal of Neuroscience*, *34*(34), 11366-11384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1861-14.2014>

- Huang, A. S., Mitchell, J. A., Haber, S. N., Alia-Klein, N., & Goldstein, R. Z. (2018). The thalamus in drug addiction : From rodents to humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1742), 20170028. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0028>
- Hubbell, C. L., Marglin, S. H., Spitalnic, S. J., Abelson, M. L., Wild, K. D., & Reid, L. D. (1991). Opioidergic, serotonergic, and dopaminergic manipulations and rats' intake of a sweetened alcoholic beverage. *Alcohol*, 8(5), 355-367. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(91\)90573-F](https://doi.org/10.1016/0741-8329(91)90573-F)
- Husson, M., Harrington, L., Tochon, L., Cho, Y., Ibañez-Tallon, I., Maskos, U., & David, V. (2020). B4-nicotinic receptors are critically involved in reward-related behaviors and self-regulation of nicotine reinforcement. *The Journal of Neuroscience*, JN-RM-0356-19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0356-19.2020>
- Huynh, N., Arabian, N. M., Asatryan, L., & Davies, D. L. (2019). Murine Drinking Models in the Development of Pharmacotherapies for Alcoholism : Drinking in the Dark and Two-bottle Choice. *Journal of Visualized Experiments*, 143, 57027. <https://doi.org/10.3791/57027>
- Hwa, L. S., Chu, A., Levinson, S. A., Kayyali, T. M., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2011). Persistent Escalation of Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice With Intermittent Access to 20% Ethanol : ESCALATED ALCOHOL AFTER INTERMITTENT ACCESS. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(11), 1938-1947. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01545.x>
- Hwang, B. H., Suzuki, R., & Lumeng, L. (2004). *Innate differences in neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in discrete brain regions between alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats : A significantly low level of NPY mRNA in dentate gyrus of the hippocampus and absence of NPY mRNA in the medial habenular nucleus of P rats q. 10.*
- Ikemoto, S. (2006). Primary Reinforcing Effects of Nicotine Are Triggered from Multiple Regions Both Inside and Outside the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience*, 26(3), 723-730. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4542-05.2006>
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry : Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 27-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.004>

- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system : A neurobiological theory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(2), 129-150.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.001>
- Iman, I. N., Yusof, N. A. M., Talib, U. N., Ahmad, N. A. Z., Norazit, A., Kumar, J., Mehat, M. Z., Jayabalan, N., Muthuraju, S., Stefaniuk, M., Kaczmarek, L., & Muzaimi, M. (2021). The IntelliCage System : A Review of Its Utility as a Novel Behavioral Platform for a Rodent Model of Substance Use Disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 683780.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.683780>
- Imel, Z. E., Wampold, B. E., Miller, S. D., & Fleming, R. R. (2008). Distinctions without a difference : Direct comparisons of psychotherapies for alcohol use disorders. *Psychology of Addictive Behaviors*, 22(4), 533-543. <https://doi.org/10.1037/a0013171>
- Ipsier, J. C., Wilson, D., Akindipe, T. O., Sager, C., & Stein, D. J. (2015). Pharmacotherapy for anxiety and comorbid alcohol use disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007505.pub2>
- Jackson, K. J., Marks, M. J., Vann, R. E., Chen, X., Gamage, T. F., Warner, J. A., & Damaj, M. I. (2010). Role of  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in Pharmacological and Behavioral Effects of Nicotine in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334(1), 137-146.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.110.165738>
- Jeanblanc, J., Rolland, B., Gierski, F., Martinetti, M. P., & Naassila, M. (2019). Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 106, 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.002>
- Jeanblanc, J., Sauton, P., Jeanblanc, V., Legastelois, R., Echeverry-Alzate, V., Lebourgeois, S., Gonzalez-Marin, M. del C., & Naassila, M. (2019). Face validity of a pre-clinical model of operant binge drinking : Just a question of speed. *Addiction Biology*, 24(4), 664-675.  
<https://doi.org/10.1111/adb.12631>
- Jensen, B. E., Townsley, K. G., Grigsby, K. B., Metten, P., Chand, M., Uzoekwe, M., Tran, A., Firsick, E., LeBlanc, K., Crabbe, J. C., & Ozburn, A. R. (2021). Ethanol-Related Behaviors in Mouse Lines

- Selectively Bred for Drinking to Intoxication. *Brain Sciences*, 11(2), 189.  
<https://doi.org/10.3390/brainsci11020189>
- Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., & Holland, P. C. (2009). The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron*, 61(5), 786-800.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.001>
- Jin, X., Bermudez, I., & Steinbach, J. H. (2014). The Nicotinic  $\alpha 5$  Subunit Can Replace Either an Acetylcholine-Binding or Nonbinding Subunit in the  $\alpha 4 \beta 2^*$  Neuronal Nicotinic Receptor. *Molecular Pharmacology*, 85(1), 11-17. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089979>
- Jin, Z., Khan, P., Shin, Y., Wang, J., Lin, L., Cameron, M. D., Lindstrom, J. M., Kenny, P. J., & Kamenecka, T. M. (2014). Synthesis and activity of substituted heteroaromatics as positive allosteric modulators for  $\alpha 4 \beta 2 \alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(2), 674-678. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.049>
- Johnson, B. A. (2007). Topiramate for Treating Alcohol Dependence A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 298(14), 1641. <https://doi.org/10.1001/jama.298.14.1641>
- Jokisch, D., Roser, P., Juckel, G., Daum, I., & Bellebaum, C. (2014). Impairments in Learning by Monetary Rewards and Alcohol-Associated Rewards in Detoxified Alcoholic Patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(7), 1947-1954.  
<https://doi.org/10.1111/acer.12460>
- Joslyn, G., Brush, G., Robertson, M., Smith, T. L., Kalmijn, J., Schuckit, M., & White, R. L. (2008). Chromosome 15q25.1 genetic markers associated with level of response to alcohol in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20368-20373.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810970105>
- Juarez, B., Morel, C., Ku, S. M., Liu, Y., Zhang, H., Montgomery, S., Gregoire, H., Ribeiro, E., Crumiller, M., Roman-Ortiz, C., Walsh, J. J., Jackson, K., Croote, D. E., Zhu, Y., Zhang, S., Vendruscolo, L. F., Edwards, S., Roberts, A., Hodes, G. E., ... Han, M.-H. (2017). Midbrain circuit regulation of individual alcohol drinking behaviors in mice. *Nature Communications*, 8(1), 2220.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02365-8>

- June, H. L., & Gilpin, N. W. (2010). Operant Self-Administration Models for Testing the Neuropharmacological Basis of Ethanol Consumption in Rats. *Current Protocols in Neuroscience*, 51(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0912s51>
- Jupp, B., & Dalley, J. W. (2014). Convergent pharmacological mechanisms in impulsivity and addiction : Insights from rodent models: Pharmacology of impulsivity and addiction. *British Journal of Pharmacology*, 171(20), 4729-4766. <https://doi.org/10.1111/bph.12787>
- Kabbani, N., Nordman, J. C., Corgiat, B. A., Veltri, D. P., Shehu, A., Seymour, V. A., & Adams, D. J. (2013). Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? : Insights & Perspectives. *BioEssays*, 35(12), 1025-1034. <https://doi.org/10.1002/bies.201300082>
- Katner, S. (1999). Reinstatement of Alcohol-Seeking Behavior by Drug-Associated Discriminative Stimuli after Prolonged Extinction in the Rat. *Neuropsychopharmacology*, 20(5), 471-479. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00084-0)
- Kazemi, D. M., Borsari, B., Levine, M. J., Li, S., Lamberson, K. A., & Matta, L. A. (2017). A Systematic Review of the mHealth Interventions to Prevent Alcohol and Substance Abuse. *Journal of Health Communication*, 22(5), 413-432. <https://doi.org/10.1080/10810730.2017.1303556>
- Keistler, C. R., Hammarlund, E., Barker, J. M., Bond, C. W., DiLeone, R. J., Pittenger, C., & Taylor, J. R. (2017). Regulation of Alcohol Extinction and Cue-Induced Reinstatement by Specific Projections among Medial Prefrontal Cortex, Nucleus Accumbens, and Basolateral Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 37(17), 4462-4471. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3383-16.2017>
- Kelly, J. F., Bergman, B., Hoepfner, B. B., Vilsaint, C., & White, W. L. (2017). Prevalence and pathways of recovery from drug and alcohol problems in the United States population : Implications for practice, research, and policy. *Drug and Alcohol Dependence*, 181, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.09.028>
- Kemali, M., & Guglielmotti, V. (1982). The connections of the frog interpeduncular nucleus (ITP) demonstrated by horseradish peroxidase (HRP). *Experimental Brain Research*, 45(3), 349-356. <https://doi.org/10.1007/BF01208594>

- Kendler, K. S. (1995). The Structure of the Genetic and Environmental Risk Factors for Six Major Psychiatric Disorders in Women : Phobia, Generalized Anxiety Disorder, Panic Disorder, Bulimia, Major Depression, and Alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, 52(5), 374. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950170048007>
- Kendler, K. S., Myers, J., Dick, D., & Prescott, C. A. (2010). The Relationship Between Genetic Influences on Alcohol Dependence and on Patterns of Alcohol Consumption : GENETIC INFLUENCES ON ALCOHOL DEPENDENCE AND ALCOHOL CONSUMPTION. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(6), 1058-1065. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01181.x>
- Kenna, G., Lomastro, T., Schiesl, A., Leggio, L., & Swift, R. (2009). Review of Topiramate : An Antiepileptic for the Treatment of Alcohol Dependence. *Current Drug Abuse Reviewse*, 2(2), 135-142. <https://doi.org/10.2174/1874473710902020135>
- Khaderi, S. A. (2019). Introduction\_Alcohol and Alcoholism. *Clinics in Liver Disease*, 23(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.09.009>
- Khantzian, E. J. (2013). Addiction as a self-regulation disorder and the role of self-medication : Commentaries. *Addiction*, 108(4), 668-669. <https://doi.org/10.1111/add.12004>
- Kiluk, B. D., Devore, K. A., Buck, M. B., Nich, C., Frankforter, T. L., LaPaglia, D. M., Yates, B. T., Gordon, M. A., & Carroll, K. M. (2016). Randomized Trial of Computerized Cognitive Behavioral Therapy for Alcohol Use Disorders : Efficacy as a Virtual Stand-Alone and Treatment Add-On Compared with Standard Outpatient Treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(9), 1991-2000. <https://doi.org/10.1111/acer.13162>
- Kim, U., & Chang, S.-Y. (2005). Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 483(2), 236-250. <https://doi.org/10.1002/cne.20410>
- Kimbrough, A., Kim, S., Cole, M., Brennan, M., & George, O. (2017). Intermittent Access to Ethanol Drinking Facilitates the Transition to Excessive Drinking After Chronic Intermittent Ethanol Vapor Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(8), 1502-1509. <https://doi.org/10.1111/acer.13434>

- Kimbrough, A., Lurie, D. J., Collazo, A., Kreifeldt, M., Sidhu, H., Macedo, G. C., D'Esposito, M., Contet, C., & George, O. (2020). Brain-wide functional architecture remodeling by alcohol dependence and abstinence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(4), 2149-2159. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909915117>
- King, J. R., Nordman, J. C., Bridges, S. P., Lin, M.-K., & Kabbani, N. (2015). Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(33), 20060-20070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647040>
- Klink, R., d'Exaerde, A. de K., Zoli, M., & Changeux, J.-P. (2001). Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei. *The Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1452-1463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01452.2001>
- Knorrung, A.-L., Bohman, M., Knorrung, L., & Orelund, L. (1985). Platelet MAO activity as a biological marker in subgroups of alcoholism. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *72*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1985.tb02570.x>
- Kobayashi, Y., Sano, Y., Vannoni, E., Goto, H., Suzuki, H., Oba, A., Kawasaki, H., Kanba, S., Lipp, H.-P., Murphy, N. P., Wolfer, D. P., & Itohara, S. (2013). Genetic dissection of medial habenula–interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00017>
- Koob, G. (2001a). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, *24*(2), 97-129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0)
- Koob, G. (2001b). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, *24*(2), 97-129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0)
- Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse : Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, *13*, 177-184. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90060-J](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90060-J)
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. *Science*, *242*(4879), 715-723. <https://doi.org/10.1126/science.2903550>



- Koob, G. F., Sanna, P. P., & Bloom, F. E. (1998). Neuroscience of Addiction. *Neuron*, 21(3), 467-476.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80557-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80557-7)
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Erratum : Neurocircuitry of Addiction.  
*Neuropsychopharmacology*, 35(4), 1051-1051. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.4>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction : A neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Koppensteiner, P., Melani, R., & Ninan, I. (2017). A Cooperative Mechanism Involving Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors and Retrograde Activation of GABAB Receptors in Interpeduncular Nucleus Plasticity. *Cell Reports*, 20(5), 1111-1122.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.013>
- Koukouli, F., Rooy, M., Tziotis, D., Sailor, K. A., O'Neill, H. C., Levenga, J., Witte, M., Nilges, M., Changeux, J.-P., Hoeffler, C. A., Stitzel, J. A., Gutkin, B. S., DiGregorio, D. A., & Maskos, U. (2017). Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nature Medicine*, 23(3), 347-354. <https://doi.org/10.1038/nm.4274>
- Kranzler, H. R., Armeli, S., Feinn, R., & Tennen, H. (2004). Targeted Naltrexone Treatment Moderates the Relations Between Mood and Drinking Behavior Among Problem Drinkers. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 72(2), 317-327. <https://doi.org/10.1037/0022-006X.72.2.317>
- Kranzler, H. R., Wetherill, R., Feinn, R., Pond, T., Gelernter, J., & Covault, J. (2014). Posttreatment Effects of Topiramate Treatment for Heavy Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(12), 3017-3023. <https://doi.org/10.1111/acer.12578>
- Krebs, R. M., Heipertz, D., Schuetze, H., & Duzel, E. (2011). Novelty increases the mesolimbic functional connectivity of the substantia nigra/ventral tegmental area (SN/VTA) during reward anticipation : Evidence from high-resolution fMRI. *NeuroImage*, 58(2), 647-655.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.038>
- Kreek, M. J., Nielsen, D. A., Butelman, E. R., & LaForge, K. S. (2005). Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1450-1457. <https://doi.org/10.1038/nn1583>

- Krishnamoorthy, M., Gerwe, B. A., Scharer, C. D., Heimbürg-Molinaro, J., Gregory, F., Nash, R. J., Arumugham, J., Stewart, B., Stice, S. L., & Nash, R. J. (2010). Low ethanol concentration alters CHRNA5 RNA levels during early human development. *Reproductive Toxicology*, *30*(3), 489-492. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.04.011>
- Kuntsche, E., & Müller, S. (2012). Why Do Young People Start Drinking Motives for First-Time Alcohol Consumption and Links to Risky Drinking in Early Adolescence. *European Addiction Research*, *18*(1), 34-39. <https://doi.org/10.1159/000333036>
- Kuryatov, A., Berrettini, W., & Lindstrom, J. (2011). Acetylcholine Receptor (AChR)  $\alpha 5$  Subunit Variant Associated with Risk for Nicotine Dependence and Lung Cancer Reduces ( $\alpha 4\beta 2$ )<sub>2</sub>  $\alpha 5$  AChR Function. *Molecular Pharmacology*, *79*(1), 119-125. <https://doi.org/10.1124/mol.110.066357>
- Kuryatov, A., Onksen, J., & Lindstrom, J. (2008). Roles of Accessory Subunits in  $\alpha 4\beta 2$  \* Nicotinic Receptors. *Molecular Pharmacology*, *74*(1), 132-143. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046789>
- Lammel, S., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, *76*, 351-359. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.019>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, *491*(7423), 212-217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Larsson, A., Svensson, L., Söderpalm, B., & Engel, J. A. (2002). Role of different nicotinic acetylcholine receptors in mediating behavioral and neurochemical effects of ethanol in mice. *Alcohol*, *28*(3), 157-167. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00244-6](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00244-6)
- Lê, A. D., Quan, B., Juzytch, W., Fletcher, P. J., Joharchi, N., & Shaham, Y. (1998). Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology*, *135*(2), 169-174. <https://doi.org/10.1007/s002130050498>
- Le Novere, N., & Changeux, J.-P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor : An example of multigene family in excitable cells. *Journal of Molecular Evolution*, *40*(2), 155-172. <https://doi.org/10.1007/BF00167110>

- Leão, R. M., Cruz, F. C., Vendruscolo, L. F., de Guglielmo, G., Logrip, M. L., Planeta, C. S., Hope, B. T., Koob, G. F., & George, O. (2015). Chronic Nicotine Activates Stress/Reward-Related Brain Regions and Facilitates the Transition to Compulsive Alcohol Drinking. *The Journal of Neuroscience*, *35*(15), 6241-6253. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3302-14.2015>
- Lecourtier, L., & Kelly, P. H. (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *31*(5), 658-672. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.004>
- Lee, H. W., Yang, S. H., Kim, J. Y., & Kim, H. (2019). The Role of the Medial Habenula Cholinergic System in Addiction and Emotion-Associated Behaviors. *Frontiers in Psychiatry*, *10*, 100. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00100>
- Leggio, L., Garbutt, J., & Addolorato, G. (2010). Effectiveness and Safety of Baclofen in the Treatment of Alcohol Dependent Patients. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *9*(1), 33-44. <https://doi.org/10.2174/187152710790966614>
- Leggio, L., Kenna, G. A., Fenton, M., Bonenfant, E., & Swift, R. M. (2009). Typologies of Alcohol Dependence. From Jellinek to Genetics and Beyond. *Neuropsychology Review*, *19*(1), 115-129. <https://doi.org/10.1007/s11065-008-9080-z>
- Li, P., Wu, P., Xin, X., Fan, Y.-L., Wang, G.-B., Wang, F., Ma, M.-Y., Xue, M.-M., Luo, Y.-X., Yang, F.-D., Bao, Y.-P., Shi, J., Sun, H.-Q., & Lu, L. (2015). Incubation of alcohol craving during abstinence in patients with alcohol dependence : Incubation in alcoholics. *Addiction Biology*, *20*(3), 513-522. <https://doi.org/10.1111/adb.12140>
- Li, T.-K., Volkow, N. D., Baler, R. D., & Egli, M. (2007). The Biological Bases of Nicotine and Alcohol Co-Addiction. *Biological Psychiatry*, *61*(1), 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.11.004>
- Lima, L. B., Bueno, D., Leite, F., Souza, S., Gonçalves, L., Furigo, I. C., Donato, J., & Metzger, M. (2017). Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, *525*(10), 2411-2442. <https://doi.org/10.1002/cne.24217>

- Litten, R. Z., Falk, D. E., Ryan, M. L., Fertig, J., & Leggio, L. (2017). Advances in Pharmacotherapy Development : Human Clinical Studies. *The Neuropharmacology of Alcohol*, 579-613.  
[https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_79](https://doi.org/10.1007/164_2017_79)
- Litten, R. Z., Ryan, M. L., Falk, D. E., Reilly, M., Fertig, J. B., & Koob, G. F. (2015a). Heterogeneity of Alcohol Use Disorder : Understanding Mechanisms to Advance Personalized Treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(4), 579-584.  
<https://doi.org/10.1111/acer.12669>
- Litten, R. Z., Ryan, M. L., Falk, D. E., Reilly, M., Fertig, J. B., & Koob, G. F. (2015b). Heterogeneity of Alcohol Use Disorder : Understanding Mechanisms to Advance Personalized Treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(4), 579-584.  
<https://doi.org/10.1111/acer.12669>
- Liu, L., Zhao-Shea, R., McIntosh, J. M., & Tapper, A. R. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors containing the  $\alpha 6$  subunit contribute to ethanol activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Biochemical Pharmacology*, 86(8), 1194-1200.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.015>
- Liu, Y., Jean-Richard-dit-Bressel, P., Yau, J. O.-Y., Willing, A., Prasad, A. A., Power, J. M., Killcross, S., Clifford, C. W. G., & McNally, G. P. (2020). The Mesolimbic Dopamine Activity Signatures of Relapse to Alcohol-Seeking. *The Journal of Neuroscience*, 40(33), 6409-6427.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0724-20.2020>
- Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J., Wang, D., Zeng, J., Bao, J., Kim, J.-Y., Chen, Z.-F., El Mestikawy, S., & Luo, M. (2014). Dorsal Raphe Neurons Signal Reward through 5-HT and Glutamate. *Neuron*, 81(6), 1360-1374.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.010>
- Livingstone, P. D., & Wonnacott, S. (2009). Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 744-755.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.06.004>
- Lohani, S., Martig, A. K., Underhill, S. M., DeFrancesco, A., Roberts, M. J., Rinaman, L., Amara, S., & Moghaddam, B. (2018). Burst activation of dopamine neurons produces prolonged post-

- burst availability of actively released dopamine. *Neuropsychopharmacology*, 43(10), 2083-2092. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0088-7>
- Lovick, T. A., & Zangrossi, H. (2021). Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 711065. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.711065>
- Luigjes, J., Segrave, R., de Joode, N., Figeo, M., & Denys, D. (2019). Efficacy of Invasive and Non-Invasive Brain Modulation Interventions for Addiction. *Neuropsychology Review*, 29(1), 116-138. <https://doi.org/10.1007/s11065-018-9393-5>
- Lüscher, C., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2020). The transition to compulsion in addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(5), 247-263. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0289-z>
- Lynch, W. J. (2018). Modeling the development of drug addiction in male and female animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 164, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.06.006>
- Lynch, W. J., Tan, L., Narmeen, S., Beiter, R., & Brunzell, D. H. (2019). Exercise or saccharin during abstinence block estrus-induced increases in nicotine-seeking. *Physiology & Behavior*, 203, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.026>
- MacQueen, D. A., Heckman, B. W., Blank, M. D., Janse Van Rensburg, K., Park, J. Y., Drobos, D. J., & Evans, D. E. (2014). Variation in the  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit gene predicts cigarette smoking intensity as a function of nicotine content. *The Pharmacogenomics Journal*, 14(1), 70-76. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.50>
- Maex, R., Grinevich, V. P., Grinevich, V., Budygin, E., Bencherif, M., & Gutkin, B. (2014). Understanding the Role  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors Play in Dopamine Efflux in Nucleus Accumbens. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(10), 1032-1040. <https://doi.org/10.1021/cn500126t>
- Magill, M., Kiluk, B. D., McCrady, B. S., Tonigan, J. S., & Longabaugh, R. (2015). Active Ingredients of Treatment and Client Mechanisms of Change in Behavioral Treatments for Alcohol Use Disorders : Progress 10 Years Later. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(10), 1852-1862. <https://doi.org/10.1111/acer.12848>

- Magill, M., & Ray, L. A. (2009). Cognitive-Behavioral Treatment With Adult Alcohol and Illicit Drug Users : A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 70(4), 516-527. <https://doi.org/10.15288/jsad.2009.70.516>
- Maisel, N. C., Blodgett, J. C., Wilbourne, P. L., Humphreys, K., & Finney, J. W. (2013). Meta-analysis of naltrexone and acamprostate for treating alcohol use disorders : When are these medications most helpful?: Meta-analysis of naltrexone and acamprostate. *Addiction*, 108(2), 275-293. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2012.04054.x>
- Malin, D. H., & Goyarzu, P. (2009). Rodent Models of Nicotine Withdrawal Syndrome. In J. E. Henningfield, E. D. London, & S. Pogun (Éds.), *Nicotine Psychopharmacology* (Vol. 192, p. 401-434). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_14)
- Mamlouk, G. M., Dorris, D. M., Barrett, L. R., & Meitzen, J. (2020). Sex bias and omission in neuroscience research is influenced by research model and journal, but not reported NIH funding. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 57, 100835. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2020.100835>
- Mann, K., Torup, L., Sørensen, P., Gual, A., Swift, R., Walker, B., & van den Brink, W. (2016). Nalmefene for the management of alcohol dependence : Review on its pharmacology, mechanism of action and meta-analysis on its clinical efficacy. *European Neuropsychopharmacology*, 26(12), 1941-1949. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.10.008>
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R., & McGehee, D. S. (2002). Synaptic Mechanisms Underlie Nicotine-Induced Excitability of Brain Reward Areas. *Neuron*, 33(6), 905-919. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00625-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00625-6)
- Mao, D., Gallagher, K., & McGehee, D. S. (2011). Nicotine Potentiation of Excitatory Inputs to Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*, 31(18), 6710-6720. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5671-10.2011>
- Mao, D., Perry, D. C., Yasuda, R. P., Wolfe, B. B., & Kellar, K. J. (2007). The  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo. *Journal of*

*Neurochemistry*, 0(0), 071027034046002-??? <https://doi.org/10.1111/j.1471->

4159.2007.05011.x

Marchant, N. J., Campbell, E. J., Pelloux, Y., Bossert, J. M., & Shaham, Y. (2019). Context-induced relapse after extinction versus punishment : Similarities and differences.

*Psychopharmacology*, 236(1), 439-448. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4929-1>

Marchant, N. J., Khuc, T. N., Pickens, C. L., Bonci, A., & Shaham, Y. (2013). Context-Induced Relapse to Alcohol Seeking After Punishment in a Rat Model. *Biological Psychiatry*, 73(3), 256-262.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.007>

Marcinkiewicz, C. A. (2015). Serotonergic Systems in the Pathophysiology of Ethanol Dependence : Relevance to Clinical Alcoholism. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(7), 1026-1039.

<https://doi.org/10.1021/cn5003573>

Margolis, E. B., Lock, H., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2006). The ventral tegmental area revisited :

Is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons?: Electrophysiological properties of VTA neurons. *The Journal of Physiology*, 577(3), 907-924.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.117069>

Marianno, P., Abrahao, K. P., & Camarini, R. (2017). Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice. *PLOS ONE*, 12(1), e0170317.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170317>

Marks, M., Pauly, J., Gross, S., Deneris, E., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S., & Collins, A.

(1992). Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment.

*The Journal of Neuroscience*, 12(7), 2765-2784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-07-02765.1992>

Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2012). Modeling Relapse in Animals. In W. H. Sommer & R. Spanagel

(Éds.), *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction* (Vol. 13, p. 403-432). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28720-6\\_202](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28720-6_202)

Maskos, U. (2020). The nicotinic receptor alpha5 coding polymorphism rs16969968 as a major target in disease : Functional dissection and remaining challenges. *Journal of Neurochemistry*,

154(3), 241-250. <https://doi.org/10.1111/jnc.14989>

- Maskos, U., Molles, B. E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B. P., Guilloux, J.-P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloëz-Tayarani, I., Bemelmans, A.-P., Mallet, J., Gardier, A. M., David, V., Faure, P., Granon, S., & Changeux, J.-P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, *436*(7047), 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>
- Mason, B. J., Light, J. M., Williams, L. D., & Drobos, D. J. (2009). Proof-of-concept human laboratory study for protracted abstinence in alcohol dependence : Effects of gabapentin: Effects of gabapentin. *Addiction Biology*, *14*(1), 73-83. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00133.x>
- Massopust, L. C., & Thompson, R. (1962). A new interpedunculo-diencephalic pathway in rats and cats. *The Journal of Comparative Neurology*, *118*(1), 97-105. <https://doi.org/10.1002/cne.901180108>
- Mathuru, A. S., & Jesuthasan, S. (2013). The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00099>
- Matos-Ocasio, F., Espinoza, V. E., Correa-Alfonzo, P., Khan, A. M., & O'Dell, L. E. (2021a). Female rats display greater nicotine withdrawal-induced cellular activation of a central portion of the interpeduncular nucleus versus males : A study of Fos immunoreactivity within provisionally assigned interpeduncular subnuclei. *Drug and Alcohol Dependence*, *221*, 108640. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108640>
- Matos-Ocasio, F., Espinoza, V. E., Correa-Alfonzo, P., Khan, A. M., & O'Dell, L. E. (2021b). Female rats display greater nicotine withdrawal-induced cellular activation of a central portion of the interpeduncular nucleus versus males : A study of Fos immunoreactivity within provisionally assigned interpeduncular subnuclei. *Drug and Alcohol Dependence*, *221*, 108640. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108640>
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, *447*(7148), 1111-1115. <https://doi.org/10.1038/nature05860>
- Maurage, P., Lannoy, S., Mange, J., Grynberg, D., Beaunieux, H., Banovic, I., Gierski, F., & Naassila, M. (2020). What We Talk About When We Talk About Binge Drinking : Towards an Integrated



- Conceptualization and Evaluation. *Alcohol and Alcoholism*, 55(5), 468-479.  
<https://doi.org/10.1093/alcalc/aga041>
- McGehee, D. S., Heath, M. J. S., Gelber, S., Devay, P., & Role, L. W. (1995). Nicotine Enhancement of Fast Excitatory Synaptic Transmission in CNS by Presynaptic Receptors. *Science*, 269(5231), 1692-1696. <https://doi.org/10.1126/science.7569895>
- McKee, S. A., & Weinberger, A. H. (2013). How Can We Use Our Knowledge of Alcohol-Tobacco Interactions to Reduce Alcohol Use? *Annual Review of Clinical Psychology*, 9(1), 649-674.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185549>
- McLaughlin, I., Dani, J. A., & De Biasi, M. (2017). The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *Journal of Neurochemistry*, 142, 130-143. <https://doi.org/10.1111/jnc.14008>
- Melendez, R. I. (2011). Intermittent (Every-Other-Day) Drinking Induces Rapid Escalation of Ethanol Intake and Preference in Adolescent and Adult C57BL/6J Mice : RAPID ESCALATION OF ETHANOL INTAKE. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(4), 652-658.  
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01383.x>
- Melendez, R. I., Rodd-Henricks, Z. A., Engleman, E. A., Li, T.-K., McBride, W. J., & Murphy, J. M. (2002). Microdialysis of Dopamine in the Nucleus Accumbens of Alcohol-Preferring (P) Rats During Anticipation and Operant Self-Administration of Ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(3), 318-325. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02540.x>
- Millar, N. S., & Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56(1), 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.041>
- Miller, C. N., & Kamens, H. M. (2020). The role of nicotinic acetylcholine receptors in alcohol-related behaviors. *Brain Research Bulletin*, 163, 135-142.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.07.017>
- Minozzi, S., Saulle, R., & Rösner, S. (2018). Baclofen for alcohol use disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012557.pub2>

- Mitchell, J. M., Teague, C. H., Kayser, A. S., Bartlett, S. E., & Fields, H. L. (2012). Varenicline decreases alcohol consumption in heavy-drinking smokers. *Psychopharmacology*, *223*(3), 299-306. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2717-x>
- Molas, S., DeGroot, S. R., Zhao-Shea, R., & Tapper, A. R. (2017). Anxiety and Nicotine Dependence : Emerging Role of the Habenulo-Interpeduncular Axis. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(2), 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.001>
- Molas, S., Zhao-Shea, R., Liu, L., DeGroot, S. R., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2017). A circuit-based mechanism underlying familiarity signaling and the preference for novelty. *Nature Neuroscience*, *20*(9), 1260-1268. <https://doi.org/10.1038/nn.4607>
- Monteiro, S., Roque, S., de Sá-Calçada, D., Sousa, N., Correia-Neves, M., & Cerqueira, J. J. (2015). An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. *Frontiers in Psychiatry*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00006>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017a). Ventral tegmental area : Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(2), 73-85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017b). Ventral tegmental area : Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(2), 73-85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nature*, *538*(7625), 411-415. <https://doi.org/10.1038/nature19785>
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y. A., Marti, F., Lambalez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., & Faure, P. (2014a). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Molecular Psychiatry*, *19*(8), 930-936. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.158>
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y. A., Marti, F., Lambalez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., & Faure, P. (2014b). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Molecular Psychiatry*, *19*(8), 930-936. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.158>

- Morley, B. J. (1986). The Interpeduncular Nucleus. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 28, p. 157-182). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60108-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60108-7)
- Morley, K. C., Baillie, A., Fraser, I., Furneaux-Bate, A., Dore, G., Roberts, M., Abdalla, A., Phung, N., & Haber, P. S. (2018). Baclofen in the treatment of alcohol dependence with or without liver disease : Multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*, *212*(6), 362-369. <https://doi.org/10.1192/bjp.2018.13>
- Morton, G., Nasirova, N., Sparks, D. W., Brodsky, M., Sivakumaran, S., Lambe, E. K., & Turner, E. E. (2018). Chrna5-Expressing Neurons in the Interpeduncular Nucleus Mediate Aversion Primed by Prior Stimulation or Nicotine Exposure. *The Journal of Neuroscience*, *38*(31), 6900-6920. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0023-18.2018>
- Moss, H. B., Chen, C. M., & Yi, H. (2007). Subtypes of alcohol dependence in a nationally representative sample. *Drug and Alcohol Dependence*, *91*(2-3), 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2007.05.016>
- Mrejeru, A., Martí-Prats, L., Avegno, E. M., Harrison, N. L., & Sulzer, D. (2015). A subset of ventral tegmental area dopamine neurons responds to acute ethanol. *Neuroscience*, *290*, 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.081>
- Munafò, M. R., Timofeeva, M. N., Morris, R. W., Prieto-Merino, D., Sattar, N., Brennan, P., Johnstone, E. C., Relton, C., Johnson, P. C. D., Walther, D., Whincup, P. H., Casas, J. P., Uhl, G. R., Vineis, P., Padmanabhan, S., Jefferis, B. J., Amuzu, A., Riboli, E., Upton, M. N., ... Davey Smith, G. (2012). Association Between Genetic Variants on Chromosome 15q25 Locus and Objective Measures of Tobacco Exposure. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *104*(10), 740-748. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs191>
- Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., & Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, *152*(4-2), 1024-1031. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
- Namboodiri, V. M. K., Rodriguez-Romaguera, J., & Stuber, G. D. (2016). The habenula. *Current Biology*, *26*(19), R873-R877. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.051>

- Nashmi, R., & Lester, H. (2007). Cell autonomy, receptor autonomy, and thermodynamics in nicotine receptor up-regulation. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1145-1154.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.040>
- Nelson, M. E., Wang, F., Kuryatov, A., Choi, C. H., Gerzanich, V., & Lindstrom, J. (s. d.). *Functional Properties of Human Nicotinic AChRs Expressed by IMR-32 Neuroblastoma Cells Resemble Those of  $\alpha 3\beta 4$  AChRs Expressed in Permanently Transfected HEK Cells*. 20.
- Nestler, E. J., Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2009). *Molecular neuropharmacology : A foundation for clinical neuroscience* (2nd ed). McGraw-Hill Medical.
- Neumark, Y. D., Friedlander, Y., Durst, R., Leitersdorf, E., Jaffe, D., Ramchandani, V. A., O'Connor, S., Carr, L. G., & Li, T.-K. (2004). Alcohol Dehydrogenase Polymorphisms Influence Alcohol-Elimination Rates in a Male Jewish Population: *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 28(1), 10-14. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000108667.79219.4D>
- Ng, G. YK., & George, S. R. (1994). Dopamine receptor agonist reduces ethanol self-administration in the ethanol-preferring C57BL/6J inbred mouse. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 269(3), 365-374. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90044-2)
- Ngolab, J., Liu, L., Zhao-Shea, R., Gao, G., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2015). Functional Upregulation of  $\alpha 4^*$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in VTA GABAergic Neurons Increases Sensitivity to Nicotine Reward. *The Journal of Neuroscience*, 35(22), 8570-8578.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4453-14.2015>
- Nieto, S. J., & Kosten, T. A. (2017). Female Sprague-Dawley rats display greater appetitive and consummatory responses to alcohol. *Behavioural Brain Research*, 327, 155-161.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.037>
- Oakman, S., Faris, P., Kerr, P., Cozzari, C., & Hartman, B. (1995). Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 15(9), 5859-5869.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-05859.1995>
- Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S., & Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353(6307), 1536-1541. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7003>

- Olfson, E., Saccone, N. L., Johnson, E. O., Chen, L.-S., Culverhouse, R., Doheny, K., Foltz, S. M., Fox, L., Gogarten, S. M., Hartz, S., Hetrick, K., Laurie, C. C., Marosy, B., Amin, N., Arnett, D., Barr, R. G., Bartz, T. M., Bertelsen, S., Borecki, I. B., ... Bierut, L. J. (2016). Rare, low frequency and common coding variants in CHRNA5 and their contribution to nicotine dependence in European and African Americans. *Molecular Psychiatry*, *21*(5), 601-607.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.105>
- Olson, V. G., & Nestler, E. J. (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse*, *61*(2), 87-95. <https://doi.org/10.1002/syn.20345>
- O'Malley, S. S., Zweben, A., Fucito, L. M., Wu, R., Piepmeier, M. E., Ockert, D. M., Bold, K. W., Petrakis, I., Muvvala, S., Jatlow, P., & Gueorguieva, R. (2018). Effect of Varenicline Combined With Medical Management on Alcohol Use Disorder With Comorbid Cigarette Smoking. *JAMA Psychiatry*, *75*(2), 129-138. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.3544>
- Omelchenko, N., & Sesack, S. R. (2006). Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *494*(6), 863-875. <https://doi.org/10.1002/cne.20852>
- Oni, E. N., Halikere, A., Li, G., Toro-Ramos, A. J., Swerdel, M. R., Verpeut, J. L., Moore, J. C., Bello, N. T., Bierut, L. J., Goate, A., Tischfield, J. A., Pang, Z. P., & Hart, R. P. (2016). Increased nicotine response in iPSC-derived human neurons carrying the CHRNA5 N398 allele. *Scientific Reports*, *6*(1), 34341. <https://doi.org/10.1038/srep34341>
- O'Rourke, K. Y., Touchette, J. C., Hartell, E. C., Bade, E. J., & Lee, A. M. (2016). Voluntary co-consumption of alcohol and nicotine : Effects of abstinence, intermittency, and withdrawal in mice. *Neuropharmacology*, *109*, 236-246.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.023>
- Palpacuer, C., Duprez, R., Huneau, A., Locher, C., Boussageon, R., Laviolle, B., & Naudet, F. (2018). Pharmacologically controlled drinking in the treatment of alcohol dependence or alcohol use disorders : A systematic review with direct and network meta-analyses on nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen and topiramate: Pharmacologically controlled drinking. *Addiction*, *113*(2), 220-237. <https://doi.org/10.1111/add.13974>

- Pang, X., Liu, L., Ngolab, J., Zhao-Shea, R., McIntosh, J. M., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2016). Habenula cholinergic neurons regulate anxiety during nicotine withdrawal via nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, *107*, 294-304.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.039>
- Parker, C. C., Lusk, R., & Saba, L. M. (2020). Alcohol Sensitivity as an Endophenotype of Alcohol Use Disorder : Exploring Its Translational Utility between Rodents and Humans. *Brain Sciences*, *10*(10), 725. <https://doi.org/10.3390/brainsci10100725>
- Parkitna, J. R., Sikora, M., Gołda, S., Gołombiowska, K., Bystrowska, B., Engblom, D., Bilbao, A., & Przewlocki, R. (2013). Novelty-Seeking Behaviors and the Escalation of Alcohol Drinking After Abstinence in Mice Are Controlled by Metabotropic Glutamate Receptor 5 on Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. *Biological Psychiatry*, *73*(3), 263-270.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.019>
- Paterson, D., & Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, *61*(1), 75-111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00045-3)
- Patrick, M. E., Terry-McElrath, Y. M., Evans-Polce, R. J., & Schulenberg, J. E. (2020). Negative alcohol-related consequences experienced by young adults in the past 12 months : Differences by college attendance, living situation, binge drinking, and sex. *Addictive Behaviors*, *105*, 106320. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2020.106320>
- Perez, E., Quijano-Cardé, N., & De Biasi, M. (2015). Nicotinic Mechanisms Modulate Ethanol Withdrawal and Modify Time Course and Symptoms Severity of Simultaneous Withdrawal from Alcohol and Nicotine. *Neuropsychopharmacology*, *40*(10), 2327-2336.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.80>
- Perry, D. C., Xiao, Y., Nguyen, H. N., Musachio, J. L., Dávila-García, M. I., & Kellar, K. J. (2002). Measuring nicotinic receptors with characteristics of  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  subtypes in rat tissues by autoradiography : Measuring nicotinic receptor subtypes in rat. *Journal of Neurochemistry*, *82*(3), 468-481. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00951.x>
- Pettinati, H. M., Silverman, B. L., Battisti, J. J., Forman, R., Schweizer, E., & Gastfriend, D. R. (2011). Efficacy of Extended-Release Naltrexone in Patients with Relatively Higher Severity of Alcohol

- Dependence : EFFICACY OF EXTENDED-RELEASE NALTREXONE. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(10), 1804-1811. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01524.x>
- Phillips, P. E. M., Stuber, G. D., Heien, M. L. A. V., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422(6932), 614-618. <https://doi.org/10.1038/nature01476>
- Phillipson, O. T. (1979). A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 187(1), 99-115. <https://doi.org/10.1002/cne.901870107>
- Phillipson, O. T., & Pycock, C. J. (1982). Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula : Some implications for habenular function. *Experimental Brain Research*, 45-45(1-2). <https://doi.org/10.1007/BF00235766>
- Piazza, P. V., & Deroche-Gamonet, V. (2013). A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology*, 229(3), 387-413. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3224-4>
- Picciotto, M., Addy, N., Mineur, Y., & Brunzell, D. (2008). It is not “either/or” : Activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Progress in Neurobiology*, 84(4), 329-342. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.12.005>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator : Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Picciotto, M. R., & Kenny, P. J. (2013). Molecular Mechanisms Underlying Behaviors Related to Nicotine Addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), a012112-a012112. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012112>
- Pidoplichko, V. I. (2004). Nicotinic Cholinergic Synaptic Mechanisms in the Ventral Tegmental Area Contribute to Nicotine Addiction. *Learning & Memory*, 11(1), 60-69. <https://doi.org/10.1101/lm.70004>

- Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system : The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*(2), 215-238. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.016>
- Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion : A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, *86*(5), 1145-1157. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>
- Placzek, A. N., Zhang, T. A., & Dani, J. A. (2009). Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(6), 752-760. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.39>
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *35*(suppl 2), S140-S146. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1149>
- Pons, S., Fattore, L., Cossu, G., Tolu, S., Porcu, E., McIntosh, J. M., Changeux, J. P., Maskos, U., & Fratta, W. (2008). Crucial Role of 4 and 6 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from Ventral Tegmental Area in Systemic Nicotine Self-Administration. *Journal of Neuroscience*, *28*(47), 12318-12327. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3918-08.2008>
- Potenza, M. N., & De Wit, H. (2010). Control Yourself : Alcohol and Impulsivity: CONTROL YOURSELF. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01214.x>
- Prevost, M. S., Bouchenaki, H., Barilone, N., Gielen, M., & Corringier, P.-J. (2021). Concatemers to re-investigate the role of  $\alpha 5$  in  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(3), 1051-1064. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03558-z>
- Priddy, B. M., Carmack, S. A., Thomas, L. C., Vendruscolo, J. C. M., Koob, G. F., & Vendruscolo, L. F. (2017). Sex, strain, and estrous cycle influences on alcohol drinking in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *152*, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.08.001>
- Proulx, E., Piva, M., Tian, M. K., Bailey, C. D. C., & Lambe, E. K. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors in attention circuitry : The role of layer VI neurons of prefrontal cortex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(7), 1225-1244. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1481-3>



- Puaud, M., Ossowska, Z., Barnard, J., & Milton, A. L. (2018). Saccharin fading is not required for the acquisition of alcohol self-administration, and can alter the dynamics of cue-alcohol memory reconsolidation. *Psychopharmacology*, *235*(4), 1069-1082. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4824-1>
- Putz, G., Kristufek, D., Orr-Urtreger, A., Changeux, J.-P., Huck, S., & Scholze, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptor-subunit mRNAs in the mouse superior cervical ganglion are regulated by development but not by deletion of distinct subunit genes. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(5), 972-981. <https://doi.org/10.1002/jnr.21559>
- Qin, C., & Luo, M. (2009). Neurochemical phenotypes of the afferent and efferent projections of the mouse medial habenula. *Neuroscience*, *161*(3), 827-837. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.085>
- Quick, M. W., & Lester, R. A. J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, *53*(4), 457-478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>
- Quina, L. A., Harris, J., Zeng, H., & Turner, E. E. (2017). Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. *Journal of Comparative Neurology*, *525*(12), 2632-2656. <https://doi.org/10.1002/cne.24221>
- Radwanska, K., & Kaczmarek, L. (2012). Characterization of an alcohol addiction-prone phenotype in mice : Characterization of an alcohol addiction-prone phenotype. *Addiction Biology*, *17*(3), 601-612. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00394.x>
- Rahman, S., Engleman, E. A., & Bell, R. L. (2015). Nicotinic receptor modulation to treat alcohol and drug dependence. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00426>
- Rahman, S., Engleman, E. A., & Bell, R. L. (2016). Recent Advances in Nicotinic Receptor Signaling in Alcohol Abuse and Alcoholism. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 137, p. 183-201). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.10.004>
- Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A., & Role, L. (1996). Functional contributions of  $\alpha 5$  subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, *380*(6572), 347-351. <https://doi.org/10.1038/380347a0>

- Ranft, K., Dobrowolny, H., Krell, D., Bielau, H., Bogerts, B., & Bernstein, H.-G. (2010). Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. *Psychological Medicine, 40*(4), 557-567.  
<https://doi.org/10.1017/S0033291709990821>
- Ranganath, C., & Rainer, G. (2003). Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nature Reviews Neuroscience, 4*(3), 193-202. <https://doi.org/10.1038/nrn1052>
- Ray, C., Soderblom, E. J., Bai, Y., Carroll, F. I., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2017). Probing the Allosteric Role of the  $\alpha 5$  Subunit of  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptors by Functionally Selective Modulators and Ligands. *ACS Chemical Biology, 12*(3), 702-714.  
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01117>
- Ray, L. A., Bujarski, S., Roche, D. J. O., & Magill, M. (2018). Overcoming the “Valley of Death” in Medications Development for Alcohol Use Disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 42*(9), 1612-1622. <https://doi.org/10.1111/acer.13829>
- Redish, A. D., Jensen, S., & Johnson, A. (2008). A unified framework for addiction : Vulnerabilities in the decision process. *Behavioral and Brain Sciences, 31*(4), 415-437.  
<https://doi.org/10.1017/S0140525X0800472X>
- Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., Feng, G., & Luo, M. (2011). Habenula “Cholinergic” Neurons Corelease Glutamate and Acetylcholine and Activate Postsynaptic Neurons via Distinct Transmission Modes. *Neuron, 69*(3), 445-452.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.038>
- Rhodes, J. S., Best, K., Belknap, J. K., Finn, D. A., & Crabbe, J. C. (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior, 84*(1), 53-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.007>
- Rhodes, J. S., Ford, M. M., Yu, C.-H., Brown, L. L., Finn, D. A., Garland, T., & Crabbe, J. C. (2007). Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. *Genes, Brain and Behavior, 6*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00210.x>
- Riala, K., Hakko, H., Isohanni, M., Jarvelin, M., & Rasanen, P. (2004). Teenage smoking and substance use as predictors of severe alcohol problems in late adolescence and in young adulthood.

- Robinson, T., & Berridge, K. C. (1993). *The neural basis of drug craving : An incentive-sensitization theory of addiction*. 45.
- Rodd, Z. A. (2004). Intracranial Self-Administration of Ethanol within the Ventral Tegmental Area of Male Wistar Rats : Evidence for Involvement of Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1050-1057. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1319-03.2004>
- Rodd-Henricks, Z. A., McKinzie, D. L., Crile, R. S., Murphy, J. M., & McBride, W. J. (2000). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology*, 149(3), 217-224. <https://doi.org/10.1007/s002139900347>
- Rolland, B. (2014). Trouble de l'usage d'alcool : Les nouvelles méthodes d'évaluation. *MISE AU POINT*, 7.
- Rolland, B. (2016). 57. Définitions et classifications des troubles de l'usage d'alcool. In *Traité d'addictologie: Vol. 2e éd.* (p. 440-443). Lavoisier; Cairn.info. <https://www.cairn.info/traite-d-addictologie--9782257206503-p-440.htm>
- Rønnekleiv, O. K., & Møller, M. (1979). Brain-pineal nervous connections in the rat : An ultrastructure study following habenular lesion. *Experimental Brain Research*, 37(3). <https://doi.org/10.1007/BF00236823>
- Room, R. (2004). Smoking and drinking as complementary behaviours. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.12.003>
- Roques, B., Aeberhard, P., Besson, J., Cami, J., Lepine, J., Stinus, L., Beauverie, P., Biour, M., Giros, B., Maldonado, R., & Valleur, M. (1998). *Problèmes posés par la dangerosité des drogues— Rapport du professeur Bernard Roques au secrétaire d'État à la santé*. Paris : Secrétariat d'Etat à la Santé, 1998.
- Rosenwasser, A. M., Fixaris, M. C., Crabbe, J. C., Brooks, P. C., & Ascheid, S. (2013). Escalation of intake under intermittent ethanol access in diverse mouse genotypes : Escalation of ethanol intake. *Addiction Biology*, 18(3), 496-507. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00481.x>

- Rösner, S., Hackl-Herrwerth, A., Leucht, S., Lehert, P., Vecchi, S., & Soyka, M. (2010). Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD004332.pub2>
- Saccone, S. F., Hinrichs, A. L., Saccone, N. L., Chase, G. A., Konvicka, K., Madden, P. A. F., Breslau, N., Johnson, E. O., Hatsukami, D., Pomerleau, O., Swan, G. E., Goate, A. M., Rutter, J., Bertelsen, S., Fox, L., Fugman, D., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Wang, J. C., ... Bierut, L. J. (2007). Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Human Molecular Genetics*, *16*(1), 36-49.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddl438>
- Sajja, R. K., & Rahman, S. (2011). Lobeline and cytisine reduce voluntary ethanol drinking behavior in male C57BL/6J mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(1), 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.020>
- Sajja, R. K., & Rahman, S. (2012). Neuronal nicotinic receptor ligands modulate chronic nicotine-induced ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *102*(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.03.017>
- Sajja, R. K., & Rahman, S. (2013). Nicotinic receptor partial agonists modulate alcohol deprivation effect in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *110*, 161-167.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.07.009>
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470-485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>
- Salamone, J. D., Pardo, M., Yohn, S. E., López-Cruz, L., SanMiguel, N., & Correa, M. (2015). Mesolimbic Dopamine and the Regulation of Motivated Behavior. In E. H. Simpson & P. D. Balsam (Éds.), *Behavioral Neuroscience of Motivation* (Vol. 27, p. 231-257). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2015\\_383](https://doi.org/10.1007/7854_2015_383)
- Salamone, J. D., Yohn, S. E., López-Cruz, L., San Miguel, N., & Correa, M. (2016). Activational and effort-related aspects of motivation : Neural mechanisms and implications for psychopathology. *Brain*, *139*(5), 1325-1347. <https://doi.org/10.1093/brain/aww050>

- Salas, R. (2004). Decreased Signs of Nicotine Withdrawal in Mice Null for the  $\alpha 4$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit. *Journal of Neuroscience*, *24*(45), 10035-10039.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1939-04.2004>
- Salas, R., Orr-Urtreger, A., Broide, R. S., Beaudet, A., Paylor, R., & Biasi, M. D. (2003). The Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit  $\alpha 5$  Mediates Short-Term Effects of Nicotine in Vivo. *8*.
- Salas, R., Sturm, R., Boulter, J., & De Biasi, M. (2009). Nicotinic Receptors in the Habenulo-Interpeduncular System Are Necessary for Nicotine Withdrawal in Mice. *Journal of Neuroscience*, *29*(10), 3014-3018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4934-08.2009>
- Salminen, O., Murphy, K. L., McIntosh, J. M., Drago, J., Marks, M. J., Collins, A. C., & Grady, S. R. (2004). Subunit Composition and Pharmacology of Two Classes of Striatal Presynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors Mediating Dopamine Release in Mice. *Molecular Pharmacology*, *65*(6), 1526-1535. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1526>
- Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents : An overview. *Addiction Biology*, *11*(1), 2-38.  
<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x>
- Santos, N., Chatterjee, S., Henry, A., Holgate, J., & Bartlett, S. E. (2013). The  $\alpha 5$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Plays an Important Role in the Sedative Effects of Ethanol But Does Not Modulate Consumption in Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *37*(4), 655-662. <https://doi.org/10.1111/acer.12009>
- Schlaepfer, I., Hoft, N., & Ehringer, M. (2008). The Genetic Components of Alcohol and Nicotine Co-Addiction : From Genes to Behavior. *Current Drug Abuse Reviewse*, *1*(2), 124-134.  
<https://doi.org/10.2174/1874473710801020124>
- Schlaepfer, I. R., Hoft, N. R., Collins, A. C., Corley, R. P., Hewitt, J. K., Hopfer, C. J., Lessem, J. M., McQueen, M. B., Rhee, S. H., & Ehringer, M. A. (2008). The CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster Variability as an Important Determinant of Early Alcohol and Tobacco Initiation in Young Adults. *Biological Psychiatry*, *63*(11), 1039-1046.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.10.024>

- Scholze, P., & Huck, S. (2020). The  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates  $\alpha 4\beta 2^*$  and  $\alpha 3\beta 4^*$  Receptors. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.607959>
- Schuckit, M. A. (1998). Biological, psychological and environmental predictors of the alcoholism risk : A longitudinal study. *Journal of Studies on Alcohol*, 59(5), 485-494. <https://doi.org/10.15288/jsa.1998.59.485>
- Schuckit, M. A. (1999). *VULNERABILITY FACTORS FOR ALCOHOLISM*. 14.
- Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk : Basic and recent data. *Behavioral and Brain Functions*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-24>
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 10.
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). *A Neural Substrate of Prediction and Reward*. 8.
- Sciacaluga, M., Moriconi, C., Martinello, K., Catalano, M., Bermudez, I., Stitzel, J. A., Maskos, U., & Fucile, S. (2015). Crucial role of nicotinic  $\alpha 5$  subunit variants for  $Ca^{2+}$  fluxes in ventral midbrain neurons. *The FASEB Journal*, 29(8), 3389-3398. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268102>
- Seif, T., Chang, S.-J., Simms, J. A., Gibb, S. L., Dadgar, J., Chen, B. T., Harvey, B. K., Ron, D., Messing, R. O., Bonci, A., & Hopf, F. W. (2013). Cortical activation of accumbens hyperpolarization-active NMDARs mediates aversion-resistant alcohol intake. *Nature Neuroscience*, 16(8), 1094-1100. <https://doi.org/10.1038/nn.3445>
- Sesack, S. R., & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia Reward Network : Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 27-47. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.93>
- Sherafat, Y., Bautista, M., Fowler, J. P., Chen, E., Ahmed, A., & Fowler, C. D. (2020). The Interpeduncular-Ventral Hippocampus Pathway Mediates Active Stress Coping and Natural Reward. *Eneuro*, 7(6), ENEURO.0191-20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0191-20.2020>
- Sherva, R., Kranzler, H. R., Yu, Y., Logue, M. W., Poling, J., Arias, A. J., Anton, R. F., Oslin, D., Farrer, L. A., & Gelernter, J. (2010). Variation in Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes is Associated

- with Multiple Substance Dependence Phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1921-1931. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.64>
- Shibata, H., & Suzuki, T. (1984). Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei : A retrograde horseradish peroxidase study. *Brain Research*, 296(2), 345-349. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90071-4)
- Shibata, H., Suzuki, T., & Matsushita, M. (1986). Afferent projections to the interpeduncular nucleus in the rat, as studied by retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *The Journal of Comparative Neurology*, 248(2), 272-284. <https://doi.org/10.1002/cne.902480210>
- Shih, P.-Y., Engle, S. E., Oh, G., Deshpande, P., Puskar, N. L., Lester, H. A., & Drenan, R. M. (2014). Differential Expression and Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Subdivisions of Medial Habenula. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9789-9802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0476-14.2014>
- Shippenberg, T. S. (2017). *RECENT ADVANCES IN ANIMAL MODELS OF DRUG ADDICTION*. 18.
- Shumake, J., Edwards, E., & Gonzalez-Lima, F. (2003). Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Research*, 963(1-2), 274-281. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04048-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04048-9)
- Silvestre, J. S., O'Neill, M. F., Fernández, A. G., & Palacios, JoséM. (1996). Effects of a range of dopamine receptor agonists and antagonists on ethanol intake in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 318(2-3), 257-265. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00821-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00821-7)
- Simeone, X., Karch, R., Ciuraszkiewicz, A., Orr-Urtreger, A., Lemmens-Gruber, R., Scholze, P., & Huck, S. (2019). The role of the nAChR subunits  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 4$  on synaptic transmission in the mouse superior cervical ganglion. *Physiological Reports*, 7(6), e14023. <https://doi.org/10.14814/phy2.14023>
- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long-Evans and Wistar Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816-1823. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>

- Smutek, M., Turbasa, M., Sikora, M., Piechota, M., Zajdel, J., Przewlocki, R., & Parkitna, J. R. (2014). A Model of Alcohol Drinking under an Intermittent Access Schedule Using Group-Housed Mice. *PLoS ONE*, *9*(5), e96787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096787>
- Sneddon, E. A., White, R. D., & Radke, A. K. (2019). Sex Differences in Binge-Like and Aversion-Resistant Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *43*(2), 243-249. <https://doi.org/10.1111/acer.13923>
- Solecki, W., Wickham, R. J., Behrens, S., Wang, J., Zwerling, B., Mason, G. F., & Addy, N. A. (2013). Differential role of ventral tegmental area acetylcholine and N-methyl-d-aspartate receptors in cocaine-seeking. *Neuropharmacology*, *75*, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.001>
- Solomon, R. L., & Corbit, J. D. (1974). An opponent-process theory of motivation : I. Temporal dynamics of affect. *Psychological Review*, *81*(2), 119-145. <https://doi.org/10.1037/h0036128>
- Soria-Gómez, E., Busquets-Garcia, A., Hu, F., Mehidi, A., Cannich, A., Roux, L., Louit, I., Alonso, L., Wiesner, T., Georges, F., Verrier, D., Vincent, P., Ferreira, G., Luo, M., & Marsicano, G. (2015). Habenular CB1 Receptors Control the Expression of Aversive Memories. *Neuron*, *88*(2), 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.035>
- Soyka, M., Friede, M., & Schnitker, J. (2016). Comparing Nalmefene and Naltrexone in Alcohol Dependence : Are there any Differences? Results from an Indirect Meta-Analysis. *Pharmacopsychiatry*, *49*(02), 66-75. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565184>
- Spanagel, R. (2017). Animal models of addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(3), 13.
- Spanagel, R., & Sanchis-Segura, C. (2003). The use of transgenic mice to study addictive behavior. *Clinical Neuroscience Research*, *3*(4-5), 325-331. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(03\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(03)00094-X)
- Spanagel, R., & Zieglhansberger, W. (1997). *Anti-craving compounds for ethanol : New pharmacological tools to study addictive processes*. 6.
- Stokes, C., & Papke, R. L. (2012). Use of an  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor subunit concatamer to characterize ganglionic receptor subtypes with specific subunit composition reveals



- species-specific pharmacologic properties. *Neuropharmacology*, 63(4), 538-546.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.035>
- Stuber, G. D., Britt, J. P., & Bonci, A. (2012). Optogenetic Modulation of Neural Circuits that Underlie Reward Seeking. *Biological Psychiatry*, 71(12), 1061-1067.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.010>
- Stuber, G. D., Klanker, M., de Ridder, B., Bowers, M. S., Joosten, R. N., Feenstra, M. G., & Bonci, A. (2008). Reward-Predictive Cues Enhance Excitatory Synaptic Strength onto Midbrain Dopamine Neurons. *Science*, 321(5896), 1690-1692.  
<https://doi.org/10.1126/science.1160873>
- Sullivan, J. L., Baenziger, J. C., Wagner, D. L., Rauscher, F. P., Nurnberger, J. I., & Steven Holmes, J. (1990). Platelet MAO in subtypes of alcoholism. *Biological Psychiatry*, 27(8), 911-922.  
[https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90473-F](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90473-F)
- Sutherland, R. J. (1982). The dorsal diencephalic conduction system : A review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 6(1), 1-13.  
[https://doi.org/10.1016/0149-7634\(82\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0149-7634(82)90003-3)
- Swanson, L. W. (1982). *The Projections of the Ventral Tegmental Area and Adjacent Regions : A Combined Fluorescent Retrograde Tracer and Immunofluorescence Study in the Rat*. 33.
- Swift, R. M. (2013). Naltrexone and Nalmefene : Any Meaningful Difference? *Biological Psychiatry*, 73(8), 700-701. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.03.002>
- Szumliński, K. K., Coelho, M. A., Lee, K. M., Tran, T., Sern, K. R., Bernal, A., & Kippin, T. E. (2019). DID it or DIDn't it? Exploration of a failure to replicate binge-like alcohol-drinking in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 178, 3-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.002>
- Tabakoff, B. (2000). *Animal Models in Alcohol Research*. 24(2), 8.
- Takagishi, M., & Chiba, T. (1991). Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat : An anterograde tracer PHA-L study. *Brain Research*, 566(1-2), 26-39. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91677-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91677-S)

- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., & Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors : Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), 733-750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>
- Tammimäki, A., Herder, P., Li, P., Esch, C., Laughlin, J. R., Akk, G., & Stitzel, J. A. (2012). Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 63(6), 1002-1011. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.022>
- Tapia, L., Kuryatov, A., & Lindstrom, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> Permeability of the ( $\alpha 4$ )<sub>3</sub>( $\beta 2$ )<sub>2</sub> Stoichiometry Greatly Exceeds That of ( $\alpha 4$ )<sub>2</sub>( $\beta 2$ )<sub>3</sub> Human Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 769-776. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030445>
- Tapper, A. R., McKinney, S. L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C., Whiteaker, P., Marks, M. J., Collins, A. C., & Lester, H. A. (2004). Nicotine Activation of  $\alpha 4^*$  Receptors : Sufficient for Reward, Tolerance, and Sensitization. *Science*, 306(5698), 1029-1032. <https://doi.org/10.1126/science.1099420>
- Thiele, T. E., Crabbe, J. C., & Boehm, S. L. (2014). "Drinking in the Dark" (DID) : A Simple Mouse Model of Binge-Like Alcohol Intake. *Current Protocols in Neuroscience*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0949s68>
- Thiele, T. E., Koh, M. T., & Pedrazzini, T. (2002). Voluntary Alcohol Consumption Is Controlled via the Neuropeptide Y Y1 Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), RC208-RC208. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-j0006.2002>
- Thiele, T. E., & Navarro, M. (2014). "Drinking in the dark" (DID) procedures : A model of binge-like ethanol drinking in non-dependent mice. *Alcohol*, 48(3), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.08.005>
- Tian, M. K., Bailey, C. D. C., De Biasi, M., Picciotto, M. R., & Lambe, E. K. (2011). Plasticity of prefrontal attention circuitry : Upregulated muscarinic excitability in response to decreased nicotinic signaling following deletion of  $\alpha 5$  or  $\beta 2$  subunits. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 1036. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.035>

- Tizabi, Y., Bai, L., Copeland, R. L., & Taylor, R. E. (2007). Combined effects of systemic alcohol and nicotine on dopamine release in the nucleus accumbens shell. *Alcohol and Alcoholism*, 42(5), 413-416. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agm057>
- Tobler, P. N., Fiorillo, C. D., & Schultz, W. (2005). Adaptive Coding of Reward Value by Dopamine Neurons. *Science*, 307(5715), 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1105370>
- Tolu, S., Marti, F., Morel, C., Perrier, C., Torquet, N., Pons, S., de Beaurepaire, R., & Faure, P. (2017). Nicotine enhances alcohol intake and dopaminergic responses through  $\beta_2^*$  and  $\beta_4^*$  nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, 7(1), 45116. <https://doi.org/10.1038/srep45116>
- Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science*, 324(5930), 1080-1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>
- Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 233. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
- Ungless, M. A., & Grace, A. A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 422-430. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.02.003>
- Valenti, O., Gill, K. M., & Grace, A. A. (2012). Different stressors produce excitation or inhibition of mesolimbic dopamine neuron activity : Response alteration by stress pre-exposure: Opposing effects of stress on DA neurons. *European Journal of Neuroscience*, 35(8), 1312-1321. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08038.x>
- Van Skike, C. E., Maggio, S. E., Reynolds, A. R., Casey, E. M., Bardo, M. T., Dwoskin, L. P., Prendergast, M. A., & Nixon, K. (2016). Critical needs in drug discovery for cessation of alcohol and nicotine polysubstance abuse. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 269-287. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.11.004>
- Vandaele, Y., & Ahmed, S. H. (2021). Habit, choice, and addiction. *Neuropsychopharmacology*, 46(4), 689-698. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00899-y>
- Vanhille, N., Belin-Rauscent, A., Mar, A. C., Ducret, E., & Belin, D. (2015). High Locomotor Reactivity to Novelty Is Associated with an Increased Propensity to Choose Saccharin Over Cocaine :

- New Insights into the Vulnerability to Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 40(3), 577-589.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.204>
- Vengeliene, V., Bilbao, A., & Spanagel, R. (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior : A comparison between rats and mice. *Alcohol*, 48(3), 313-320.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.002>
- Vengeliene, V., Noori, H. R., & Spanagel, R. (2013). The Use of a Novel Drinkometer System for Assessing Pharmacological Treatment Effects on Ethanol Consumption in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37, E322-E328. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01874.x>
- Venkatesan, S., & Lambe, E. K. (2020). *Chrna5* is Essential for a Rapid and Protected Response to Optogenetic Release of Endogenous Acetylcholine in Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 40(38), 7255-7268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1128-20.2020>
- Venniro, M., Caprioli, D., & Shaham, Y. (2016). Animal models of drug relapse and craving. In *Progress in Brain Research* (Vol. 224, p. 25-52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.08.004>
- Verhulst, B., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2015). The heritability of alcohol use disorders : A meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychological Medicine*, 45(5), 1061-1072.  
<https://doi.org/10.1017/S0033291714002165>
- Vertes, R. P., & Fass, B. (1988). Projections between the interpeduncular nucleus and basal forebrain in the rat as demonstrated by the anterograde and retrograde transport of WGA-HRP. *Experimental Brain Research*, 73(1), 23-31. <https://doi.org/10.1007/BF00279657>
- Villarín Pildaín, L., Vengeliene, V., & Matthäus, F. (2013). New measurement criteria for studying alcohol drinking and relapse in rodents. *In Silico Pharmacology*, 1(1), 13.  
<https://doi.org/10.1186/2193-9616-1-13>
- Virkkunen, M., & Linnoila, M. (1990). Serotonin in Early Onset, Male Alcoholics with Violent Behaviour. *Annals of Medicine*, 22(5), 327-331.  
<https://doi.org/10.3109/07853899009147915>
- Volkow, N. D., & Baler, R. D. (2014). Addiction science : Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*, 76, 235-249. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.007>

- Volkow, N. D., Michaelides, M., & Baler, R. (2019). The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiological Reviews*, *99*(4), 2115-2140. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2018>
- Volpicelli, J. R. (1992). Naltrexone in the Treatment of Alcohol Dependence. *Archives of General Psychiatry*, *49*(11), 876. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820110040006>
- Votaw, V. R., Geyer, R., Rieselbach, M. M., & McHugh, R. K. (2019). The epidemiology of benzodiazepine misuse : A systematic review. *Drug and Alcohol Dependence*, *200*, 95-114. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.02.033>
- Wada, E., & McKinnon, D. (1990). *The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (α5) in the rat central nervous system*. 9.
- Wagner, F., Stroh, T., & Veh, R. W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria : Subnuclear organization of the mouse habenula. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(11), 2650-2662. <https://doi.org/10.1002/cne.23554>
- Wang, J. C., Grucza, R., Cruchaga, C., Hinrichs, A. L., Bertelsen, S., Budde, J. P., Fox, L., Goldstein, E., Reyes, O., Saccone, N., Saccone, S., Xuei, X., Bucholz, K., Kuperman, S., Nurnberger, J., Rice, J. P., Schuckit, M., Tischfield, J., Hesselbrock, V., ... Goate, A. M. (2009). Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Molecular Psychiatry*, *14*(5), 501-510. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.42>
- Wang, J., & Lindstrom, J. (2018). Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors : Orthosteric/allosteric potentiation of nAChRs. *British Journal of Pharmacology*, *175*(11), 1805-1821. <https://doi.org/10.1111/bph.13745>
- Wang, N., Orr-Urtreger, A., Chapman, J., Rabinowitz, R., Nachman, R., & Korczyn, A. D. (2002). Autonomic function in mice lacking α5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *The Journal of Physiology*, *542*(2), 347-354. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013456>
- Ware, J. J., van den Bree, M., & Munafò, M. R. (2012). From Men to Mice : CHRNA5/CHRNA3, Smoking Behavior and Disease. *Nicotine & Tobacco Research*, *14*(11), 1291-1299. <https://doi.org/10.1093/ntr/nts106>

- Weiss, R. B., Baker, T. B., Cannon, D. S., von Niederhausern, A., Dunn, D. M., Matsunami, N., Singh, N. A., Baird, L., Coon, H., McMahon, W. M., Piper, M. E., Fiore, M. C., Scholand, M. B., Connett, J. E., Kanner, R. E., Gahring, L. C., Rogers, S. W., Hoidal, J. R., & Leppert, M. F. (2008). A Candidate Gene Approach Identifies the CHRNA5-A3-B4 Region as a Risk Factor for Age-Dependent Nicotine Addiction. *PLoS Genetics*, *4*(7), e1000125.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000125>
- Wennberg, P., Berglund, K., Berggren, U., Balldin, J., & Fahlke, C. (2014). The Cloninger Type I/Type II Typology : Configurations and Personality Profiles in Socially Stable Alcohol Dependent Patients. *Advances in Psychiatry*, *2014*, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2014/346157>
- Wilkie, G. I., Hutson, P. H., Stephens, M. W., Whiting, P., & Wonnacott, S. (1993). Hippocampal nicotinic autoreceptors modulate acetylcholine release. *Biochemical Society Transactions*, *21*(2), 429-431. <https://doi.org/10.1042/bst0210429>
- Wills, L., & Kenny, P. J. (2021). Addiction-related neuroadaptations following chronic nicotine exposure. *Journal of Neurochemistry*, *157*(5), 1652-1673. <https://doi.org/10.1111/jnc.15356>
- Wills, T. A., Vaccaro, D., & McNamara, G. (1994). Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use : An application of Cloninger's theory. *Journal of Substance Abuse*, *6*(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0899-3289\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/S0899-3289(94)90039-6)
- Wilson, A. D., Roos, C. R., Robinson, C. S., Stein, E. R., Manuel, J. A., Enkema, M. C., Bowen, S., & Witkiewitz, K. (2017). Mindfulness-based interventions for addictive behaviors : Implementation issues on the road ahead. *Psychology of Addictive Behaviors*, *31*(8), 888-896.  
<https://doi.org/10.1037/adb0000319>
- Winzer-Serhan, U. H., & Leslie, F. M. (2005). Expression of  $\alpha 5$  nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and cortical development. *The Journal of Comparative Neurology*, *481*(1), 19-30. <https://doi.org/10.1002/cne.20357>
- Wise, R. A., & Koob, G. F. (2014). The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, *39*(2), 254-262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Witkiewitz, K. (2011). *Behavioral Therapy Across the Spectrum*. *33*(4), 7.

- Witkiewitz, K., Litten, R. Z., & Leggio, L. (2019). Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Science Advances*, 5(9), eaax4043. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4043>
- Witkiewitz, K., Saville, & Hamreus. (2012). Acamprosate for treatment of alcohol dependence : Mechanisms, efficacy, and clinical utility. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 45. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S23184>
- Wittenberg, R. E., Wolfman, S. L., De Biasi, M., & Dani, J. A. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction : A brief introduction. *Neuropharmacology*, 177, 108256. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108256>
- Woitowich, N. C., Beery, A., & Woodruff, T. (2020). A 10-year follow-up study of sex inclusion in the biological sciences. *ELife*, 9, e56344. <https://doi.org/10.7554/eLife.56344>
- Wolfman, S. L., Gill, D. F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J. G., Bruchas, M. R., & McGehee, D. S. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nature Communications*, 9(1), 2710. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04654-2>
- Wonnacott, S., Kaiser, S., Mogg, A., Soliakov, L., & Jones, I. W. (2000). Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *European Journal of Pharmacology*, 393(1-3), 51-58. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00005-4)
- Wooltorton, J. R. A., Pidoplichko, V. I., Broide, R. S., & Dani, J. A. (2003). Differential Desensitization and Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Midbrain Dopamine Areas. *The Journal of Neuroscience*, 23(8), 3176-3185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03176.2003>
- World Health Organization. (2018). *Status report on alcohol consumption, harm and policy responses in 30 European countries 2019 : Data sources and methods*. World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/346060>
- World Health Organization. (2018). *WHO report on cancer : Setting priorities, investing wisely and providing care for all*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>

- Wouda, J. A., Riga, D., De Vries, W., Stegeman, M., van Mourik, Y., Schetters, D., Schoffelmeer, A. N. M., Pattij, T., & De Vries, T. J. (2011). Varenicline attenuates cue-induced relapse to alcohol, but not nicotine seeking, while reducing inhibitory response control. *Psychopharmacology*, *216*(2), 267-277. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2213-8>
- Wu, P.-C., Fann, M.-J., & Kao, L.-S. (2010). Characterization of Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, *112*(5), 1210-1222. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06533.x>
- Wyss, J. M., Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1979). A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, *4*(4), 463-476. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90124-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90124-6)
- Xanthos, D. N., Beiersdorf, J. W., Thrun, A., Ianosi, B., Orr-Urtreger, A., Huck, S., & Scholze, P. (2015). Role of  $\alpha 5$ -containing nicotinic receptors in neuropathic pain and response to nicotine. *Neuropharmacology*, *95*, 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.012>
- Xiao, C., Zhou, C., Jiang, J., & Yin, C. (2020). Neural circuits and nicotinic acetylcholine receptors mediate the cholinergic regulation of midbrain dopaminergic neurons and nicotine dependence. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0299-4>
- Xu, C., Sun, Y., Cai, X., You, T., Zhao, H., Li, Y., & Zhao, H. (2018). Medial Habenula-Interpeduncular Nucleus Circuit Contributes to Anhedonia-Like Behavior in a Rat Model of Depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*, 238. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00238>
- Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., & Nakanishi, S. (2013). Distinct Roles of Segregated Transmission of the Septo-Habenular Pathway in Anxiety and Fear. *Neuron*, *78*(3), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.035>
- Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Li, X., Ng, T. H., & Morales, M. (2011). Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *Journal of Neuroscience*, *31*(23), 8476-8490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011>
- Yang, K., Hu, J., Lucero, L., Liu, Q., Zheng, C., Zhen, X., Jin, G., Lukas, R. J., & Wu, J. (2009). Distinctive nicotinic acetylcholine receptor functional phenotypes of rat ventral tegmental area



- dopaminergic neurons : Nicotinic receptor subtypes in VTA dopaminergic neurons. *The Journal of Physiology*, 587(2), 345-361. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.162743>
- Yang, Y., Wang, H., Hu, J., & Hu, H. (2018). Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.024>
- Yang, Y., & Wang, J.-Z. (2017). From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 86. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00086>
- Yazdi, K., Fuchs-Leitner, I., Rosenleitner, J., & Gerstgrasser, N. W. (2020). Impact of the COVID-19 Pandemic on Patients With Alcohol Use Disorder and Associated Risk Factors for Relapse. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 620612. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.620612>
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., & Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*, 282, 23-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.010>
- Yoneyama, N., Crabbe, J. C., Ford, M. M., Murillo, A., & Finn, D. A. (2008). Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains. *Alcohol*, 42(3), 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.12.006>
- Yoo, H., Yang, S. H., Kim, J. Y., Yang, E., Park, H. S., Lee, S. J., Rhyu, I. J., Turecki, G., Lee, H. W., & Kim, H. (2021). Down-regulation of habenular calcium-dependent secretion activator 2 induces despair-like behavior. *Scientific Reports*, 11(1), 3700. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83310-0>
- Yorgason, J. T., Ferris, M. J., Steffensen, S. C., & Jones, S. R. (2014). Frequency-Dependent Effects of Ethanol on Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(2), 438-447. <https://doi.org/10.1111/acer.12287>
- York, J. L., & Hirsch, J. A. (1995). Drinking Patterns and Health Status in Smoking and Nonsmoking Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19(3), 666-673. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1995.tb01565.x>
- Zhang, C., Liu, X., Zhou, P., Zhang, J., He, W., & Yuan, T.-F. (2018). Cholinergic tone in ventral tegmental area : Functional organization and behavioral implications. *Neurochemistry International*, 114, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.003>

- Zhang, J., Tan, L., Ren, Y., Liang, J., Lin, R., Feng, Q., Zhou, J., Hu, F., Ren, J., Wei, C., Yu, T., Zhuang, Y., Bettler, B., Wang, F., & Luo, M. (2016). Presynaptic Excitation via GABA B Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. *Cell*, *166*(3), 716-728. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.026>
- Zhang, Z., Liu, Q., Wen, P., Zhang, J., Rao, X., Zhou, Z., Zhang, H., He, X., Li, J., Zhou, Z., Xu, X., Zhang, X., Luo, R., Lv, G., Li, H., Cao, P., Wang, L., & Xu, F. (2017). Activation of the dopaminergic pathway from VTA to the medial olfactory tubercle generates odor-preference and reward. *ELife*, *6*, e25423. <https://doi.org/10.7554/eLife.25423>
- Zhao-Shea, R., DeGroot, S. R., Liu, L., Vallaster, M., Pang, X., Su, Q., Gao, G., Rando, O. J., Martin, G. E., George, O., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2015). Increased CRF signalling in a ventral tegmental area-interpeduncular nucleus-medial habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. *Nature Communications*, *6*(1), 6770. <https://doi.org/10.1038/ncomms7770>
- Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2013). Activation of GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus Triggers Physical Nicotine Withdrawal Symptoms. *Current Biology*, *23*(23), 2327-2335. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.041>
- 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., & Tapper, A. R. (2011a). Nicotine-Mediated Activation of Dopaminergic Neurons in Distinct Regions of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacology*, *36*(5), 1021-1032. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.240>
- 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., & Tapper, A. R. (2011b). *Neuropsychopharmacology*, *36*(5), 1021-1032. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.240>
- Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., & Gotti, C. (2002). Identification of the Nicotinic Receptor Subtypes Expressed on Dopaminergic Terminals in the Rat Striatum. *The Journal of Neuroscience*, *22*(20), 8785-8789. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-08785.2002>

Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Neuropharmacology*, *16*(4), 338-349.

<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>

Zuo, Y., Kuryatov, A., Lindstrom, J. M., Yeh, J. Z., & Narahashi, T. (2002). Alcohol Modulation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Is ? ? Subunit Dependent: *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, *26*(6), 779-784. <https://doi.org/10.1097/00000374-200206000-00006>

Zuo, Y., Nagata, K., Yeh, J. Z., & Narahashi, T. (2004). Single-Channel Analyses of Ethanol Modulation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *28*(5), 688-696. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000125349.99823.8A>