



HAL
open science

Etude de l'implication du système dopaminergique nigrostrié dans les comportements motivés et l'alcoolodépendance

Raphaël Goutaudier

► **To cite this version:**

Raphaël Goutaudier. Etude de l'implication du système dopaminergique nigrostrié dans les comportements motivés et l'alcoolodépendance. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV004 . tel-03675248

HAL Id: tel-03675248

<https://theses.hal.science/tel-03675248>

Submitted on 23 May 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Raphaël GOUTAUDIER

Thèse dirigée par **SEBASTIEN CARNICELLA**

préparée au sein du **Laboratoire Grenoble Institut des Neurosciences**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de l'implication du système dopaminergique nigrostrié dans les comportements motivés et l'alcoolodépendance

Investigation of the implication of the nigrostriatal dopaminergic system in motivated behaviors and alcohol used disorder

Thèse soutenue publiquement le **19 janvier 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Sébastien CARNICELLA

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes, Directeur de thèse

Monsieur David BELIN

PROFESSEUR, University of Cambridge, Rapporteur

Madame Véronique COIZET

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes, Examinatrice

Monsieur Maurice DEMATTEIS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU Grenoble Alpes, Président du jury

Madame Shauna PARKES

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Aquitaine, Rapporteur

Monsieur Mickael NAASSILA

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Picardie, Examineur



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier la **Dr. Shauna Parkes** et le **Pr. David Belin** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. J'espère que ce cadeau de Noël sera à la bonne taille, ni trop grand, ni trop petit, et je vous remercie d'avoir pris le temps d'évaluer ce manuscrit.

Je remercie également le **Pr. Mickael Naassila** et la **Dr. Véronique Coizet** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à mon jury de thèse. Merci également au Pr. Nassilla de m'avoir donné l'opportunité de partager mes résultats de thèse, pour la première fois sous la forme d'une présentation orale, lors du congrès international de Timisoara. Merci Véronique pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ma thèse, de ma formation en électrophysiologie aux CSI, en passant par cette petite bière partagée à Nice, je suis très heureux d'avoir conservé ton œil extérieur et bienveillant durant toutes ces années.

Enfin, je tiens à remercier le **Pr. Maurice Dematteis** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci également pour l'ensemble des échanges scientifiques et non scientifiques que nous avons pu avoir dans le cadre de ce doctorat. La distance entre la recherche préclinique et la clinique est souvent pointée du doigt, pourtant, nos discussions m'ont permis de prendre du recul sur les travaux que je réalisais et de saisir pleinement la complexité de la pathologie à laquelle j'ai dédié ma thèse.

Je tiens également à remercier les **Dr. Elodie Fino**, **Dr. Jérôme Jeanblanc** et **Dr. Emmanuel Valjent** pour leur participation à mes comités de suivi de thèse. Vos conseils auront été précieux et auront grandement contribué à améliorer la qualité de mes expériences.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble de l'équipe « Physiopathologie de la motivation », a.k.a. l'équipe 18, pour tout ce que vous m'avez apporté durant ces 5 années passées à vos côtés.

J'aimerais remercier mon encadrant de M1, M2, directeur de thèse **Sebastien Carnicella**. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe 18, il y a quelques années déjà, et de m'avoir accordé ta confiance pour réaliser le projet que tu avais dans la tête depuis tant d'années. Je réalise aujourd'hui la chance que j'ai eu de tomber sur le seul chef d'équipe qui connaît la Scred Connexion, qui aime le rap 30 ans d'âge et qui manip encore pour ses étudiants même si cela te fait faire le « grand-écart ». Je réalise également la chance que j'ai

eu de t'avoir eu comme encadrant, toi qui as toujours été présent pour préparer les oraux, corriger les articles ou ce manuscrit, discuter science, ou répondre à mes questions quand j'en avais besoin. On pense souvent que l'herbe est plus verte ailleurs, mais quand je regarde autour de moi, je sais la chance que j'ai eu de t'avoir comme mentor. Luke Skywalker avait Maître Yoda, moi j'ai Sebastien Carnicella et même si « tout vert, tu n'es pas », force est de constater que « la même capillarité, tu as », la sagesse d'un maître Jedi vient peut-être de là après tout ?

Sabrina, merci pour ta gentillesse au quotidien, tes conseils lors des réunions d'équipes, mais également pour ton regard critique sur la rédaction de mon premier article scientifique. Merci également de m'avoir fait découvrir plein de légumes, graines et autres aliments normalement réservés aux poules et aux oiseaux. Je sais que ces derniers temps ont été un peu compliqués du côté des financements, mais j'espère que tu réussiras à rebondir et je te souhaite bonne chance pour la suite de tes projets de recherche !

Merci **Carole** pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement et humainement. Cette thèse aura été parsemée d'embûches, de saucisses et de numéro de cirques, mais tu auras toujours su veiller sur moi. Merci pour toutes les attentions, les chocolats, les bonbons, les cadeaux. Encore désolé d'avoir travaillé la PFA dans toutes ces textures. Et même si tu ne m'aimais pas au début, j'espère que tu auras appris à m'apprécier avec les années. De mon côté, je sais que cette thèse aura eu son lot de moments difficiles, mais elle aura également eu son lot de souvenirs mémorables et d'éclats de rire. Bon ok, ce n'était pas souvent en lien avec la science, mais il n'y a pas que ça qui compte dans la vie, le kayak, les escape game et les restau', c'est quand même autre chose que les manips !

Merci à **Thibault**, 1^{er} des trois mousquetaires à avoir décroché le précieux sésame. De mon entrée en master jusqu'à ton départ l'année dernière, tu auras représenté pour moi un modèle de rigueur et de travail dont j'ai largement essayé de m'inspirer, même si je reconnais que la rigueur n'a jamais été mon fort. Merci également pour tous ces voyages culinaires, de l'Orient à l'Asie, en passant par l'Amérique latine, qui m'auront permis de découvrir les meilleurs restaurants de Grenoble, et pour cette énergie que tu as mis afin que je fasse du sport avec vous. J'ai souvent souhaité rester en retrait lors de nos sorties running, je t'avoue aujourd'hui que ce n'était pas une question de rythme, mais plutôt de style (mi-sans abris, mi-

professeur d'escalade) que tu avais quand tu courrais. Et désolé de t'avoir mis une raclée au sprint, mais après tout, quand on est baraqué comme The Rock, on peut faire du pecto-boom, mais c'est plus difficile de déplacer ses gros muscles... J'ai déjà monopolisé une bonne place dans ton livre de thèse alors je ne m'étendrai pas plus longtemps. Simplement, vous m'avez accueilli à bras ouvert avec David et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez représenté et fait pour moi.

Merci à **David**, 2^{ème} mousquetaire et sénior de la bande, d'avoir partagé cette aventure, aussi attrayante que difficile, avec moi. Durant cette thèse, je pense avoir passé plus de temps avec toi (et Timmy) qu'avec n'importe quelle personne sur cette planète. Je n'ai pourtant pas un seul souvenir d'une brouille ou d'une engueulade, même quand je t'éclatais à clash ou que tu tentais de m'escroquer pour le café... Merci pour tous ces moments mémorables que nous avons vécus ensemble au laboratoire et en dehors. Au laboratoire, tu m'as apporté une aide considérable et tu m'as suivi dans les manip les plus farfelues : prise de sang nocturne, montage de lames improvisé, pesée interminable des bouteilles d'alcool... En dehors, nous avons partagé un nombre incalculable de soccers, de soirées, de week-ends, de barbecues bien arrosés (même si je dois encore m'excuser pour toi quand je vais au chinois...). Alors merci, merci pour tout mon ami. Je te souhaite de finir le plus rapidement possible ta thèse et de me rejoindre du côté helvète, là-bas, nul doute que nous pourrions ajouter quelques lignes au livre de notre amitié.

Magali ? Magali ? Magali, qu'est-ce que tu fais ? Je pense qu'il n'existe pas deux personnes comme toi et j'aimerais te remercier pour la gaîté que tu as apporté au quotidien, même quand je n'en pouvais plus de t'entendre crier dans mes oreilles. Tes histoires plus farfelues les unes que les autres, tes ragots, les choses qu'on aurait préféré ne jamais entendre, ont largement contribué à animer nos repas du midi. Tu es intrusive et complètement fêlée mais, s'il te plait, ne change jamais. J'espère qu'avec Steph, vous aurez plein de paillettes dans la ... vie !

Enfin, je remercie le reste de l'équipe 18 avec qui j'ai interagi durant ma thèse, les personnes qui ont rejoint le laboratoire plus récemment : **Colin, Marga, Fred** et ceux qui l'ont quitté : **Fiona, Yvan, Robin, Nathalie**. Colin, merci pour ton aide et ton soutien précieux lors de la semaine de microdialyse, semaine que je considère par ailleurs comme la pire semaine

de ma thèse. Merci également d'avoir relu ce manuscrit et d'avoir proposé plein de suggestions visant à l'améliorer. Marga et Nathalie, merci pour votre support administratif et votre aide immédiate lorsque j'avais besoin de vous. Marga, promis, le jour de ma soutenance je n'aurai pas de survêt'. Fred, merci de m'avoir formé au génotypage et d'avoir tenté de faire des expériences de western blot sur mes échantillons, j'espère que tu réussiras à t'épanouir dans l'équipe où ta route te mènera. Fiona, j'imagine que la retraite, c'est le pied ! J'espère que tu en profites pleinement en tout cas même si le COVID ne doit pas t'aider à voyager et je te remercie énormément pour ton aide précieuse, scientifique et linguistique, que tu m'as apporté durant cette thèse. Enfin, une petite dédicace à Yvan, merci pour ton aide, que ce soit lors des entraînements pour décrocher la bourse doctorale ou pour ta relecture critique de mon premier article. Et heureusement que ce snap n'est jamais arrivé...

Mes remerciements vont également à **Camille, Robin et Aurélie**, compères de thèse et par la même occasion de galère !

Camille, même si l'étage qui nous sépare nous a pas mal éloigné, je n'oublie pas l'entraide et la compétition que nous avons su insuffler à notre année de master décisive pour le doctorat, ni les nombreux délires que nous avons eu à ton appart, au 4^{ème} ou au V&B.

Robin, tu es pour moi un modèle d'abnégation, tu as su continuer là où beaucoup auraient, ou ont, arrêté. Mon bézot, tu arrives au bout du tunnel, alors accroche-toi et tu obtiendras ton totem d'immunité. D'ailleurs, tu n'as pas autre chose à faire que regarder ces remerciements ?

Aurélie, merci pour toutes ces barres de rires, que ce soit au Coca-Time, autour d'une bière ou juste au bureau. Je sais que ce doctorat aura souvent été un ascenseur émotionnel pour toi, mais je sais également qu'il t'aura fait grandir et qu'il nous aura permis de nous serrer les coudes un peu plus chaque jour !

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, avec qui j'ai collaboré durant cette thèse, joué le jeudi au soccer, ou simplement qui m'ont permis de mener ce projet à bien. Je remercie également **Denis Guicherd** et **Benoit Chovelon** de l'Institut de biologie et pathologie de Grenoble, avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant cette thèse, et **Anne Briançon-Marjollet** de l'équipe *HP2* qui m'a accordé sa confiance pour diriger mes premiers TPs, TDs et CMs en tant qu'enseignant.

Je remercie également les personnes qui m'ont supporté durant ce long chemin, que ce soit les amis **Irréductibles**, les amis « bras-cassés » du **Racing Football Club** ou les amis d'**enfance**. Vous n'avez sûrement pas compris grand-chose à mes recherches, à part « que je fais boire des rats » ni même pourquoi « on cherche », mais les moments passés ensemble ont largement contribué à la réussite de cette thèse.

Un immense merci à ma famille, petite par le nombre, mais inégalable par ses qualités, qui aura supporté mon humeur inversement proportionnelle à mon état de stress. **Maman**, je suis désolé d'avoir été aussi chiant, mais je te promets que t'entendre chanter Francis Cabrel quand tu rédiges, c'est difficile. Merci infiniment pour tout ce que tu as fait et ce que tu fais encore aujourd'hui, avec **Salva**, au quotidien. **Mamie, Papi**, vous avez également grandement contribué à ce travail et à l'homme que je suis devenu aujourd'hui. Alors merci pour l'amour que vous me donnez... (et aussi pour toutes les boites très très délicieuses). Une pensée également pour mes **taties** et mes **tontons**, merci pour votre soutien et votre gentillesse (vos boites aussi sont très très délicieuses...). Un petit mot finalement pour la **belle-famille** et le poulet/frites du dimanche midi, merci de l'accueil que vous m'avez réservé et pour toutes ces belles discussions endiablées.

Enfin, merci à toi « ma » **Carole**, a.k.a. Poussin, Princesse, le Guénéral, le T-Rex, de m'avoir supporté depuis maintenant 5 ans malgré l'absence, la distance, les difficultés et le stress que ce travail implique. Merci pour ton soutien indéfectible, de la préparation au concours de l'EDCSV jusqu'à la préparation de ce manuscrit, sans oublier les week-ends manip'. Je reconnais avoir réalisé cette thèse un petit peu car tu m'avais déconseillé de le faire ! Mais j'en suis fier, alors j'espère que toi aussi. Merci également pour toute la joie et le bonheur que tu m'as apporté, même si je sais que tu aurais préféré que ce ne soit pas si long. En tout cas, prépare-toi, car je débarque bientôt avec TOUTES mes affaires (et oui, il va falloir faire de la place si tu ne veux pas qu'on vire un chat !). Fini les départs le dimanche soir ou le lundi matin aux aurores, fini les appels le soir avant de se coucher, les visios koh-lanta, on va pouvoir profiter pleinement de la vie à deux. Alors maintenant, on accélère Moltès, on accélère !

« Les vrais fous se font pas intener,
ils rêvent les yeux ouverts, poings fermés. »

Oxmo Puccino

SOMMAIRE

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
ABRÉVIATIONS PRINCIPALES	5
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13
ÉTAT DE L'ART	21
Partie 1 : L'alcoolodépendance	22
I. Cadre clinique.....	22
A. Données socio-épidémiologiques.....	22
B. Dépendance et addiction, une histoire de sémantique	23
C. L'alcoolodépendance, différentes phases et différents symptômes.....	26
1. La phase d'intoxication	26
2. La phase de sevrage.....	29
3. La phase de rechute.....	31
II. Cibles neuropharmacologiques.....	34
A. Cibles neuropharmacologiques directes	34
1. Le récepteur GABA-A.....	34
2. Le récepteur NMDA	35
3. Autres cibles	37
B. Le système DA, une cible commune aux drogues d'abus.....	38
Partie 2 : La dopamine, un acteur central de l'apprentissage associatif et des motivations	45
I. Neurobiologie du système DA.....	45
A. La DA au niveau du mésencéphale.....	45
B. Activités électriques des neurones DA	46
C. Efférences DA de la SNc et de l'ATV chez le rongeur.....	48
D. Vision dichotomique des voies DA mésolimbique et nigrostriée	50
II. Le striatum, de l'intention à la réalisation de l'action.....	51
A. Le NAc ou striatum « limbique »	52
B. Le striatum dorsal, entre cognition et motricité	53
C. La transmission de l'information du NAc au striatum dorsal	54
III. Rôles et fonctions du système DA.....	56
A. DA, apprentissage associatif et renforcement de l'action.....	56
B. La DA, entre motivation et plaisir.....	60
C. Le signal DA tonique, motivation générale et maintien de l'effort	61
D. Des motivations plutôt qu'une motivation	62
IV. Le modèle Acteur/Critique	63
Partie 3 : L'addiction, un trouble de l'apprentissage associatif et des motivations	67
I. Le NAc, une porte d'entrée vers l'addiction.....	67
A. Renforcement positif et dysfonction du RPE.....	67
B. Sensibilisation et motivation incitatrice, la théorie de la sensibilisation incitatrice.....	71
II. La théorie de l'allostase dans l'addiction	75
A. De l'hyperdopaminergie phasique à l'hypodopaminergie tonique.....	76
B. Homéostasie, processus-opposants et théorie de l'allostase	78
III. Le striatum dorsal, de l'usage récréatif à l'usage compulsif	83
A. L'usage récréatif, un comportement dirigé par un but ?	83
B. L'usage abusif, un comportement habituel ?	84
C. L'addiction, une habitude poussée à l'extrême ?	88
IV. Une théorie intégrative du rôle de la DA dans l'addiction	93
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	97

APPROCHES EXPÉRIMENTALES PRINCIPALES	101
RÉSULTATS.....	109
Commentaire général - DREADDs: The Power of the Lock, the Weakness of the Key. Favoring the Pursuit of Specific Conditions Rather than Specific Ligands.	111
Article I - Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats.....	119
Article II - Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use	133
DISCUSSION	186
I. Synthèse des résultats.....	187
II. Limites des approches expérimentales utilisées	187
A. Limites du modèle utilisé.....	187
B. Limites de l'approche de chémozénotique	192
1. Une hypodopaminergie sélective et transitoire	192
2. Sélectivité et spécificité	193
III. Une progression de l'hypodopaminergie de la voie mésolimbique à la voie nigrostriée ?.....	195
A. Origine de l'hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée.....	195
B. Implication de la voie DA nigrostriée dans les processus motivationnels et émotionnels.....	197
C. Implication de la voie DA nigrostriée dans l'usage compulsif d'alcool.....	198
D. L'hypodopaminergie de la voie mésolimbique est-elle réversible ?	200
IV. Perspectives	201
A. Perspectives mécanistiques.....	201
B. Perspectives thérapeutiques	202
CONCLUSION	204
ANNEXE	208
Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.	209
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	220

ABRÉVIATIONS PRINCIPALES

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

AAV : Virus adéno-associé

Ac : Commissure antérieure

ACC : Cortex cingulaire antérieur

AMPA : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

ATV : Aire tegmentale ventrale

BK : Canaux [K⁺] Ca²⁺-dépendants

C21 : Compound 21

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CIM-10 : Classification statistique Internationale des Maladies et des problèmes de santé

CNO : Clozapine-N-Oxyde

Cre : Cre recombinase

CRF : Système de libération des corticotrophines

Da : Dalton

DA : Dopamine

DLS : Striatum dorsolatéral

DMS : Striatum Dorsomédian

DREADDs : Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs – Récepteurs conçus pour être activés exclusivement par des ligands synthétiques

DS : Striatum dorsal

DSM-5 : Diagnostic and statistical manual of mental disorders – Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux

EtOH : Éthanol

FR : Fixed ratio – Ratio fixe

FI : Fixed interval – Intervalle fixe

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GIRK : Canaux potassiques rectifiant activés par les protéines G

glyR : Récepteur ionotropique à la glycine

HCN : Canaux activés par l'hyperpolarisation, modulés par les nucléotides cycliques et non sélectifs aux cations

IRM : Imagerie par résonance magnétique

JC : Jésus Christ

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NAc : Noyau accumbens

NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique

OFDT : Observatoire français des drogues et des toxicomanies

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PR : Progressive ratio – Ratio progressif

RDoC : Research domain criteria

RPE : Reward prediction error – Erreur de prédiction de la récompense

SNc : Substance noire compacte

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SNr : Substance noire réticulée

TEP : Tomographie par émission de positons

TH : Tyrosine hydroxylase

PFC : Cortex préfrontal

VS : Striatum Ventral

WHO : World Health Organization – Organisation Mondiale de la Santé

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été financé par l'École doctorale Chimie et Sciences du Vivant de Grenoble et l'ANR DOPALCOMP (ANR-16-CE16-0002).

Les résultats obtenus et la synthèse de la littérature réalisée au cours de ma thèse ont fait l'objet de deux publications scientifiques. Deux autres publications restent à venir :

- **DREADDs: The Power of the Lock, the Weakness of the Key. Favoring the Pursuit of Specific Conditions Rather than Specific Ligands.**

Goutaudier Raphaël, Carcenac Carole, Coizet Véronique, Carnicella Sébastien (eNeuro, 2019)

- **Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats.**

Goutaudier Raphaël, Coizet Véronique, Carcenac Carole, Carnicella Sébastien (PloS One, 2020)

- **Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use.**

Goutaudier Raphaël, Mallet David, Bartolomucci Magali, Guicherd Denis, Carcenac Carole, Vossier Frédérique, Dufourd Thibault, Boulet Sabrina, Deransart Colin, Chevolon Benoit, Carnicella Sébastien (Molecular Psychiatry, under revision)

- **Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.**

Goutaudier Raphaël*, Mallet David*, Bartolomucci Magali, Fauvelle Florence, Boulet Sabrina, Carnicella Sébastien (in preparation). *co-first authors

Autre article auquel j'ai participé :

- **Re-routing metabolism with the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC-0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease**

Mallet David, **Goutaudier Raphaël**, Barbier Emmanuel, Carnicella Sébastien, Colca Jerry, Fauvelle Florence*, Boulet Sabrina* (Molecular Neurobiology, under consideration). *co-senior authors

INTRODUCTION

Consommé depuis l'aire néolithique (-4000 an avant JC), l'alcool est une drogue licite qui a accompagné l'homme au cours des différentes époques. Cette substance psychoactive est aujourd'hui au cœur des sociétés et nombreux sont les débats qui l'accompagnent. D'une part, l'alcool représente un vecteur majeur d'intégration, un symbole de festivités, de convivialités et de partages, « *boire pour s'amuser* ». Revers de la médaille, l'alcool représente également un problème de santé publique majeur aux conséquences désastreuses tant au niveau sociétal qu'individuel, symbole d'échec et d'isolement, « *boire pour oublier* ». Et même si une large partie de la population conserve une consommation sporadique et récréative de la substance, une proportion non-négligeable d'individus développe une consommation abusive en augmentant la fréquence de la consommation et les quantités d'alcool consommées à chaque occurrence (Piazza and Deroche-Gamonet, 2016). Cette transition de l'usage récréatif à l'usage abusif représente la première étape dans le développement du trouble de l'usage de l'alcool. À cette étape, des problèmes liés à la consommation apparaissent, mais l'individu conserve le contrôle sur son usage. Si les conséquences majeures de cette consommation sont le plus souvent indirect (risques de cancers, comorbidité psychiatrique, problème cardiovasculaire), cette étape se situe également aux prémices d'une pathologie beaucoup plus sévère : l'alcoolodépendance.

Plus communément appelée addiction à l'alcool ou alcoolisme, l'alcoolodépendance affecte 3.3% de la population française, 3.7% de la population européenne et 2.6% de la population mondiale (WHO, 2018). Cette pathologie chronique se caractérise par la recherche et la consommation compulsives¹ d'alcool, la dégradation profonde de l'état émotionnel et motivationnel en l'absence d'alcool et finalement par des phases de rechute régulière. Initialement utilisé par plaisir, l'alcool devient progressivement une condition *sine qua non* au bien-être de l'individu qui investit l'ensemble de son énergie (motivationnelle, cognitive, physique) pour se procurer le produit et le consommer au détriment de toutes autres activités récréatives ou sociales et des problèmes que cela engendre pour lui, mais également pour son entourage (Dematteis and Pennel, 2016; Piazza and Deroche-Gamonet, 2016).

Mais alors, si l'individu prend conscience des problèmes causés par son usage d'alcool, pourquoi ne met-il pas, simplement, un terme à sa consommation ? En effet, l'abstinence est

¹ La compulsivité se définissant comme la persistance d'une action malgré la connaissance des conséquences négatives qui lui sont associées.

souvent la première réponse de l'individu lorsque des conséquences plus sévères apparaissent. Cependant, avec près de 80% de rechute au cours de la première année en l'absence d'un traitement, ces tentatives sont le plus souvent vaines (Moos and Moos, 2006). L'addiction n'est donc pas un choix, mais bien une condition profonde dans laquelle l'individu semble emprisonné (Perry and Lawrence, 2017).

L'alcool partage avec l'ensemble des autres drogues d'abus licites et illicites, la capacité d'induire des modifications profondes du fonctionnement psychobiologique. Les drogues détournent notamment plusieurs circuits neuronaux impliqués dans l'apprentissage, la récompense, la motivation, le stress ou encore les émotions (Koob and Volkow, 2016). Et si ces altérations sont aujourd'hui largement décrites dans la littérature (Naassila, 2016), les mécanismes neurobiologiques sous-tendant leurs apparitions restent encore aujourd'hui peu compris. La compulsivité, par exemple, est considérée comme une dimension fondamentale de la pathologie (Yücel et al., 2019). Pourtant les mécanismes à l'origine de son développement et de son expression ne sont pas encore clairement établis (Lüscher et al., 2020). Ce manque de compréhension se traduit également au niveau thérapeutique avec 5 traitements reconnus pour la prise en charge de cette pathologie, mais dont l'efficacité reste relative. En effet, si ces traitements permettent de soulager une partie des symptômes éprouvés par le patient, le risque de rechute reste tout de même élevé avec une prévalence estimée entre 40% et 60% pendant la première année de sevrage (Fleury et al., 2016; Moos and Moos, 2006).

Afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de l'alcoolodépendance, et plus généralement des addictions aux drogues d'abus, différents modèles animaux ont été développés. Du rongeur au primate, en passant par l'abeille ou le pigeon, ces modèles ont permis de mieux comprendre l'effet des drogues sur le fonctionnement cérébral et comportemental en reproduisant des caractéristiques cliniques précises de l'addiction (Kuhn et al., 2019; Lovinger and Alvarez, 2017; Vanderschuren and Ahmed, 2021). Par exemple, les rats sont capables de développer de façon spontanée et volontaire, une consommation excessive d'alcool permettant alors l'étude des neuro-adaptations à l'origine de l'escalade de la consommation d'alcool retrouvée dans l'usage abusif (Carnicella et al., 2014b; Jeanblanc et al., 2019). Ces animaux peuvent également s'auto-administrer la substance à l'aide d'un

operandum², ce qui permet d'étudier les processus motivationnels impliqués dans la recherche et la consommation de l'alcool (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Enfin, ces animaux sont capables de développer des comportements s'apparentant à de la compulsivité pour la drogue, en continuant de rechercher et de consommer de l'alcool même si une conséquence négative et désagréable, mais non-douloureuse, lui est associée (Everitt et al., 2018; Vanderschuren and Ahmed, 2021). Finalement, bien que les modèles animaux soient souvent qualifiés de trop simplistes ou de trop réducteurs, ils n'en demeurent pas moins à l'origine de découvertes majeures dans le domaine des addictions. Au niveau neurobiologique, par exemple, l'alcool possède de nombreuses cibles neuropharmacologiques ce qui ne facilite guère la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'alcoolodépendance. Les travaux réalisés sur le rongeur, confirmés par la suite en clinique, ont cependant démontré au début des années 80, que l'ensemble des drogues d'abus possédaient une cible d'action commune, le système dopaminergique (Boileau et al., 2003; di Chiara and Imperato, 1988).

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur qui agit comme un modulateur clé de plusieurs fonctions comportementales telles que les émotions, le mouvement, les processus de motivations et d'apprentissages (Nieoullon and Coquerel, 2003). Au sein du système DA, la consommation aiguë de drogue augmente transitoirement les niveaux de DA (di Chiara and Imperato, 1988), tandis qu'une consommation chronique entraîne une diminution globale et plus prolongée des niveaux de DA lorsque celle-ci est interrompue (Melis et al., 2005). L'ensemble des fonctions impliquant la DA, mais également l'impact direct des drogues sur ce système, ont rapidement propulsé ce neurotransmetteur au centre de nombreuses théories de l'addiction (Bickel et al., 2018; Solinas et al., 2019). Certains auteurs ont ainsi mis l'accent sur les conséquences induites par la hausse des niveaux de DA en proposant que l'hyperréactivité du système DA à la drogue et aux stimuli qui lui sont associés étaient à l'origine des comportements addictifs (Robinson and Berridge, 1993). D'autres auteurs ont plutôt insisté sur l'importance de la diminution des niveaux de DA à l'arrêt de la consommation, en proposant que l'apparition d'un état hypodopaminergique persistant était à l'origine de l'état émotionnel et motivationnel négatif au cours du sevrage. Ces auteurs ont

² L'operandum désigne l'intermédiaire par lequel l'animal va réaliser une action pour obtenir la récompense (ex. appui sur un levier, wheel-runnig, nose-poke).

également proposé que cet état soit à l'origine de l'usage compulsif de drogue, en induisant une motivation anormale de consommer la drogue afin de soulager les symptômes du sevrage (Koob and Le Moal, 2001).

Ces théories ont principalement été développées au sein de la voie DA mésolimbique, une voie connue pour sa forte implication dans les processus motivationnels et émotionnels et également sa forte sensibilité aux drogues d'abus. Dans les phases les plus précoces de l'addiction, l'hypodopaminergie de la voie mésolimbique induite par la prise chronique de drogues a notamment été causalement impliquée dans le développement de la consommation excessive de drogue et l'apparition de certains symptômes observés au cours du sevrage (Barak et al., 2011; Radke and Gewirtz, 2012). L'implication de la voie DA mésolimbique reste cependant discutée dans les phases les plus tardives de l'addiction. Il semble, en effet, qu'une autre voie DA soit recrutée et joue un rôle important dans l'usage compulsif de drogue, la voie DA nigrostriée (Everitt and Robbins, 2013; Lüscher et al., 2020).

La voie DA nigrostriée a longtemps été cantonnée à son implication dans les processus moteurs. Au cours des 10 dernières années, différentes études ont cependant démontré qu'elle pouvait être impliquée dans les processus motivationnels et affectifs. Dans ce sens, notre équipe de recherche a montré qu'une lésion partielle de la voie DA nigrostriée, qui préserve les fonctions motrices de l'animal, induisait des déficits motivationnels, des comportements de type anxieux et dépressifs, rappelant l'ensemble des symptômes comportementaux associé à l'état émotionnel et motivationnel négatif du sevrage aux drogues (Carnicella et al., 2014a; Drui et al., 2014; Favier et al., 2014). De plus, des études réalisées chez l'individu alcoolodépendant et abstinant ont mis également en avant une réduction des niveaux de DA au sein de la principale structure de projection de la voie DA nigrostriée, le striatum dorsal (Volkow et al., 2007). Bien que les conséquences directes de cette altération n'ont pas encore été étudiées, il est important de souligner que le striatum dorsal est une structure fortement impliquée dans le développement et l'expression de la compulsivité (Everitt and Robbins, 2016, 2013; Jonkman et al., 2012a) et que des travaux récents chez les rongeurs démontrent que l'usage compulsif d'alcool dépend fortement du signal DA au sein de cette structure (Giuliano et al., 2019). Il est donc possible qu'au cours du développement de l'addiction, l'hypodopaminergie de la voie mésolimbique s'étende

progressivement à la voie nigrostriée pour participer au maintien de l'état émotionnel et motivationnel négatif et au développement de l'usage compulsif d'alcool.

C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse, dont l'objectif principal a été d'étudier, à l'aide d'un modèle rongeur et d'une approche de chimogénétique, l'implication de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée dans les déficits motivationnels et émotionnels associés au sevrage et l'usage compulsif d'alcool.

Ma thèse débutera avec un état de l'art permettant le développement des concepts fondamentaux à la compréhension de mon travail doctoral. Cet état de l'art sera décomposé en trois parties présentant successivement l'alcoolodépendance et les cibles neurobiologiques de l'alcool, le fonctionnement et les rôles du système DA dans un cadre physiologique et finalement l'implication de ce système dans les mécanismes physiopathologique sous-tendant les addictions.

À la suite de l'état de l'art, les objectifs ainsi que les approches expérimentales principales de ce projet seront détaillés. Les résultats seront ensuite présentés sous forme de deux publications scientifiques et d'un manuscrit soumis pour publication. Au cours de nos travaux nous avons notamment démontré l'implication causale d'une hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée dans les comportements compulsifs associés à l'alcool et dans les déficits motivationnels.

Enfin la discussion permettra de mettre en perspective les résultats que nous avons obtenus et de proposer de nouvelles pistes d'étude afin d'approfondir, un peu plus, les connaissances sur les dysfonctionnements de la voie DA nigrostriée impliqués dans l'alcoolodépendance.

ÉTAT DE L'ART

Partie 1 : L'alcoolodépendance

Nous débuterons ce chapitre par un état des lieux de ce problème de santé publique, puis nous caractériserons plus en détails le terme d'alcoolodépendance en abordant les différentes phases de cette pathologie. Finalement, nous étudierons les cibles pharmacologiques de l'alcool au niveau cérébral. Ce chapitre permettra de mieux comprendre les enjeux sous-jacents à ce travail doctoral.

I. Cadre clinique

A. Données socio-épidémiologiques

Avec 3 millions de décès par an (5,3% du nombre de décès total), l'alcool représente la 7ème cause de mort prématurée au niveau mondial (Griswold et al., 2018; WHO, 2018). En France, entre 40 000 et 50 000 décès sont imputables à l'alcool chaque année (7% des décès en 2015), ce qui en fait la seconde cause de mortalité prématurée juste après le tabac (Bonaldi and Hill, 2019; OFDT, 2017). Les décès liés à l'alcool regroupent majoritairement des cancers, des maladies cardio-vasculaires et des maladies digestives (principalement des cirrhoses). Au niveau économique, un rapport de 2015 du professeur P. Kopp pour l'observatoire français des drogues et des toxicomanies, a évalué le « coût social » de l'alcool, proche des 120 milliards d'euros (Kopp, 2015). Malgré la lutte contre ce problème de santé publique, le rapport du Baromètre de Santé publique France de 2017 estime que 10% de la population a une consommation quotidienne d'alcool, mais également que 10% de la population est responsable de la moitié de la quantité totale d'alcool consommée par an (Richard et al., 2019). Ces consommations excessives et chroniques d'alcool, définies par les spécialistes du domaine comme "des troubles de l'usage d'alcool", représentent des risques majeurs pour l'individu de développer une addiction à ce psychotrope. À ce titre, si le nombre d'hospitalisations pour des intoxications aiguës ou des maladies graves associées à l'alcool a légèrement diminué ces 10 dernières années, le nombre d'hospitalisations pour des symptômes associés à l'alcoolodépendance a augmenté de 40% au cours de cette même période (Palle, 2020).

B. Dépendance et addiction, une histoire de sémantique

Les termes de dépendance et d'addiction sont souvent utilisés de manière interchangeable dans notre société, voire également par les spécialistes de l'addictologie (Saunders, 2017; WHO, 1993). Ainsi en France, le terme d'alcoolodépendance est utilisé pour évoquer l'addiction à l'alcool. Ces termes, cependant, au sens premier, ne reflètent pas exactement le même phénomène.

La dépendance à une substance correspond, dans sa définition première, à un état pathologique dans lequel la personne ne peut pas fonctionner physiologiquement sans consommer cette substance (Malenka et al., 2009). Deux processus peuvent survenir dans le cas d'une dépendance : la tolérance et le syndrome de sevrage. La tolérance correspond au processus par lequel la consommation répétée d'un produit va induire une diminution des effets de celui-ci. L'individu doit alors augmenter les doses consommées pour retrouver les mêmes effets (Tabakoff et al., 1986). Le syndrome de sevrage, quant à lui, correspond à l'apparition de symptômes physiques et/ou psychiatriques chez un individu lorsqu'il interrompt ou réduit sa consommation du produit.

Enfin, l'addiction se définit comme une affection cérébrale chronique, récidivante, caractérisée par la recherche et la consommation compulsive d'une substance, malgré la connaissance de ses conséquences nocives et la rechute (Koob et al., 2019). Elle représente, pour les spécialistes du domaine, la forme la plus sévère d'un trouble de l'usage d'une substance (DSM-5, American Psychiatric Association, 2013).

La différence entre dépendance et addiction peut être mieux perçue avec l'exemple de la caféine. Cette substance peut induire une dépendance, avec l'apparition des phénomènes de tolérance et du syndrome de sevrage (DSM-5, American Psychiatric Association, 2013). Cependant, une personne consommant régulièrement du café gardera le contrôle sur sa consommation, sera capable de gérer les symptômes de sevrages qui apparaîtront à l'arrêt de la consommation, et ne développera pas de prise compulsive de caféine. La caféine est donc capable d'induire des altérations physiques et psychiques suite à sa consommation régulière, mais, n'entre pas dans le cadre d'une addiction car elle n'induit pas de consommation compulsive. Finalement, la dépendance, au sens strict du terme, peut être abordée comme une sous-dimension de l'addiction. Ainsi, la dépendance et ses phénomènes associés, comme le sevrage, pourraient contribuer au développement de l'addiction mais, ne peuvent, à elles

seules, l'expliquer. Dans les études précliniques, le terme « dépendant » est généralement employé pour définir des animaux présentant une consommation excessive de drogue et/ou des symptômes de sevrage. Le terme « addict » est quant à lui réservé pour définir des animaux présentant une recherche et/ou une consommation compulsive de drogue.

Afin d'évaluer la sévérité des troubles de l'usage d'une substance, les cliniciens ont recours à deux classifications psychiatriques : le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5, American Psychiatric Association, 2013) et la Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé³ (CIM-10, WHO, 1993). Bien que ces deux classifications présentent des différences dans le diagnostic de certaines maladies, il existe un consensus assez clair sur les critères permettant d'évaluer un trouble de l'usage d'une substance (Figure 1). Ainsi, même si le nombre total de critères diffère, trois grands groupes sont observés : les critères de dépendance (tolérance et syndrome de sevrage), les critères concernant la perte de contrôle sur la consommation malgré les conséquences négatives, et les critères mettant en avant l'abandon de toutes autres activités au profit de celles se rapportant à la substance. Le DSM-5 rajoute également la notion de risque et de danger associé à l'utilisation de la substance. Ces classifications évaluent la sévérité du trouble en observant le nombre de symptômes présents chez l'individu au cours des 12 derniers mois. Dans le DSM-5 par exemple, une atteinte bénigne correspond à la présence de 2 ou 3 critères. Elle devient modérée par la présence de 4 à 5 critères et considérée comme sévère au-delà de 7.

En comparaison de la CIM et du DSM, une approche dimensionnelle nommée Research Domain Criteria (RDoC) a plus récemment été développée (Cuthbert, 2014; Insel et al., 2010). Cette approche n'a pas pour vocation de remplacer les classifications existantes de l'addiction mais de permettre de créer un lien entre les critères diagnostiques, qui se basent uniquement sur les symptômes observés, et les critères phénotypiques, qui se basent sur l'état neuro-psycho-biologique de l'individu toxicomane (Yücel et al., 2019). La meilleure caractérisation de cet état permettrait d'adopter une approche personnalisée pour l'individu, avec l'objectif

³ La CIM-11 remplacera prochainement la CIM-10 et entrera en vigueur en 2022. La CIM-11 fusionne les 6 critères de la CIM-10 en 3 critères centraux. Le diagnostic requiert la présence de 2 critères aux minimums, présent chez l'individu au même moment ou de façon répétée sur une période de 12 mois ou de façon continue sur une période d'au moins 1 mois (Saunders, 2017).

	DSM-5	CIM-10
Critères diagnostiques	Un schéma problématique de consommation de la substance conduisant à des troubles cliniques ou à une détresse, avec au moins deux des événements suivants survenus au cours d'une période de 12 mois.	Le diagnostic nécessite qu'au moins trois des manifestations suivantes aient été présentes en même temps pendant un mois, ou de façon répétée sur une période de 12 mois.
Perte de contrôle	La substance est consommée en quantité plus importante ou pendant une période plus longue que prévue.	Difficultés à contrôler l'utilisation de la substance (début ou interruption de la consommation ou niveaux d'utilisation).
	Désir ou efforts persistants mais vains pour arrêter ou contrôler l'usage de substances.	
	Il existe une envie irrésistible de consommer la substance (craving).	Un désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psychoactive.
	Utilisation de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de la substance.	Poursuite de la consommation de la substance malgré la survenue de conséquences manifestement nocives. On doit s'efforcer de préciser si le sujet était au courant, ou s'il aurait dû être au courant, de la nature et de la gravité des conséquences nocives.
	Utilisation de la substance bien que l'individu ait connaissance des problèmes psychologiques ou physiques persistant, ou récurrent, causé, ou exacerbé, par cette substance.	
Abandons des activités non associées à la drogue d'abus	Incapacité de remplir des obligations majeures au travail, à l'école ou à la maison suite à l'utilisation répétée de la substance.	Abandon progressif d'autres sources de plaisir et d'intérêt au profit de l'utilisation de la substance psychoactive, et augmentation du temps passé à se procurer la substance, la consommer, ou récupérer de ses effets.
	Abandon ou réduction des activités sociales, occupationnelles ou récréatives importantes à cause de l'utilisation de la substance.	
	Beaucoup de temps est consacré aux activités nécessaires à l'obtention de la substance, à son usage ou pour récupérer de ses effets.	
Usage à risque	Usage même lorsqu'il y a un risque physique ou un danger pour l'individu.	Pas de critère équivalent.
Dépendance pharmacologique	Il existe une tolérance, définie par (1) la consommation d'une quantité notablement plus forte de la substance pour obtenir l'effet désiré ou/et par (2) la diminution de l'effet en cas d'utilisation continue de la même quantité.	Mise en évidence d'une tolérance aux effets de la substance psychoactive : le sujet a besoin d'une quantité plus importante de la substance pour obtenir l'effet désiré.
	Le sevrage conduit à (1) l'apparition du syndrome de sevrage caractérisé à la substance ou/et à (2) la prise de la substance (ou une substance proche) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.	Syndrome de sevrage physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation d'une substance psychoactive avec la survenue d'un syndrome de sevrage caractéristique de la substance ou l'utilisation de la même substance (ou d'une substance apparentée) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.

Figure 1: Les critères d'un trouble de l'usage de l'alcool selon le DSM-5 et d'une dépendance à l'alcool selon la CIM-10.

DSM-5 : Traduit du livre « Diagnostic and statistical mental disorders, 5th edition, 2013 » de l'American Psychiatric Association. CIM-10 : Traduit de la classification internationale des maladies (CIM-10) de l'Organisation mondiale de la santé (WHO).

de prendre en charge les déficits sous-jacents à sa pathologie plutôt que les symptômes qui lui sont associés. Pour ce faire, l'approche RDoC se compose de 5 grands domaines d'études : les systèmes de valence négative (ex. la peur et l'anxiété) et de valence positive (ex. les systèmes de récompense et de motivation), les systèmes cognitifs, les systèmes liés aux processus sociaux, et les systèmes d'activation et d'homéostasie (Demazeux and Pidoux, 2015). Plus récemment, l'étude internationale « Delphi consensus » a réuni plusieurs experts de l'addiction pour définir les concepts neuropsychologiques essentiels à la pathologie (Yücel et al., 2019). Ces concepts seront mentionnés lorsqu'ils seront abordés dans le cadre de ce travail doctoral (Partie 3, p.68 ; p.71; p.85 ; p.92).

C. L'alcoolodépendance, différentes phases et différents symptômes

Trois phases majeures, ont été décrites dans le cadre de l'alcoolodépendance (Becker, 2008). Une phase initiale d'intoxication où l'individu perd le contrôle sur sa consommation d'alcool, suivie d'une phase de sevrage pendant laquelle l'individu cesse sa consommation et enfin la phase de rechute où l'individu consomme à nouveau le psychotrope.

1. La phase d'intoxication

La phase d'intoxication débute avec les prises répétées d'alcool. Au cours du développement de l'addiction, l'individu consomme des quantités de plus en plus importantes d'alcool, et ce, de façon de plus en plus régulière. L'origine et les motivations sous-jacentes à cette phase sont variables selon les individus. Les travaux de ML. Cooper et de ses collaborateurs ont permis de décrire et de modéliser différents types de consommation (Cooper, 1994; Cooper et al., 1995, 1992; Peirce et al., 1994). Certains individus utilisent l'alcool pour amplifier leur état émotionnel positif (« enhancement drinker »), alors que d'autres individus utilisent ce psychotrope sous forme d'automédication, pour corriger un état émotionnel ou physique négatif (« coping drinker »). L'alcool est donc initialement consommé pour ses effets euphorisant, anxiolytique et dépresseur retrouvés normalement à faible dose, entre 1 et 3 verres d'alcool « standard » correspondant une alcoolémie situé entre 0,1 et 0,5 g/L (Figure 2) (Dematteis and Pennel, 2018). Indépendamment de la motivation initiale sous-jacente, l'individu est amené à consommer de l'alcool à nouveau pour retrouver les effets recherchés.

MODALITÉS ET SEUILS D'ALCOOLISATION		ALCOOL (verres)	ALCOOL (g/L)	EFFETS CLINIQUES	ZONES AFFECTÉES	ACCIDENTS (risque)	ÉLIMINATION (durée, h)
alcooolisation ponctuelle importante ou épisode de forte consommation ≥ 6 verres	binge drinking extrême ≥ 14/12 verres (H/F) en une occasion	22	4,5	- décès - altération des fonctions vitales - coma calme (hypotonie, hypothermie, hypotension, mydriase bilatérale peu réactive, dépression respiratoire)	Tout l'encéphale	X80	30
		15	3,0	- perte de conscience, stupeur	tronc cérébral		20
	binge drinking ≥ 7/6 verres (H/F) en 2h ; > 0,8 g/L	10	2,0	- vomissements, "blackout" (amnésie) - jugement, prise de décision affectés - altérations +++ (discours, mémoire, attention, coordination, équilibre, temps de réaction)	cervelet	X35	13
		8	1,5	- fluctuations émotionnelles, tristesse, colère, agressivité			10
		5	1,0	- altérations ++ (discours, mémoire, attention, coordination, équilibre), possible agressivité, - nausées, somnolence - risque majoré de blessures (de soi ou des autres), comportements exagérés, désinhibition	cerveau antérieur	X10	6-7
		4	0,8	- moindre sensibilité à la douleur			5-6
seuil à risque, usage occasionnel (> 4 verres par occasion)	3	0,5	- possible somnolence - temps de réaction allongé - troubles visuels accentués	cortex cérébral	X2	3-4	
	2		- altérations + (discours, jugement, attention, mémoire, coordination, équilibre), sensation de chaleur			1-2	
seuil à risque, usage régulier (> 2 verres par jour, > 10 verres par semaine, > 5 jours par semaine)	1	0,2	- plaisir, euphorie, moindre inhibition			< 1	
usage à faible risque	0,5	0,1	- troubles visuels, relaxation, bien être				

Figure 2: Conséquences cliniques selon les niveaux et les modalités d'une consommation aiguë d'alcool.

De gauche à droite, colonne « Modalités et seuils de consommation » : les seuils à risque pour les usages réguliers et occasionnels sont identiques pour l'homme et la femme. Les épisodes de binge drinking correspondent à des alcoolisations ponctuelles importantes rapides dans un intervalle de 2 heures ; le nombre de verres indiqué pour l'homme (H) et la femme (F) correspond à la définition du NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, avec 5/4 verres (H/F) contenant 14 g d'alcool pur par verre américain, soit 70 g pour l'homme et 56 g pour la femme.

Colonne « **Alcool (verres)** » : nombre de verres correspondant à l'alcoolémie indiquée dans la colonne « Alcool (g/L) » et calculée selon la formule de Widmark pour un sujet masculin de 70 kg et un verre standard bar contenant 10 g d'alcool pur, quelle que soit la boisson alcoolisée.

Colonne « **Zones affectées** » : régions encéphaliques affectées selon l'alcoolémie indiquée dans la colonne "Alcool (g/L) ».

Colonne « **Accident (risques)** » : risque d'accident de la voie publique selon l'alcoolémie indiquée dans la colonne « Alcool (g/L) ».

Colonne « **Élimination (durée, h)** » : temps nécessaire en heure pour ramener à zéro l'alcoolémie indiquée dans la colonne « Alcool (g/L) », en utilisant une décroissance de 0,15 g/L/heure.

Dematteis and Pennel, 2018

Avec la répétition des usages et la perte de contrôle, la consommation devient chronique et les quantités consommées augmentent de façon excessive. À titre d'exemple, en 1982, un rapport clinique a décrit l'état d'une patiente présentant une alcoolémie supérieure à 15 g/L de sang (Johnson et al., 1982). Cette chronicité a des effets directs et indirects au niveau d'organes tels que le pancréas (Herreros-Villanueva et al., 2013), le foie (Rocco et al., 2014) ou le cœur (Gardner and Mouton, 2015). Au niveau cérébral, des études d'imagerie structurale, démontrent une diminution du volume des substances grise et blanche conduisant ainsi à une atrophie générale de l'encéphale (Figure 3) (Charlton et al., 2019; Charness, 1993; De la Monte, 1988; Zahr and Pfefferbaum, 2017).

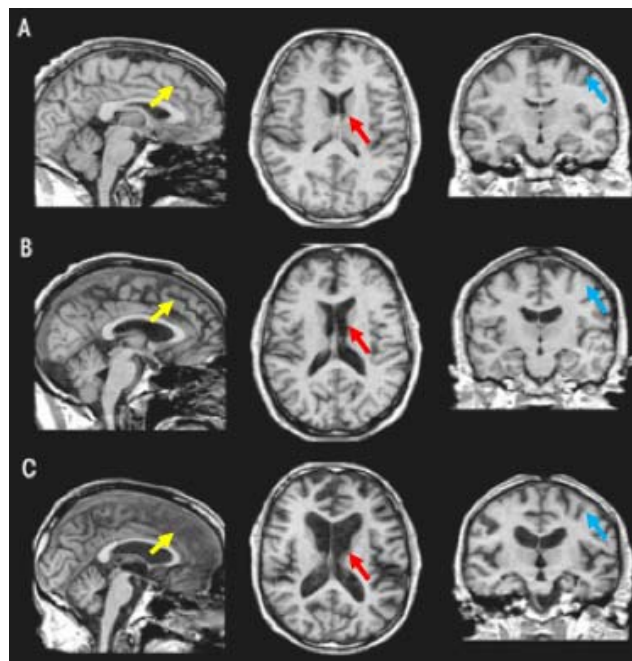


Figure 3: IRM structurales d'un sujet sain (A), d'un sujet atteint d'alcoolisme chronique (B) et d'un patient atteint d'alcoolisme chronique aggravé (C).

Ces IRM structurales montrent un effet gradué entre les différents sujets avec une atrophie des substances grise et blanche (flèches jaune et bleue) et une hypertrophie des ventricules (flèches rouges). Adapté de Zahr and Pfefferbaum, 2017

Au niveau fonctionnel, ces altérations conduisent à des dysfonctions cognitives importantes telles que des déficits d'attention, d'apprentissage, de mémoire, des démences ou encore de l'inflexibilité comportementale (Bühler and Mann, 2011; De La Monte and Kril, 2014; Dematteis and Pennel, 2018; Perry and Lawrence, 2017). La consommation chronique d'alcool a également des effets délétères au niveau psychique. Au cours des intoxications répétées, les systèmes de stress, de récompense et de motivation sont suractivés et dérégulés (Becker, 2017; Dematteis and Pennel, 2016; Seo and Sinha, 2014; Volkow et al., 2017; Weiss

and Porrino, 2002). L'individu évolue alors d'une consommation dominée par les effets positifs associés à l'alcool à une consommation visant à éviter les effets négatifs induits par ce psychotrope qui apparaissent, notamment, pendant la phase de sevrage (Cho et al., 2019; Koob and Volkow, 2010).

2. La phase de sevrage

La phase de sevrage débute lorsque l'individu réduit brusquement ou cesse complètement sa consommation d'alcool. On distingue trois grandes étapes pendant le sevrage : l'étape de sevrage aiguë, l'étape d'abstinence précoce et enfin l'étape d'abstinence prolongée (Figure 4). Ces étapes présentent des durées et des symptômes qui peuvent varier d'une phase à l'autre (Heilig et al., 2010).

L'étape de sevrage aiguë apparaît 6 à 48h après l'arrêt de la consommation et peut s'étendre jusqu'à une semaine (Wetterling and Junghanns, 2000). Elle s'accompagne de symptômes psychosomatiques opposés aux effets déprimeurs de l'alcool tels que des tremblements, de l'hyperactivité, des hallucinations, des délires, de l'anxiété, et même, des crises d'épilepsie (Dematteis and Pennel, 2018; Heilig et al., 2010; Shivani et al., 2002). L'alcool, corrigeant ces symptômes, peut alors apparaître comme un remède pour l'individu qui consommera de nouveau le psychotrope pour éviter l'état aversif induit par son absence (Trevisan et al., 1998). Si cette étape reste la mieux prise en charge à l'hôpital, notamment grâce à l'utilisation de benzodiazépines qui permettent d'atténuer les symptômes de manque (Bharadwaj and Kattimani, 2013), on estime à 10% les risques de complication conduisant à un taux de mortalité situé entre 5 et 15% (Mainerova et al., 2015; Monte et al., 2010; Simpson et al., 2016).

Suivant cette étape aiguë, l'étape d'abstinence précoce débute et s'étend de 3 à 6 semaines (Heilig et al., 2010). Cette étape intermédiaire se caractérise par la disparition des troubles physiques et la persistance des symptômes psychiatriques. L'individu ressent alors un profond état émotionnel négatif avec notamment de l'anxiété, de la dépression, de l'apathie et de la dysphorie (Becker, 2014; Heilig et al., 2010). Cet état émotionnel négatif pourrait être la conséquence des dérégulations des systèmes de stress, de récompense et de motivation induites au cours de la phase d'intoxication, et qui perdureraient à l'arrêt de la

drogue (Koob and Le Moal, 2005; Koob and Schulkin, 2018). Associé à cet état, l'individu peut alors ressentir l'envie irrésistible, également appelée « craving », de rechercher et de consommer de l'alcool (Swift, 1999). Les recherches précliniques de l'équipe de Y. Shaham, et cliniques de l'équipe de L. Lu, ont permis de mieux appréhender le déroulement temporel de cette altération psychologique majeure (Li et al., 2014, 2016; Pickens et al., 2011a). Ainsi, le « craving » débuterait dès l'arrêt de la consommation du psychotrope, puis incuberait progressivement jusqu'à devenir prédominant dans l'étape d'abstinence précoce (Bienkowski et al., 2004; Grimm et al., 2001; Lu et al., 2004). Finalement, en réponse à cet état émotionnel négatif et sous l'impulsion de cette envie irrésistible, l'individu peut alors rechuter en consommant de nouveau de l'alcool (Koob et al., 2019; Seo and Sinha, 2014).

Enfin, l'étape ultime du sevrage correspond à l'abstinence prolongée et pourrait durer la vie entière de l'individu. À cette étape, les symptômes psychiatriques peuvent s'estomper (Heilig et al., 2010) ou perdurer (Martinotti et al., 2008) selon les individus. Le « craving » semble également diminuer progressivement au cours du temps, sans toutefois complètement disparaître (Li et al., 2016). En effet, même si l'état psychologique de l'individu s'améliore, les dérégulations neurobiologiques observées pendant l'étape d'abstinence précoce perdurent et les patients présentent des altérations émotionnelles, motivationnelles et cognitives latentes (Gilman and Hommer, 2008; Robinson and Berridge, 1993; Stavro et al., 2013). Ainsi, des stimuli stressants ou provenant d'événements, de contextes et de personnes précédemment associés à la prise d'alcool, pourront réactiver le « craving » et l'état émotionnel négatif qui s'étaient estompés (Seo and Sinha, 2014). De manière similaire à l'étape précédente, cette envie irrésistible peut alors conduire l'individu à rechuter, de façon compulsive, en consommant de nouveau la drogue.

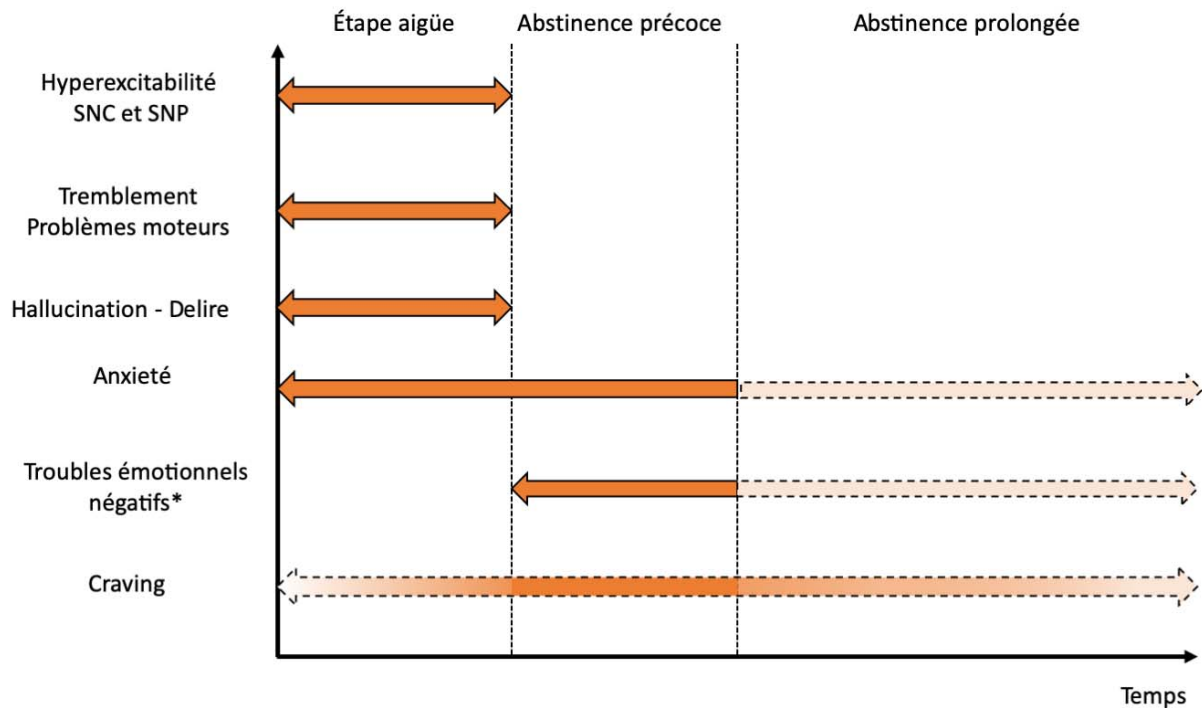


Figure 4: Les trois étapes de la phase de sevrage et leurs différents symptômes.

Au cours du sevrage, les individus alcoolodépendants expérimentent toute une palette de symptômes physiques et psychiatriques. Si les troubles physiques s'estompent à la suite de la phase de sevrage aiguë, les troubles psychiatriques perdurent à plus long terme. Les troubles émotionnels négatifs rassemblent ici les symptômes d'apathie, de dépression et de dysphorie (*). Comme l'anxiété, ces symptômes peuvent s'arrêter, ou perdurer pendant l'absténence prolongée. Le « craving » est un symptôme qui n'est pas exprimé continuellement, mais qui peut apparaître à n'importe quelle phase du sevrage. SNC : système nerveux central, SNP : système nerveux périphérique. Adapté de Heiling et al., 2010.

3. La phase de rechute

La phase de rechute correspond à la reprise de la consommation d'alcool, après une période d'absténence. Elle peut apparaître à n'importe quelle étape du sevrage, dans le but de soulager des symptômes physiques, psychiatriques ou même de répondre à une situation stressante ou une urgence. C'est une étape quasi-systématique chez les sujets alcoolodépendants, avec seulement 20% à 40% des individus traités encore abstinents après les premières années de sevrage (Fleury et al., 2016; Kodali et al., 2018; Polich et al., 1980).

Face à cet échec thérapeutique, de nombreuses études se sont consacrées à la caractérisation de cette phase. D'après les travaux de K. Witzkiewitz et GA. Marlatt, la rechute est un processus dynamique, long, qui débute pendant la phase de sevrage. L'origine de la rechute serait multifactorielle avec des facteurs prédisposants, des facteurs prédictifs et des facteurs précipitants (Figure 5). Les facteurs prédisposants seraient liés à l'historique et à la

vulnérabilité de l'individu vis-à-vis de l'alcool et de la rechute. Les facteurs prédictifs seraient liés à l'état émotionnel et physique de l'individu ainsi qu'à sa capacité d'inhiber son envie pour consommer la drogue. Enfin, les facteurs précipitants seraient directement liés au contexte, à la situation de risque, dans lesquels est placé l'individu (Witkiewitz and Marlatt, 2004).

Lors de la rechute, une cause majeure évoquée par les individus atteints d'alcoolodépendance concerne le phénomène de « *craving* ». Cette envie irrésistible de consommer de l'alcool, dont l'incubation débute avec le début du sevrage, est décrite comme le substrat motivationnel majeur de l'usage compulsif de drogue (Auriacombe et al., 2016). À ce titre, de nombreuses études ont mis en évidence un lien direct entre le risque de la rechute, mais également sa sévérité, et l'intensité du « *craving* » (Bottlender and Soyka, 2004; Evren et al., 2012; Tracy, 1994; Wemm et al., 2019). Des expériences d'imagerie ont ensuite démontré que le striatum, l'amygdale, le cortex préfrontal et orbito-frontal étaient des structures fortement impliquées dans le « *craving* » (Figure 6) (Goldstein and Volkow, 2011; Seo et al., 2013, 2011; Seo and Sinha, 2014).

Au niveau thérapeutique, l'inactivation du cortex préfrontal dorso-latéral par stimulation magnétique transcrânienne (Boggio et al., 2008; Diana et al., 2019; Mishra et al., 2010), ou du striatum ventral par stimulation cérébrale profonde (Müller et al., 2016, 2009) permet de réduire le « *craving* » pour l'alcool induit par des stimuli associés au psychotrope ou induits par le stress, et diminue ainsi le risque de rechute. Bien qu'étant le substrat motivationnel majeur de l'usage compulsif de psychotrope, le « *craving* » ne peut cependant expliquer, à lui seul, la phase de rechute. En effet, si ce phénomène peut être initiateur de cette phase, d'autres dysfonctionnements comportementaux et cognitifs qui seront abordés dans le chapitre 3, participent au développement de la compulsivité, et précipitent l'individu vers la rechute.

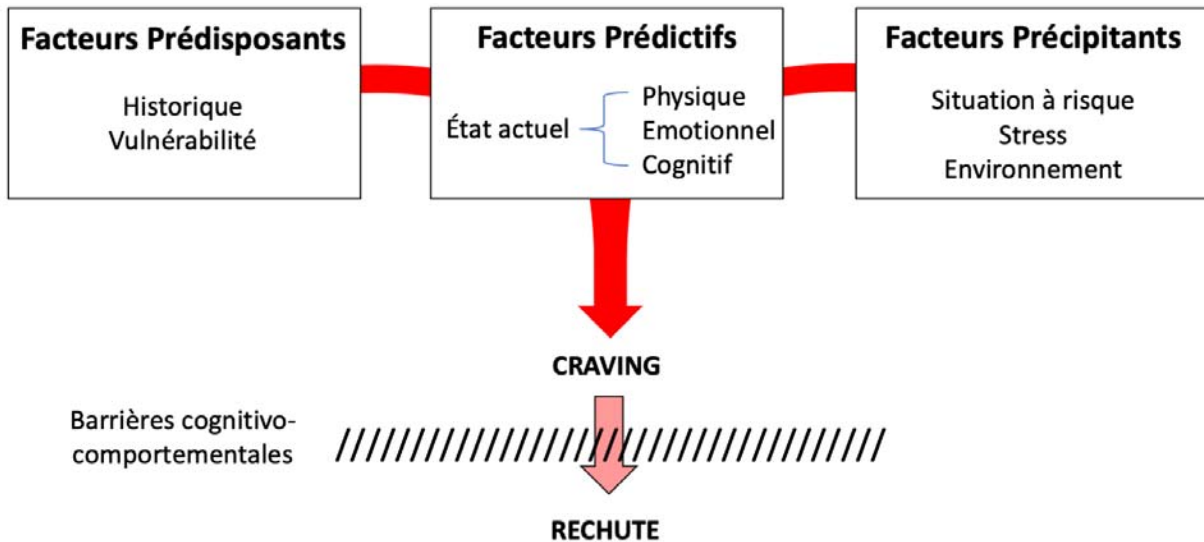


Figure 5: Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans les processus de rechute selon les travaux de Witkiewitz et Marlatt.

Les facteurs prédisposants, prédictifs et précipitants sont en interaction et peuvent aboutir à l'apparition du « craving ». C'est ensuite la capacité de l'individu à diminuer ce désir impétueux, à l'aide de barrières cognitivo-comportementales, qui permettra d'éviter la rechute.

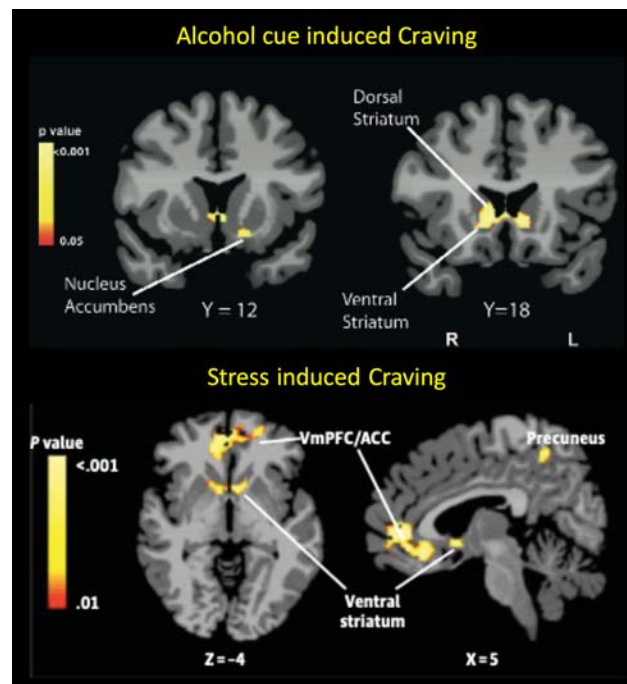


Figure 6: IRM fonctionnelles mettant en évidence les structures impliquées dans le phénomène de « craving » induit par des stimuli associés à l'alcool ou induit par un stress.

Dans ce protocole d'imagerie, l'activité cérébrale d'individus en phase de sevrage (> 72h) a été mesurée au cours de la diffusion de scripts audio personnalisés qui étaient associés à l'alcool, au stress ou décrits comme neutres. Avant et après cette procédure, les individus devaient également évaluer leurs niveaux d'anxiété et de « craving » à l'aide d'une échelle verbale analogique allant de 0 (absence) à 10 (extrêmement intense). La combinaison entre l'activation cérébrale par le stimulus et le « craving » reporté par l'individu a permis d'isoler les structures en jaune. vmPFC : cortex préfrontal ventro-médian; ACC : cortex cingulaire antérieur Adapté de Seo et al., 2011 et Seo et al., 2013.

II. Cibles neuropharmacologiques

A. Cibles neuropharmacologiques directes

Contrairement aux autres psychotropes, tels que la nicotine ou la cocaïne, la molécule d'éthanol n'a pas de cible spécifique. Cette petite molécule (46 Da), est amphiphile, avec un groupe hydroxyle et une chaîne carbonée très courte, ce qui lui confère la possibilité de s'accrocher à de nombreuses cibles, mais, avec une faible affinité (Harris et al., 2008). Elle peut ainsi modifier l'activité d'un récepteur, ou d'une enzyme, en se fixant sur le site d'activation, en changeant sa conformation structurelle, en modifiant son environnement lipidique ou sa présence à la membrane (Abraham et al., 2017; Harris et al., 2008; Spanagel, 2009; Trudell et al., 2014). L'éthanol ayant de multiples cibles, la description ci-dessous ne sera pas exhaustive, mais permettra de mieux appréhender ses conséquences au niveau neurophysiologique.

1. Le récepteur GABA-A

Le récepteur GABA-A, très exprimé au niveau cérébral, est un hétéropentamère ionotropique qui permet l'entrée d'ions chlorure dans le neurone, diminuant ainsi son activité (Pirker et al., 2000; Waldvogel et al., 2010). Dans les années 80, des études de culture cellulaire (Suzdak et al., 1986) et d'électrophysiologie (Mereu and Gessa, 1985; Nestoros, 1980) ont montré que l'éthanol pouvait moduler l'activité du récepteur GABA-A. Ainsi, l'ajout d'éthanol potentialise l'ouverture du canal ionique en présence de GABA et induit une hyperpolarisation du neurone (Davies, 2003). Cependant, le mécanisme exact d'interaction entre le récepteur GABA-A et la molécule d'éthanol reste aujourd'hui encore très discuté et une multitude d'effets peuvent, *in fine*, aboutir à l'activation de ce récepteur (Förstera et al., 2016). Cette potentialisation pourrait passer par une action directe au niveau des domaines extracellulaires ou transmembranaires du récepteur (Hancher et al., 2006; Olsen et al., 2014; Olsen and Liang, 2017). Inversement, elle pourrait être médiée par une action indirecte notamment par l'activation ou l'inhibition de messagers intracellulaires tels que la PKA ou PKC (Aguayo et al., 2005; Choi et al., 2008; Förstera et al., 2016). Enfin, d'autres groupes suggèrent plutôt un effet de l'éthanol sur le relargage de GABA-A au niveau présynaptique (Valenzuela and Jotty, 2015).

L'éthanol a un effet bi-phasique sur le système GABA. Pendant l'intoxication aiguë, le système est suractivé. Pour contrebalancer l'effet des intoxications successives à l'éthanol, la

composition du récepteur GABA-A change, le nombre et l'activité de ces récepteurs diminuent (Kumar et al., 2004; Olsen, 2018; Olsen and Liang, 2017). Lors de la phase de sevrage, cette diminution de l'activité GABA inhibitrice aboutit à une hyperactivité du système nerveux central.

2. Le récepteur NMDA

Le récepteur NMDA est également une cible majeure de la molécule d'éthanol (Bell et al., 2016; Ron and Wang, 2009). Exprimé de façon ubiquitaire au niveau cérébral, ce récepteur hétérotétramérique ionotropique est, en opposition au récepteur GABA-A, de type excitateur. Il est également un acteur clé de la plasticité synaptique, de l'apprentissage et de la mémoire (Malenka and Nicoll, 1999; Nicoll, 2017). En 1989, des études sur des neurones d'hippocampes de souris (Lima-Landman and Albuquerque, 1989; Lovinger et al., 1989) ainsi que sur des tranches d'hippocampes de rats (Göthert and Fink, 1989) ont démontré l'effet inhibiteur d'un traitement aigu à l'éthanol sur le récepteur NMDA. Cependant, l'interaction entre la molécule et récepteur NMDA reste, comme pour le récepteur GABA-A, très discutée avec des preuves d'interactions directes mais également indirectes. Cet effet fut premièrement attribué à une inhibition non-compétitive de l'éthanol sur les récepteurs NMDA, avec une diminution de la fréquence et du temps d'ouverture du canal ionique (Wright et al., 1996). D'autres travaux ont ensuite montré que cette inhibition pouvait dépendre de messagers intracellulaires qui modifient l'activité du récepteur, tels que des kinases et des phosphatases (Alvestad et al., 2003; Ferrani-Kile et al., 2003; Xu et al., 2011). Enfin, plus récemment, deux groupes de recherche ont observé que l'éthanol pouvait déclencher l'internalisation du récepteur NMDA par un mécanisme calcium-dépendant médié par la calmoduline (Baliño et al., 2014; Boikov et al., 2020; Sibarov and Antonov, 2018).

L'éthanol possède également un effet bi-phasique sur le système glutamatergique. Pendant l'intoxication aiguë, le système est donc sous-activé. Pour contrebalancer cette inhibition, le nombre de récepteurs NMDA au niveau post-synaptique augmente (Carpenter-Hyland et al., 2004; Rani and Ticku, 2006), des modifications structurales ou post-translationnelles du récepteur le rendent également moins sensible à l'éthanol (Miyakawa et al., 1997; Nagy, 2008; Roberto et al., 2006; Roh et al., 2011; Yaka et al., 2003) et le relargage de glutamate augmente (Roberto et al., 2004). L'ensemble de ces neuro-adaptations conduisent, lors de la phase de sevrage, à une hyperactivité des récepteurs NMDA, et plus

globalement du système glutamatergique (Kroener et al., 2012; Roberto and Varodayan, 2017; Ron and Wang, 2009; Wang et al., 2010).

Finalement, l'augmentation d'activité du système nerveux central, induit par la désinhibition du système GABA, est amplifiée par une hyperexcitabilité du système glutamatergique. Cette dérégulation de la balance inhibition/excitation (Figure 7) peut expliquer une partie des symptômes observés pendant la phase de sevrage aigüe, tels que l'hyperexcitabilité du système nerveux central et les crises d'épilepsie (Brousse et al., 2012; Littleton, 1998).

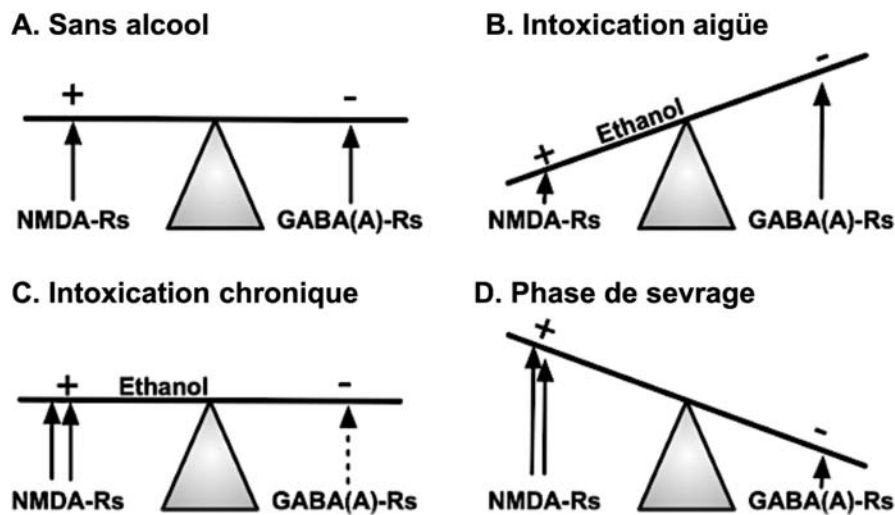


Figure 7: Effet de l'éthanol sur l'activité des récepteurs NMDA et GABA-A.

(A) En condition physiologique, il existe une balance entre les fonctions excitatrices (+) médiées par les récepteurs NMDA et inhibitrices (-) médiées par les récepteurs GABA. (B) Lors d'une intoxication aigüe, l'éthanol diminue l'activité NMDA et augmente l'activité GABA-A ce qui induit une hyper-inhibition du système nerveux. (C) Lors d'une intoxication chronique, la fonction NMDA augmente alors que la fonction GABA-A diminue pour contrebalancer l'effet de l'éthanol, et rétablir la balance. (D) Pendant la phase de sevrage, l'éthanol n'affecte plus les systèmes, mais les adaptations mises en place induisent une hyperexcitabilité du système nerveux. Adapté de Werner, 2007

3. Autres cibles

Bien que le récepteur GABA-A et le récepteur NMDA soient décrits comme les cibles majeures de la molécule d'éthanol, d'autres cibles ont également été mises en évidence (Figure 8).

Ainsi, la molécule d'éthanol inhibe d'autres récepteurs au glutamate, à savoir les récepteurs AMPA et kaïnates (Holmes et al., 2013; Roberto and Varodayan, 2017). Inversement, l'éthanol potentialise l'activité d'autres récepteurs de type inhibiteur comme le récepteur GABA-B, un récepteur métabotropique couplé aux protéines $G_{i/o}$ (Ariwodola and Weiner, 2004; Roberto and Varodayan, 2017) et le récepteur ionotropique à la glycine (glyR) (Perkins et al., 2010). La molécule d'éthanol module l'activité des récepteurs cholinergiques de type nicotinique, activant ou inhibant le récepteur en fonction des sous-unités qui le composent (Davis et al., 2006; Forman and Zhou, 1999). Cette molécule potentialise également l'activité du récepteur ionotropique sérotoninergique 5-HT₃ (Lovinger, 1999; Lovinger and White, 1991; McBride et al., 2004), un récepteur activateur présentant une forte homologie structurale avec les récepteurs nicotiniques, glyR et GABA-A (Maricq et al., 1991). La molécule d'éthanol affecte également certains canaux ioniques. Elle augmente la conductance de deux canaux potassiques permettant la sortie d'ions [K⁺] du neurone, les canaux [K⁺] Ca²⁺-dépendants appelés « canaux BK » (Dopico et al., 2014, 2016) et les canaux potassiques rectifiant activés par les protéines G, appelés « canaux GIRK » (Bodhinathan and Slesinger, 2013; Kobayashi et al., 1999; Lewohl et al., 1999; Toyama et al., 2018). Inversement, cette molécule diminue la conductance d'un autre type de canal potassique responsable de l'entrée d'ions [K⁺] dans le neurone, les canaux voltages-dépendants de type M « canaux M » (Koyama et al., 2007; Moore et al., 1990). L'éthanol augmente l'activité des canaux HCN (canaux activés par l'hyperpolarisation, modulés par les nucléotides cycliques et non sélectifs aux cations) responsable de l'activité automatique de neurones « pacemaker » comme les neurones DA (Okamoto et al., 2006). La molécule a également un effet inhibiteur sur les canaux [Ca²⁺] voltage dépendant (Morton and Valenzuela, 2016; Walter and Messing, 1999). Enfin, la molécule d'éthanol interagit avec des messagers intracellulaires, tels que les kinases et phosphatases déjà évoquées pour expliquer les effets indirects de l'éthanol sur les récepteurs GABA-A et NMDA, ou des complexes macromoléculaires tels que l'adénylate cyclase par exemple (Ron and Barak, 2016).

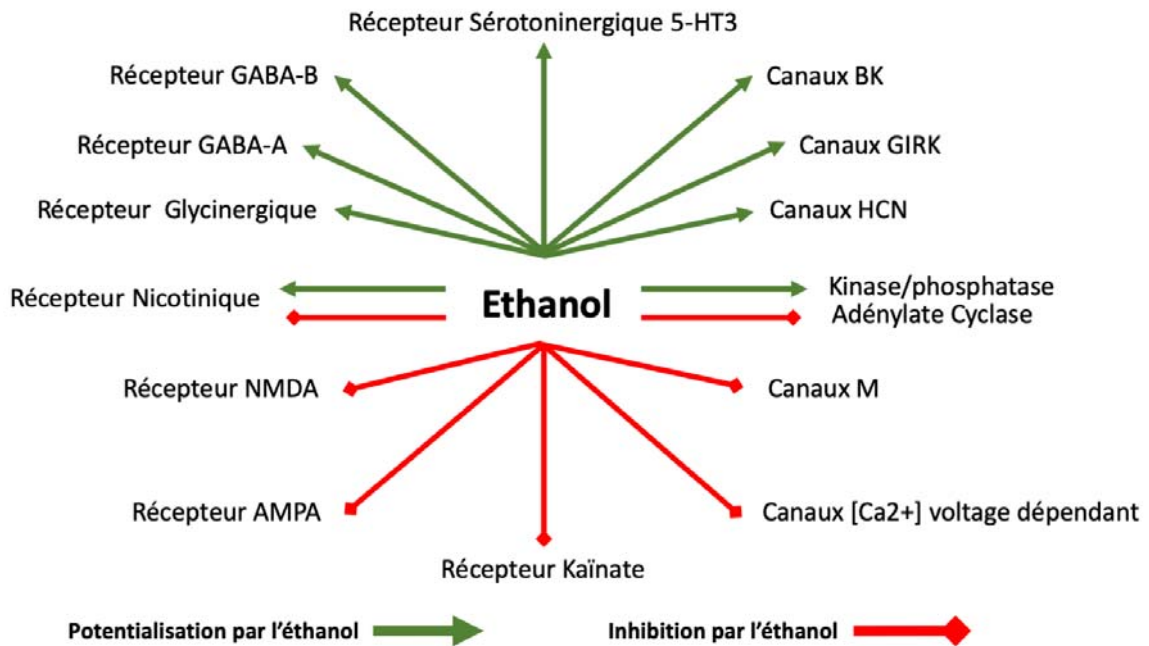


Figure 8: Synthèse des cibles pharmacologiques de la molécule d'éthanol.

Les effets neuropharmacologiques de l'éthanol sont multiples et complexes. En ciblant des complexes protéiques exprimés dans l'ensemble du système nerveux centrale, cette molécule peut influencer le fonctionnement d'un grand nombre de populations neuronales et non neuronales. Cependant, un système de neurotransmission impliqué dans les fonctions motivationnelles et émotionnelles est particulièrement affecté par l'éthanol, le système DA.

B. Le système DA, une cible commune aux drogues d'abus

Le système DA, système monoaminergique dont je décrirai l'anatomie et les différents rôles au second chapitre, représente une des cibles majeures des drogues d'abus dont l'éthanol ne fait pas exception (di Chiara and Imperato, 1988). En effet, des expériences d'électrophysiologie ont démontré que cette substance induisait une augmentation de l'activité des neurones DA de la substance noire compacte (SNc) et de l'aire tegmentale ventrale (ATV), deux territoires dopaminergiques du mésencéphale (Figure 9A) (Gessa et al., 1985; Mereu et al., 1984). De façon concomitante, des études de microdialyse ont également rapporté une augmentation des quantités extracellulaires de DA dans les principaux territoires de projections des neurones DA : le noyau accumbens (NAc) et le striatum dorsal (Figure 9B) (Imperato and Di Chiara, 1986, 1985). Ces expériences étaient réalisées sur des rats naïfs à la suite d'injection aiguë d'éthanol, intraveineuse ou intrapéritonéale, qui pouvaient atteindre

des concentration relativement élevé (entre 0.25 et 4 g/kg). Par la suite, cette hausse des quantités extracellulaires de DA a également été retrouvée chez l'homme (Boileau et al., 2003) confirmant alors les expériences réalisées sur l'animal. Au niveau comportemental, le laboratoire de WJ. McBride a observé, chez le rat, que l'auto-administration d'éthanol dans l'ATV était suffisante pour maintenir un comportement opérant⁴, démontrant ainsi l'effet renforçant de cette molécule directement au sein de cette zone (Rodd-Henricks et al., 2000).

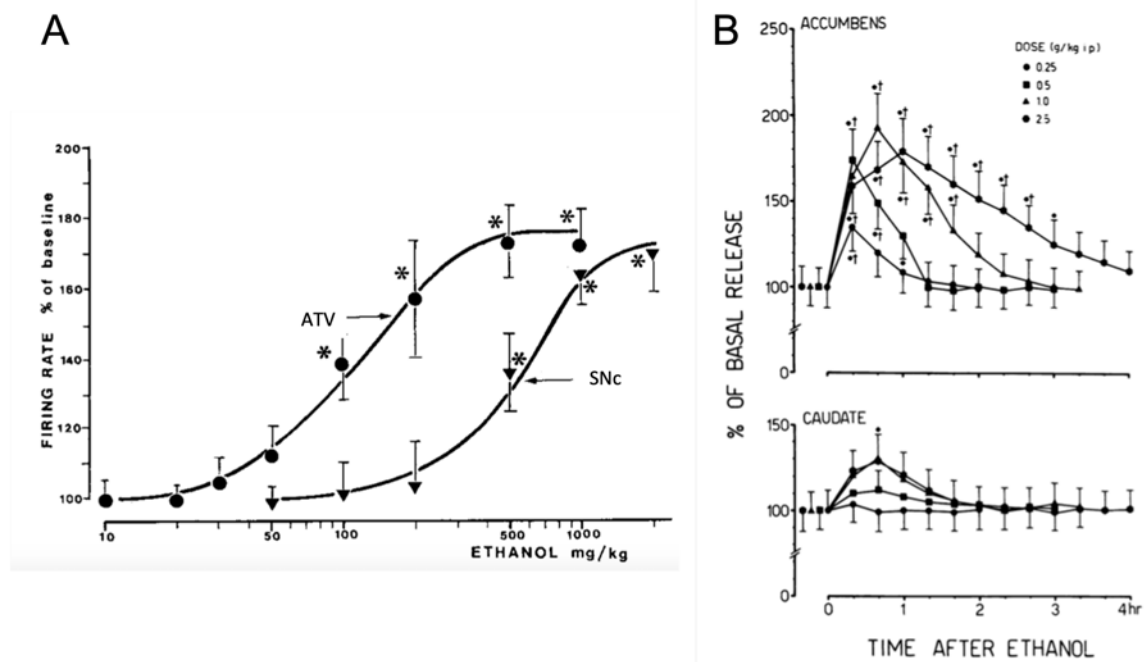


Figure 9 : L'éthanol induit une hausse de l'activité du système DA.

(A) L'éthanol augmente l'activité des neurones DA du mésencéphale à la suite d'injection intraveineuse. Adapté de Gessa et al., 1985. **(B)** L'éthanol augmente les quantités de DA au niveau striatal à la suite d'une injection intrapéritonéal. Accumbens : noyau accumbens ; Caudate : striatum dorso-médian. Adapté de Imperato and Di Chiara, 1988.

L'effet excitateur de l'éthanol sur les neurones DA peut, de prime abord, sembler contre-intuitif. En effet, ces neurones reçoivent des afférences de la part de neurones GABA et de neurones glutamatergiques situées au sein même du mésencéphale mais également dans d'autres régions cérébrales comme le NAC pour les afférences GABA et le cortex pour les afférences glutamatergiques par exemple. La potentialisation des récepteurs GABA et l'inhibition des récepteurs glutamatergiques devrait donc promouvoir l'inhibition des neurones DA.

⁴ Un comportement opérant est un comportement réalisé par l'animal de façon volontaire afin d'obtenir une conséquence à celui-ci (ex. le rat appui sur le levier pour obtenir de l'alcool). Ce type de comportement est issu du conditionnement opérant qui s'oppose au conditionnement classique (ou Pavlovien) dans lequel l'animal répond à un stimulus de façon involontaire (ex. le chien salive lorsqu'il entend la cloche sonner, car elle prédit l'arrivée de la nourriture).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'effet de l'éthanol sur le système DA. L'augmentation d'activité du système DA peut, premièrement, être expliquée par une action directe de l'éthanol sur les neurones DA du mésencéphale. En effet, des expériences d'électrophysiologie *ex vivo* ont démontré, que l'effet excitateur de l'éthanol sur les neurones DA de l'ATV perdurait même si ces neurones étaient isolés (Figure 10A) (Brodie et al., 1999). En utilisant différents antagonistes de récepteurs ou de canaux, les équipes de MS. Brodie et de H. Morikawa ont ensuite pu montrer que cette action directe de l'éthanol était médiée par une diminution de l'activité des canaux de type-M et une augmentation de l'activité des canaux HCN, ce qui induisait alors une augmentation de la fréquence de dépolarisation des neurones DA (Figure 10B) (Appel et al., 2003; Koyama et al., 2007; McDaid et al., 2008; Morikawa and Morrisett, 2010; Okamoto et al., 2006; You et al., 2018).

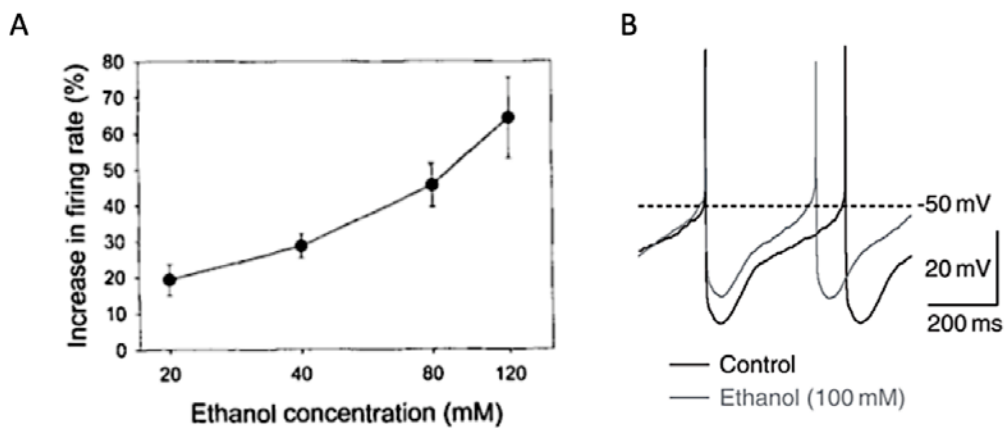


Figure 10 : L'éthanol augmente l'activité pacemaker des neurones DA de l'ATV.

(A) L'éthanol induit une augmentation de l'activité des neurones DA de l'ATV de manière dose-dépendante. Adapté de Brodie et al., 1999. (B) Cette augmentation est corrélée à une augmentation de fréquence de dépolarisation des neurones avec une phase d'hyperpolarisation plus courte. Adapté de Okamoto et al., 2006.

En complément cette action directe, l'éthanol peut également modifier l'activité de neurones afférents aux neurones DA du mésencéphale (Figure 11). En effet, cette molécule inhibe l'activité des neurones GABA situés dans l'ATV (Morales and Margolis, 2017; Stobbs et al., 2004; Xiao et al., 2007), mais également dans d'autres régions tels que la substance noire réticulée (SNr) (Mereu and Gessa, 1985) et le NAc (Förster et al., 2017), qui inhibe l'activité des neurones DA (Tepper and Lee, 2007; Yang et al., 2018). Par ailleurs, le récepteur glyR semble particulièrement impliqué dans l'action indirecte de l'éthanol sur les neurones DA, puisque l'infusion d'un antagoniste des récepteurs glyR directement dans le NAc, bloque l'effet inhibiteur de l'éthanol sur les neurones GABA (Förster et al., 2017), ainsi que son

action sur la libération de DA au sein de cette structure (Molander and Söderpalm, 2005a, 2005b). L'ensemble de ces résultats met donc en évidence un mécanisme indirect, initié au niveau du NAc et des neurones GABA cette fois-ci, par lequel l'éthanol peut influencer l'activité des neurones DA.

Enfin, les récepteurs nicotiniques et les canaux GIRK pourraient également être impliqués dans l'action de l'éthanol sur les neurones DA (Morikawa and Morrisett, 2010). Ainsi, les travaux du laboratoire de B. Söderpalm ont démontré que l'infusion d'un antagoniste des récepteurs nicotiniques dans l'ATV, bloque l'action de l'éthanol sur la libération de DA dans le NAc (Blomqvist et al., 1997, 1993; Söderpalm et al., 2009). MA. Herman et ses collaborateurs ont, quant à eux, observé que l'éthanol n'augmente plus l'activité des neurones DA de l'ATV, ni la concentration de DA dans le NAc lorsque le canal GIRK3 est muté (Herman et al., 2015). Cependant, il est ici important de noter que ces récepteurs et ces canaux sont exprimés à la fois sur les neurones DA et sur les neurones GABA (Hendrickson et al., 2013). Dès lors, l'effet de l'éthanol médié par ces deux effecteurs pourrait conduire à un effet direct sur les neurones DA mais également à un effet indirect sur les neurones GABA afférents aux neurones DA.

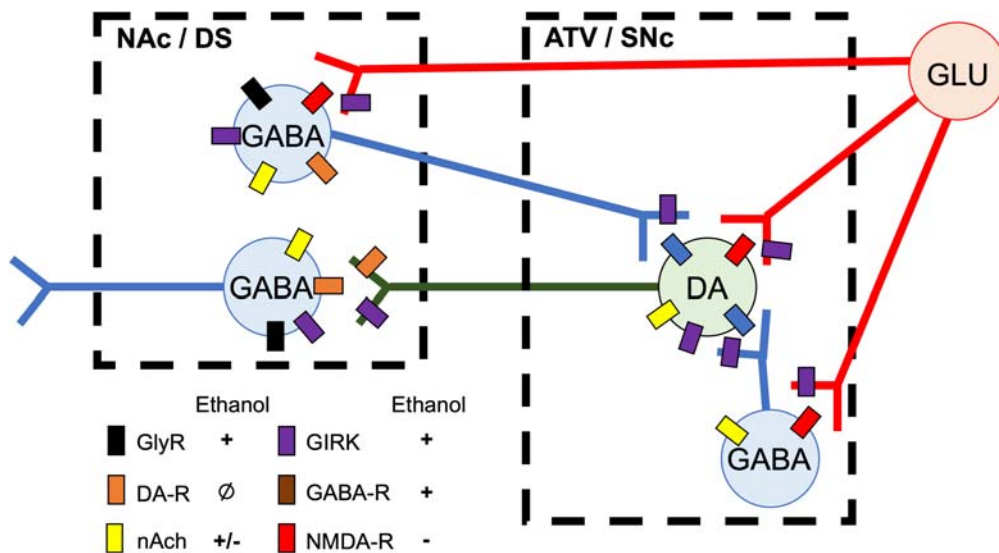


Figure 11: Potentiels effets directs et indirectes de l'alcool sur les neurones DA.

L'éthanol potentialise l'activité des récepteurs GABA et inhibe l'activité des récepteurs glutamatergiques présents à la membrane des neurones DA, ce qui devrait favoriser l'inhibition des neurones DA. Cependant, l'éthanol inhibe également l'activité des récepteurs glutamatergiques et augmente l'activité des récepteurs inhibiteurs GABA et glyR présent à la membrane des neurones GABA intrinsèques et extrinsèques au mésencéphale, diminuant *in fine* l'activité de ces neurones. L'éthanol augmente également l'activité des canaux GIRK et des récepteurs nicotiniques dont l'effet dépend des sous-unités qui le composent. L'effet net de l'éthanol sur ces canaux et de ces récepteurs est cependant difficile à appréhender, car ils sont présents à la fois à la membrane des neurones DA, GABA et glutamatergiques.

Finalement, de nombreuses cibles pharmacologiques ont été étudiées permettant une meilleure compréhension des effets de cette substance au niveau cérébral. Même s'il reste encore beaucoup d'interrogations sur les mécanismes exacts d'interactions avec l'éthanol, le système DA est particulièrement affecté par ce psychotrope. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détails au fonctionnement de ce système dans un cadre physiologique. Ce second chapitre permettra de souligner son importance dans les processus d'apprentissages, les comportements motivés et habituels, afin de mieux comprendre, dans un second temps, son implication dans la physiopathologie de l'alcoolodépendance.

Partie 2 : La dopamine, un acteur central de l'apprentissage associatif et des motivations

I. Neurobiologie du système DA

Depuis la découverte de la DA par P. Holtz au cours des années 1930, la description du rôle de ce neurotransmetteur n'a cessé d'évoluer et évolue encore aujourd'hui. Initialement restreint au rôle de précurseur de la noradrénaline (Holtz et al., 1938), la DA est aujourd'hui considérée comme un neuro-modulateur clé du système nerveux (Beninger, 1983; Berke, 2018; Carlsson, 1959). À ce titre, elle permet de modeler les comportements moteurs, cognitifs et limbiques de l'individu en fonction de ses besoins et de son environnement (Klein et al., 2019). Avant d'explorer plus en détails les différentes fonctions de la DA, nous allons nous intéresser à l'architecture de ce système de neurotransmission.

A. La DA au niveau du mésencéphale

Parmi les différents territoires DA du mésencéphale mis en évidence par A. Dahlström et K. Fuxe en 1964, deux territoires déjà mentionnés au chapitre précédent, sont particulièrement importants dans le cadre de ce travail doctoral : la SNc et l'ATV (Figure 12) (Dahlström and Fuxe, 1964). Bien qu'étant composés d'une majorité de neurones DA, ces territoires sont également composés de neurones GABA et glutamatergiques impliqués dans la modulation de leurs activités (Morales and Margolis, 2017; Nair-Roberts et al., 2008; Yamaguchi et al., 2013). Il n'existe pas de barrière physique entre la SNc et l'ATV, la distinction reposant essentiellement sur les zones de projections de ces deux aires et de leurs fonctions supposées (Björklund and Dunnett, 2007; Dahlström and Fuxe, 1964; Wise, 2009).

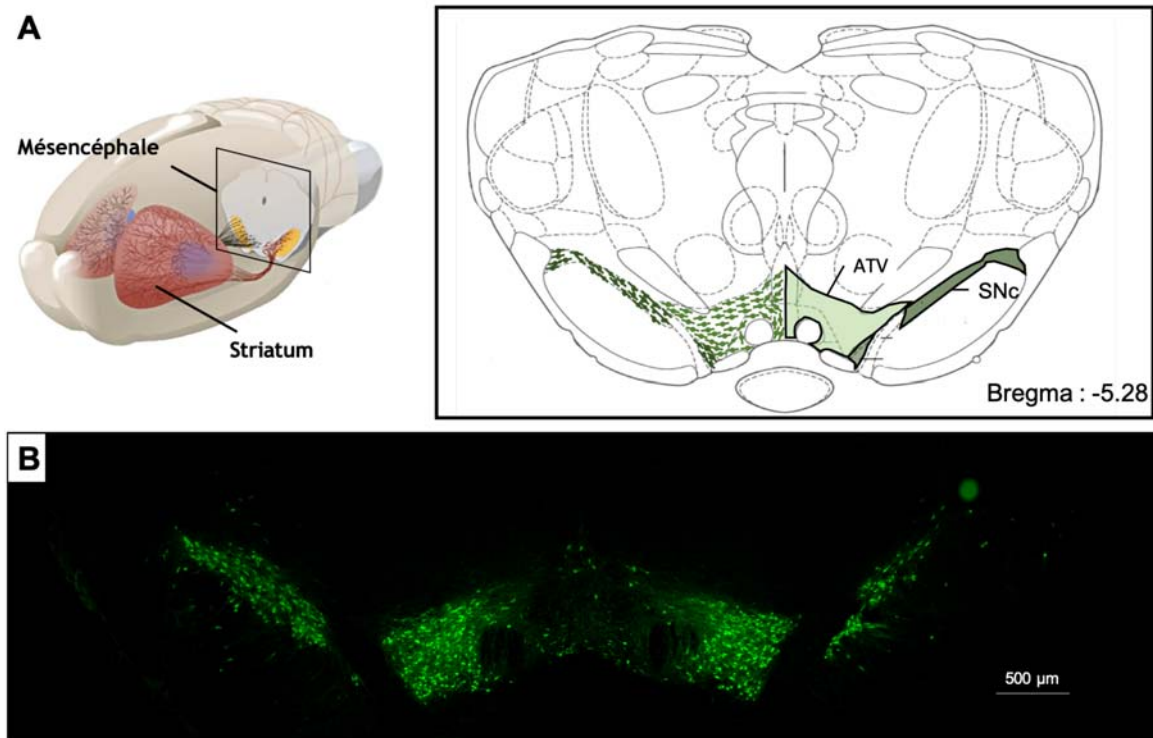


Figure 12 : Organisation anatomique de la SNc et de l'ATV dans le mésencéphale chez le rat.

(A) Représentation schématique de la SNc et de l'ATV au niveau du mésencéphale **(B)** Marquage par immunofluorescence des neurones DA du mésencéphale grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre la Tyrosine-Hydroxylase, enzyme de synthèse limitante de la DA, et d'un anticorps secondaire couplé à un Alexa 488.

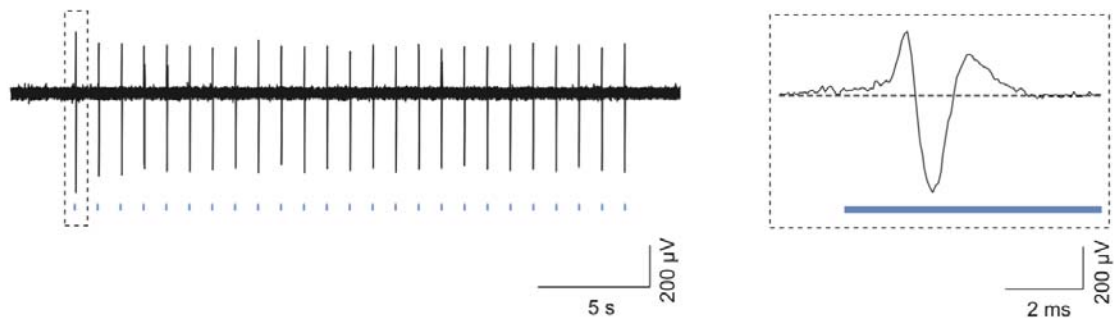
B. Activités électriques des neurones DA

Au sein de l'ATV et de la SNc, la distinction entre l'activité électrique des neurones DA, GABA et glutamatergiques mesurée en électrophysiologie extracellulaire est réalisée en analysant la forme et la durée des potentiels d'action générés par la population de neurones enregistrés. En effet, les potentiels d'actions générés par les neurones DA possèdent une forme tri-phasique et une durée supérieure à 2 ms, alors que les neurones GABA et glutamatergiques ont une forme bi-phasique et une durée inférieure à 1,5 ms⁵ (Figure 13A) (Coizet et al., 2006, 2003; Grace and Bunney, 1984a, 1983; Ungless and Grace, 2012). En se focalisant sur les neurones DA, les travaux de AA. Grace et BS. Bunney ont mis en évidence deux types d'activité électrique distincts au sein du système DA : l'activité tonique et l'activité phasique (Figure 13B) (Grace and Bunney, 1984a, 1984b; Ungless and Grace, 2012). L'activité

⁵ Il est important de garder à l'esprit que les expériences d'électrophysiologie extracellulaire mesurent l'activité d'une population de neurones. Dès lors, bien que les critères utilisés permettent de supposer que les neurones enregistrés sont majoritairement d'origine DA, il est impossible cependant d'affirmer qu'une faible proportion de neurones GABA ou glutamatergiques ne soit pas également enregistrés.

tonique ($\sim 1-6$ Hz) est sous-tendue par l'activité pacemaker des neurones DA et permet de libérer la DA en faible quantité et de manière continue. Inversement, l'activité phasique (~ 20 Hz) est composée de salves de potentiels d'action et permet la libération d'une forte quantité de DA dans une fenêtre temporelle très étroite en réponse, par exemple, à un stimulus environnemental pertinent pour l'individu (Floresco et al., 2003; Grace et al., 2007). Plus qu'un simple système ON-OFF, le fonctionnement du système DA repose sur un contraste entre ces deux modes de relargage, tel un rapport entre le signal (phasique) et le bruit (tonique). En ce sens, une altération du tonus DA conduira au dysfonctionnement des signaux DA phasiques (Grace, 1991).

A - Electrophysiologie extracellulaire - Activité de l'ATV



B - Electrophysiologie intracellulaire - Activité DA

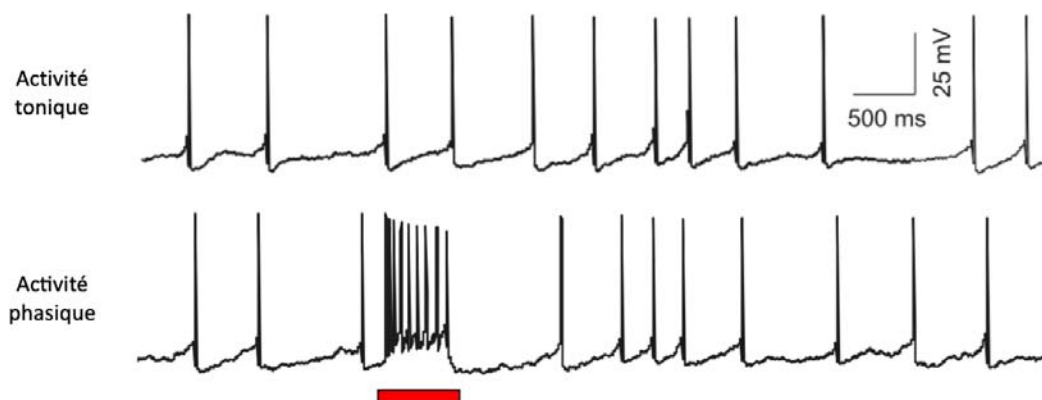


Figure 13 : Activités électriques des neurones DA mesurés par électrophysiologies intra et extracellulaire. (A) Activité électrique des neurones de l'ATV mesurée par électrophysiologie extracellulaire. L'encart représente la forme tri-phasique caractéristique du potentiel d'action des neurones DA (souligné en bleu). (B) Activités tonique et phasique d'un neurone DA mesurées par électrophysiologie intracellulaire *ex-vivo*. L'activité tonique se caractérise par des potentiels d'actions isolés et réguliers. L'activité phasique se caractérise par des salves de potentiels d'action (souligné en rouge). Les tracés utilisés pour l'illustration sont issus de Tsai et *al.*, 2009.

C. Efférences DA de la SNc et de l'ATV chez le rongeur

Les neurones DA de la SNc projettent majoritairement sur le striatum dorsal pour former la voie DA nigrostriée (Figure 14) (Andén et al., 1964; Beckstead et al., 1979; Björklund and Dunnett, 2007; Fallon and Moore, 1978). D'autres projections, minoritaires, ont également été mises en évidence au niveau d'autres structures impliquées dans la motricité telles que le noyau sub-thalamique, les Globus Pallidus Interne et Externe ou encore la SNr (Fallon and Moore, 1978; Guatteo et al., 2009). Il est intéressant de noter que les neurones DA de la SNc projettent également vers des régions limbiques et corticales, comme le striatum ventral, l'amygdale et le cortex préfrontal par exemple (Björklund and Dunnett, 2007; Fallon and Moore, 1978).

Deux voies de projections ont initialement été proposées pour les neurones DA de l'ATV : la voie DA mésolimbique et la voie DA mésocorticale (Figure 14). La voie DA mésolimbique correspond aux projections des neurones DA de l'ATV vers le striatum ventral, composé du NAc (sous-divisé en deux parties NAc core et NAc shell), des îlots de Calleja et des tubercules olfactifs (Beier et al., 2015; Björklund and Dunnett, 2007; Ikemoto, 2010; Morales and Margolis, 2017). Cette voie projette également vers d'autres structures limbiques telles que l'amygdale ou l'hypothalamus (Beckstead et al., 1979; Ikemoto, 2010). La voie DA mésocorticale correspond aux projections des neurones DA de l'ATV vers des aires corticales comme le cortex préfrontal (Björklund and Dunnett, 2007; Ikemoto, 2010; Oades and Halliday, 1987). Enfin, les neurones DA de l'ATV projettent également sur la partie la plus médiale du striatum dorsal (Beckstead et al., 1979). Il semble donc que les neurones DA de l'ATV et de la SNc puissent projeter sur des structures communes (Björklund and Dunnett, 2007; Wise, 2009).

Les travaux de CMA. Pennartz et de P. Voorn ont apporté une description neuroanatomique plus complète du système DA. En effet, leurs travaux ont révélé une organisation topographique médiolatérale, de l'ATV vers la SNc, retrouvée au niveau du striatum et du cortex (Pennartz et al., 2009; Voorn et al., 2004). La partie la plus médiale de l'ATV projette ainsi sur la partie la plus ventro-médiale du striatum, tandis que la partie la plus latérale de la SNc projette sur la partie la plus dorso-latérale du striatum (Figure 15). Finalement, à l'instar du mésencéphale, aucune barrière anatomique n'existe au niveau du striatum entre les différents territoires de projections DA.

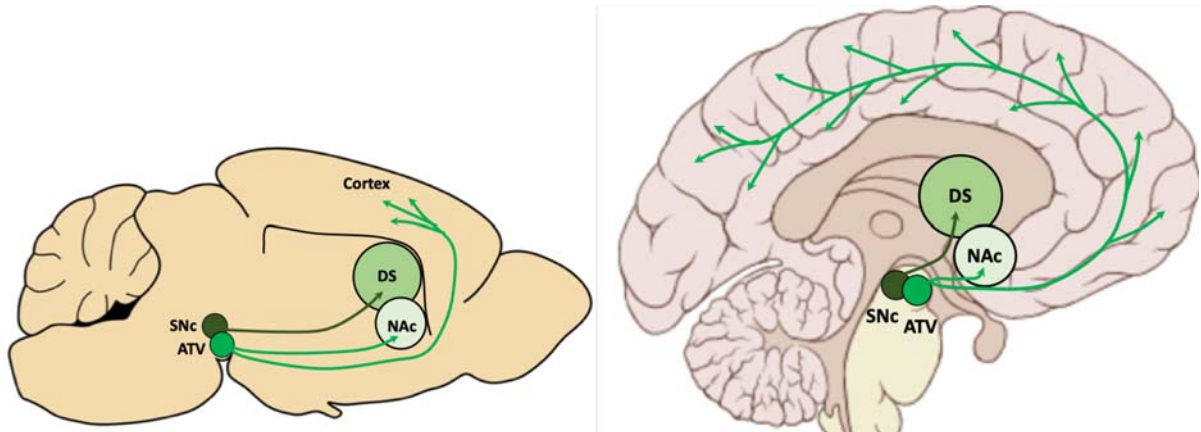


Figure 14 : Représentation schématique, chez le rat et chez l'homme, de la voie DA nigrostriée issue de la SNc (vert foncé) et des voies DA mésolimbique et mésocorticale issues de l'ATV (vert claire).

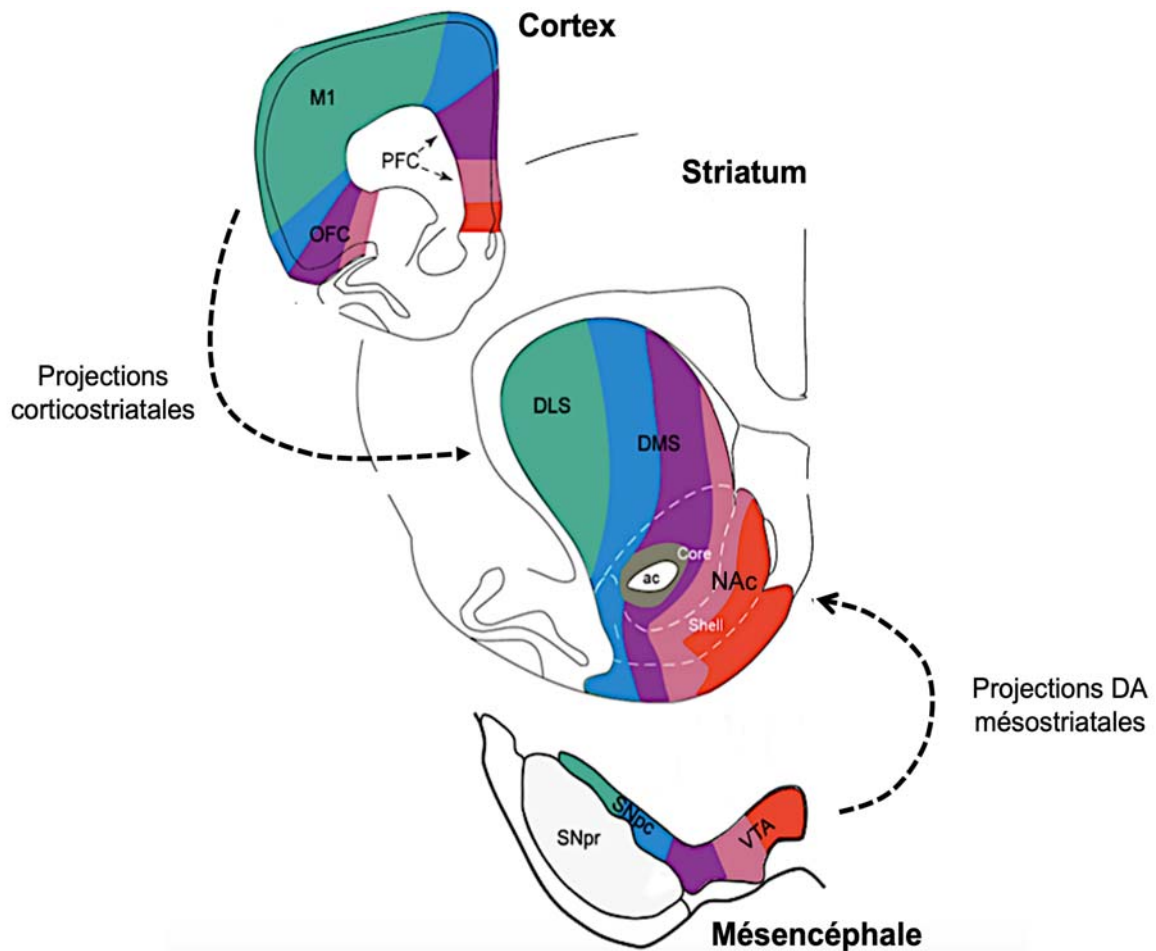


Figure 15 : Organisation topographique du striatum en fonction des afférences mésencéphaliques et corticales.

ac : commissure antérieure ; DLS : striatum dorsolatéral ; DMS : striatum dorsomédian ; NAc : noyau accumbens ; OFC : cortex orbito-frontal ; PFC : cortex pré-frontal ; SNpc : substance nigra pars compacta ; SNpr : substance nigra pars reticulata ; VTA : aire tegmentale ventrale. Adapté de Voorn et *al.*, 2004 et Pennartz et *al.*, 2009.

D. Vision dichotomique des voies DA mésolimbique et nigrostriée

La dégénérescence de la voie DA nigrostriée dans la maladie de Parkinson et les symptômes moteurs associés ont initialement amené les scientifiques à considérer cette voie comme purement motrice (Carlsson, 1959; Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Ce dogme fut ensuite renforcé par des études utilisant des neurotoxines cathécholaminergiques, 6-OHDA ou MPTP, pour induire une dégénérescence totale de la voie DA nigrostriée. En effet, ces études mettaient en évidence une altération motrice importante chez les animaux lésés⁶ (Burns et al., 1983; Chiueh, 1988; Ungerstedt, 1968; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). *A contrario*, l'implication de la voie DA mésolimbique dans des maladies psychiatriques, telles que la schizophrénie ou l'addiction, a amené les spécialistes du domaine à considérer cette voie comme impliquée dans les processus motivationnels et émotionnels (Koob, 1992; Meltzer and Stahl, 1976).

Cette vision dichotomique a, cependant, été remise en cause au cours des 20 dernières années (Wise, 2009). En effet, différents rapports cliniques ont décrit que les patients atteints de la maladie de Parkinson présentaient des symptômes neuropsychiatriques tels que l'anxiété, la dépression et l'apathie. Si l'apparition de ces symptômes aurait été expliquée par la dégénérescence de la voie DA mésolimbique survenant dans les stades plus tardifs de la maladie de Parkinson, ces symptômes s'exprimaient déjà stade précoce de la pathologie alors même que la voie DA mésolimbique n'était pas encore atteinte (Chaudhuri et al., 2006; Chaudhuri and Schapira, 2009; Poewe, 2008). Afin d'étudier la base neurobiologique de ces troubles, notre laboratoire a développé un modèle de lésion partielle et bilatérale de la voie DA nigrostriée chez le rat. Cette lésion partielle permet de conserver les capacités motrices des rats et d'étudier le rôle de cette voie dans les processus motivationnels et émotionnels sans biais moteur (Drui et al., 2014). En utilisant différentes tâches comportementales, notre laboratoire a montré qu'une altération partielle de la voie DA nigrostriée induisait des comportements de type dépressifs et anxieux ainsi que d'importants déficits motivationnels (Figure 16) (Carnicella et al., 2014a ; Drui et al., 2014 ; Favier et al., 2017, 2014).

⁶ De manière intéressante, les premiers travaux d'Ungerstedt utilisant une lésion bilatérale de la voie DA nigrostriée par la 6-OHDA, n'ont pas décrit de problème moteur chez les animaux mais plutôt un phénotype de type apathique avec de l'adipsie, de l'aphagie, une perte de curiosité et des difficultés pour initier une activité.

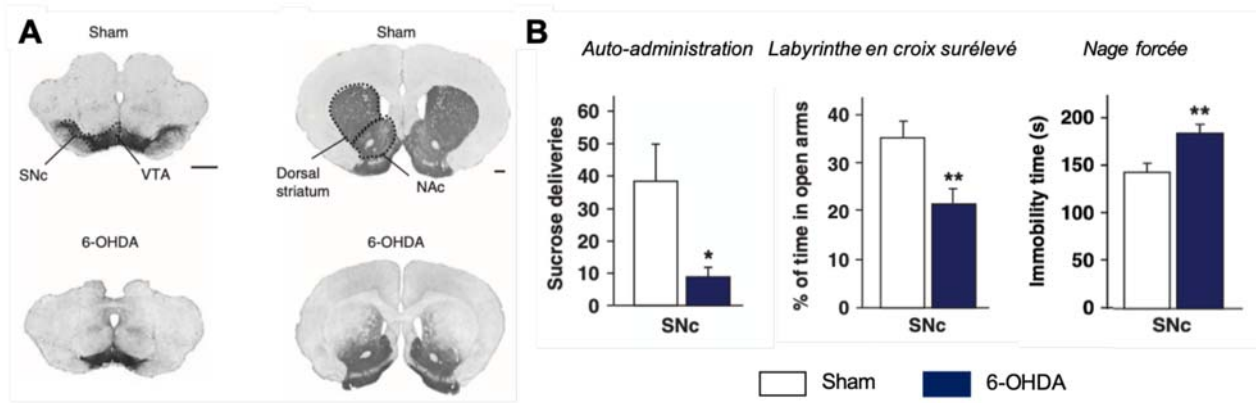


Figure 16 : Implication de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés et affectifs.

(A) L'injection de 6-OHDA, au niveau de la SNc, induit une dégénérescence partielle de la voie DA nigrostriée. Carnicella et al., 2014. (B) Bien que les animaux ne présentent pas de symptôme moteur, ils présentent des déficits motivationnels en auto-administration, des comportements de type anxieux dans le test du labyrinthe en croix surélevé et des comportements de type dépressifs dans le test de la nage forcée. Adapté de Drui et al., 2014.

Par ailleurs, dans un cadre non-parkinsonien, plusieurs études ont également démontré que la stimulation par optogénétique des neurones de la SNc était suffisante pour médier des signaux appétitifs et renforcer les comportements motivés (Da Silva et al., 2018 ; Ilango et al., 2014 ; Rossi et al., 2013 ; Steinberg et al., 2013). Enfin, des études de neuro-imagerie chez des patients atteints de schizophrénie semblent même indiquer que le dysfonctionnement de la DA pourrait être plus important au sein de la voie DA nigrostriée que de la voie mésolimbique (Howes O et al., 2011 ; Howes et al., 2013 ; Kegeles et al., 2010).

À la lumière de ces travaux, il semble important d'abandonner cette vision dichotomique trop simpliste et de considérer les voies DA mésolimbique et nigrostriée comme un ensemble fonctionnel permettant de moduler les comportements motivés de l'individu.

II. Le striatum, de l'intention à la réalisation de l'action

Le striatum représente le point d'entrée des Ganglions de la Base, un ensemble de structures sous-corticales impliquées dans les traitements des informations limbiques, cognitives et sensorimotrices. Cette structure peut être divisée en trois parties : le striatum limbique, le striatum associatif et le striatum sensorimoteur (Figure 17) (Graybiel, 2008 ; Yin and Knowlton, 2006).

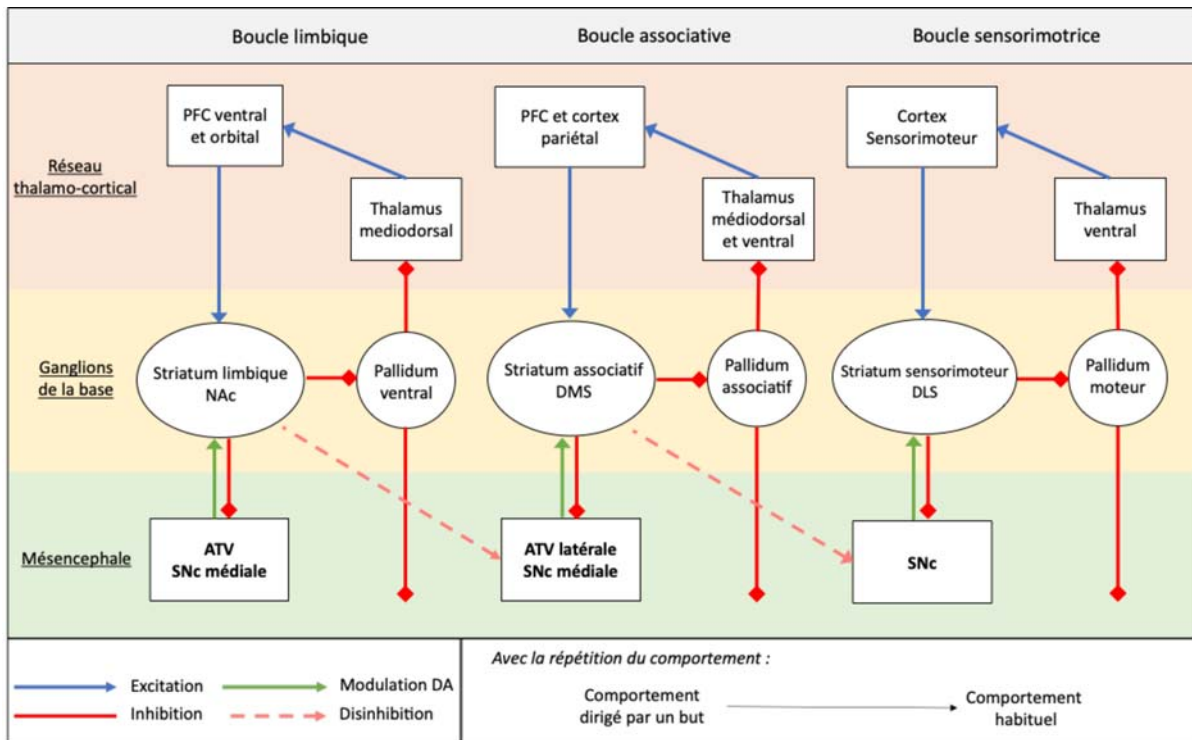


Figure 17 : Le striatum comme centre d'intégration des informations limbiques, associatives et motrices au sein des ganglions de la base.

Au sein des différentes boucles, le striatum reçoit un signal du cortex et du mésencéphale. Après avoir intégré ces deux signaux, le striatum transmet alors l'information au niveau du pallidum, une autre structure des ganglions de la base. Le striatum renvoie également un message au niveau du mésencéphale ce qui permettra la propagation du signal. Adapté de Yin and Knowlton, 2006

A. Le NAc ou striatum « limbique »

Le NAc, sous structure du striatum ventral ou « striatum limbique », se situe à l'interface entre le système limbique et le système moteur (Mogenson et al., 1980). À ce titre, cette structure reçoit, en plus de l'innervation DA de l'ATV et de la SNc, d'importantes afférences de la part du cortex préfrontal, du cortex insulaire, de l'amygdale et de l'hippocampe (Haber, 2016 ; Parkes et al., 2015). En intégrant les informations provenant de l'ensemble de ces structures, le NAc est associé aux processus récompensants ou aversifs, ainsi qu'aux processus motivationnels et émotionnels (Piña et al., 2018). Cette structure permet également d'évaluer l'utilité d'un comportement afin de sélectionner uniquement les actions les plus appropriées pour l'individu (Kroemer et al., 2016 ; Nicola, 2007 ; Redgrave et al., 2010).

B. Le striatum dorsal, entre cognition et motricité

Chez le rat, le striatum dorsal peut être divisé en deux parties : le striatum dorso-médial (DMS) et le striatum dorso-latéral (DLS), correspondant respectivement au Noyau Caudé et au Putamen chez l'homme (Balleine and O'Doherty, 2010).

Le DMS, également appelé « striatum associatif » reçoit des afférences du cortex préfrontal, et des parties associatives du cortex pariétal. Il reçoit également des innervations DA de l'ATV latérale et de la SNc médiale (Coutureau and Parkes, 2018 ; Hintiryan et al., 2016 ; Pennartz et al., 2009 ; Yin and Knowlton, 2006). Le DMS joue un rôle crucial dans l'apprentissage et l'expression des comportements dirigés par un but (Balleine and O'Doherty, 2010 ; Yin and Knowlton, 2006). Ces comportements se basent sur une association entre une action et sa conséquence (association de type réponse – récompense) et sont notamment caractérisés par un coût cognitif important et une grande flexibilité comportementale (Amaya and Smith, 2018 ; Lipton et al., 2019). Sous le contrôle du DMS, les comportements dirigés par un but permettent à l'individu d'orienter son comportement en fonction de la conséquence associée à l'action qu'il va réaliser, mais également de s'adapter en modifiant son comportement lorsque la conséquence associée à l'action est modifiée (Malvaez and Wassum, 2018). A ce titre, l'inactivation du DMS rend l'animal insensible aux changements de valeur de récompense, et l'animal poursuit son action même si la valeur de la récompense est dévaluée (Yin et al., 2005 ; Yin and Knowlton, 2004).

Le DLS, ou « striatum sensorimoteur », possède un rôle majeur dans les processus moteurs, tels que la réalisation d'actions, et reçoit de nombreuses afférences du cortex moteur et pré-moteur ainsi que du cortex somato-sensoriel. Enfin, cette sous-division est également innervée par les neurones DA situés dans la partie plus latérale de la SNc (Hintiryan et al., 2016 ; Pennartz et al., 2009 ; Yin and Knowlton, 2006). En plus de son implication dans les processus moteurs, le DLS est particulièrement impliqué dans la formation et la réalisation des comportements habituels⁷ (Yin et al., 2004). Ces comportements se basent sur une

⁷ Les termes de comportements habituels et de compétences sont parfois confondus. S'il existe un lien direct entre les habitudes et les compétences, les compétences réfèrent à la nature qualitative de l'action réalisée (ex. mettre le dentifrice sur la brosse à dents puis se brosser les dents). Les comportements habituels correspondent à des séquences comportementales qui gouvernent l'initiation et la réalisation d'une action sous l'influence d'un stimulus (ex. se brosser les dents avant d'aller au lit).

association entre un stimulus et une action (association de type stimulus – réponse). Ils sont réalisés de manière quasi-automatique et sont indépendants de la valeur de la récompense associée à l'action réalisée (Graybiel, 2008 ; Lipton et al., 2019 ; Yin and Knowlton, 2006). Sous la dépendance du DLS, les comportements habituels permettent d'effectuer des actions quotidiennes avec une grande efficacité et un faible coût cognitif (Malvaez and Wassum, 2018 ; Turner and Parkes, 2020).

Au sein du striatum dorsal, le DMS et le DLS fonctionnent de concert et permettent la réalisation de comportements motivés particulièrement élaborés (Fogel et al., 2017 ; Redgrave et al., 2010 ; Tanaka et al., 2008 ; Tricomi et al., 2009). Lorsque la séquence comportementale nécessite la réalisation d'un comportement habituel, le DLS est activé. Inversement, lorsque la séquence comportementale mise en place nécessite la réalisation d'un comportement dirigé par un but, le DMS est activé. Il est important de noter ici, que la structure striatale et le type de comportement gouvernant la réalisation d'une action peuvent également évoluer (Dickinson et al., 1985 ; Graybiel, 2008). En effet, dans un paradigme d'auto-administration, où l'animal obtient une récompense en réalisant une action à intervalle de temps défini (intervalle fixe, FI), la répétition d'un même comportement, initialement dirigé par un but, aboutit à la formation d'un comportement habituel. Cette évolution est, finalement, corrélée à une diminution progressive de l'activité du DMS et une augmentation croissante de l'activité du DLS (Gremel et al., 2016; Gremel and Costa, 2013). Enfin, la voie DA nigrostriée semble également jouer un rôle important dans la formation des comportements habituels puisque la dégénérescence de cette voie empêche le développement de ce type de comportement (Faure et al., 2005).

C. La transmission de l'information du NAc au striatum dorsal

Longtemps considérés comme indépendants, les systèmes limbique, associatif et moteur communiquent et permettent à l'individu de produire un comportement adapté à ses besoins et à son environnement (Balleine and O'Doherty, 2010 ; Yin and Knowlton, 2006). Cette communication pourrait être permise par l'existence de boucles spiralées entre le striatum et le mésencéphale, mais également entre le striatum et le cortex (Figure 18) (Haber and Knutson, 2010). En effet, les travaux de SN. Haber et B. Knutson ont mis en évidence

l'existence de boucles spiralées issues de la partie la plus ventrale du striatum qui se projettent, de proche en proche, jusqu'aux parties les plus dorsales de cette structure. Au sein de la circuiterie striato-méso-striatale, les neurones DA de l'ATV et de la SNc sont particulièrement impliqués et permettent le relai des informations en couvrant, sous la forme d'un continuum médio-latérale, l'ensemble du striatum. Par l'intermédiaire de ces boucles, les informations limbiques, associatives et motrices générées aux seins des différents systèmes seraient alors intégrées en parallèles et coordonnées afin de produire le comportement adapté.

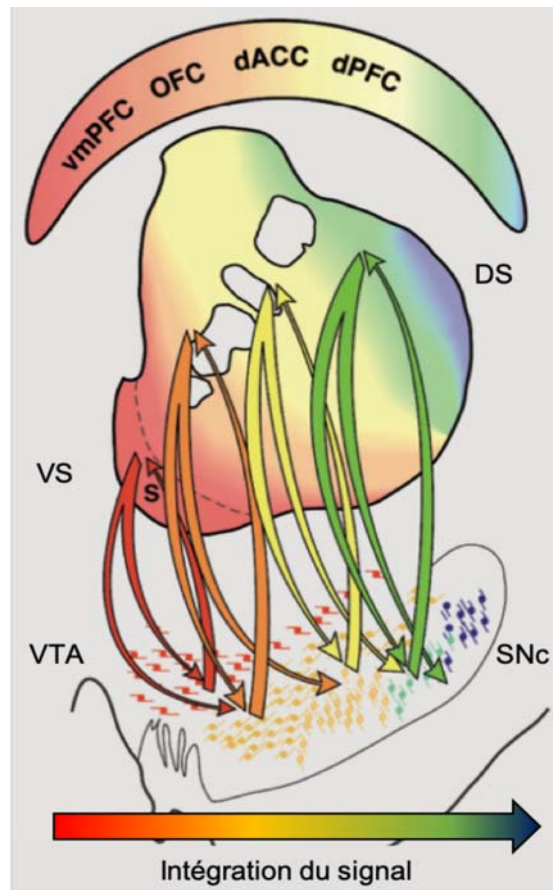


Figure 18 : Les connexions spiralées selon Haber et Knutson.

dACC : cortex cingulaire antérieur dorsal ; dPFC : cortex préfrontal dorsal ; DS : striatum dorsal ; OFC : cortex orbito-frontal ; vmPFC : cortex préfrontal médioventral ; VS : striatum ventral. Adapté de Haber et al. 2016.

III. Rôles et fonctions du système DA

La DA tient une place centrale dans le processus récompensant. Une récompense, selon KC. Berridge, se dissocie en trois composantes psychologiques majeures : l'apprentissage, la motivation et le plaisir ou « *learning, wanting, liking* » (Berridge et al., 2009). L'apprentissage renvoie à l'association entre un stimulus ou une action et la récompense obtenue. La motivation correspond à l'envie, suscitée par la présentation du stimulus, d'obtenir la récompense. Enfin, le plaisir, se réfère aux propriétés hédoniques de la récompense (Berridge, 2012). Dans des conditions physiologiques, ces trois facteurs interagissent et permettent à l'individu de connaître les récompenses qu'il préfère, de savoir comment les obtenir et enfin, d'énergiser les comportements menant à leurs obtentions. Le rôle de la DA dans ces différentes composantes a été très discuté au cours des dernières années et reste aujourd'hui encore une source de débats pour les spécialistes du domaine (Berridge, 2007; di Chiara and Bassareo, 2007).

A. DA, apprentissage associatif et renforcement de l'action

Le rôle de la DA dans les processus d'apprentissage associatif et de renforcement d'une action fut mis en évidence, à la fin du 20ème siècle, grâce aux travaux d'électrophysiologie de W. Schultz et de ses collaborateurs (Hollerman and Schultz, 1998; Montague et al., 2004; Schultz, 2016, 1998; Schultz et al., 1997). Ces études portant sur l'enregistrement de l'activité des neurones DA de l'ATV et de la SNc, chez le singe, ont montré que les neurones DA produisaient des salves phasiques d'activité en réponse à l'obtention d'une récompense inattendue (Figure 19A). Avec la répétition de l'expérience, ils observèrent également que les neurones DA n'étaient plus activés au moment de l'obtention de la récompense, mais plutôt au moment de la présentation du stimulus prédicteur de celle-ci, lorsque la récompense n'était pas modifiée (Figure 19B). Cependant, si la valeur de la récompense était plus importante que celle prédite, les neurones s'activaient au moment du stimulus prédicteur, et encore plus intensément au moment de l'obtention de la récompense (Figure 19C). Inversement, si la récompense était moins importante que prévue, ou absente, les neurones DA étaient alors fortement inhibés (Figure 19D) (Hollerman and Schultz, 1998; Schultz et al., 1997). Ces résultats ont finalement conduit W. Schultz à proposer le mécanisme d'erreur de prédiction de la récompense (RPE), par laquelle l'activité phasique des neurones DA permet

de signaler la différence de quantité, de type ou de délai, entre la récompense qui est reçue et la récompense qui était prédite (Schultz, 1998). Le RPE permettrait, *in fine*, une mise à jour de la valeur des stimuli entourant l'individu et des actions réalisées par ce dernier, en renforçant uniquement les stimuli et les actions menant à l'obtention d'une récompense (Coddington and Dudman, 2019; Schultz, 2016). Cette hypothèse fut ensuite renforcée par d'autres travaux d'électrophysiologie (Bayer and Glimcher, 2005; Roesch et al., 2007), mais également de voltamétrie cyclique au niveau du NAc ce qui a permis de corréliser les variations d'activité des neurones DA du mésencéphale avec des variations phasiques de DA au niveau du striatum au cours de tâches instrumentales chez le rongeur (Day et al., 2007; Hart et al., 2014).

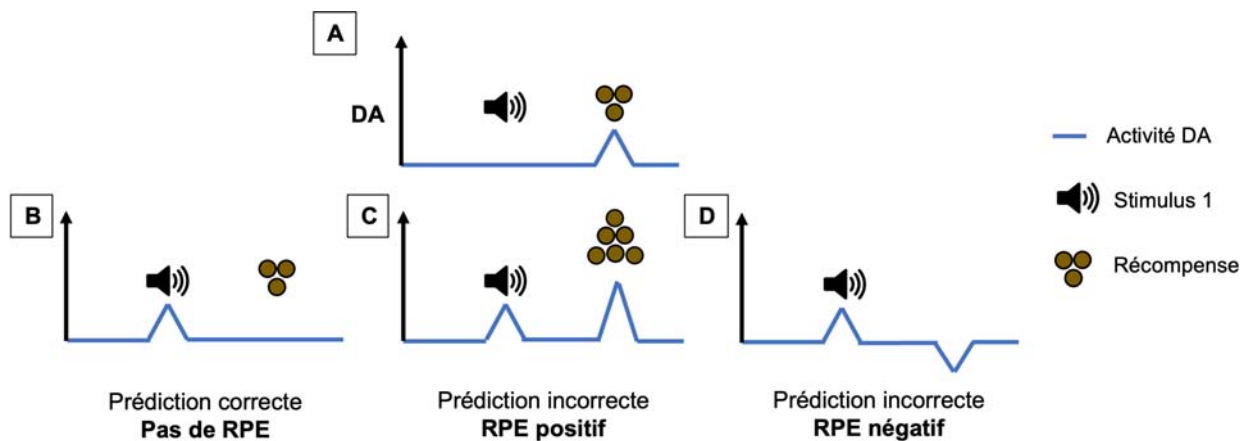


Figure 19 : L'activité phasique des neurones DA encode le mécanisme d'erreur de prédiction de la récompense.

(A) Avant l'apprentissage, la récompense est inattendue et conduit à l'activation phasique des neurones DA au moment de la récompense. (B - D) Après l'apprentissage, les neurones DA s'activent au moment du stimulus prédicteur de la récompense. (B) Si la prédiction est correcte, les neurones DA ne sont pas activés au moment de la récompense et il n'y a pas de RPE. (C) Lorsque la prédiction est incorrecte et que la récompense obtenue est plus importante que prévu, les neurones DA sont encore plus activés, créant un RPE positif. (D) Lorsque la prédiction est incorrecte et que la récompense n'est pas obtenue, les neurones DA sont inhibés, créant un RPE négatif. Adapté de Schultz, 1998.

Plus récemment, les équipes de PH. Janak et de G. Schoenbaum ont utilisé l'optogénétique, pour mimer ou bloquer, de façon artificielle, l'activité phasique des neurones DA. Au sein de l'ATV, l'activation phasique des neurones DA, mimant un RPE positif, permet d'associer un nouveau stimulus à une récompense, mais également de renforcer la réalisation d'une action (Figure 20A) (Keiflin et al., 2019; Steinberg et al., 2013; Witten et al., 2011). Inversement, le blocage de l'activation des neurones DA, en présence d'une récompense inattendue, empêche l'apprentissage associatif entre le stimulus prédicteur de la

récompense et celle-ci (Figure 20B) (Chang et al., 2017). Enfin, l'inhibition phasique de ces neurones, mimant un RPE négatif, permet de diminuer la force associative entre un stimulus et une récompense (Figure 20C) (Chang et al., 2015). L'ensemble de ces résultats a donc permis d'établir un lien causal entre l'activité phasique des neurones DA de l'ATV et les processus d'apprentissage associatif. Au sein de la SNc, l'activation phasique des neurones DA, mimant un RPE positif dans cette zone, ne permet pas d'associer un nouveau stimulus à une récompense (Keiflin et al., 2019). Ce signal joue, cependant, un rôle clé dans les processus de renforcement puisque l'activation phasique de ces neurones permet de répéter la réalisation d'une action motivée (Keiflin et al., 2019; Saunders et al., 2018).

Finalement, l'activité phasique des neurones DA de l'ATV encoderait le RPE, un mécanisme idéal pour favoriser les comportements permettant d'obtenir une récompense. Ces neurones permettraient, *in fine*, de mettre à jour la force associative entre un stimulus et la récompense obtenue, afin de créer de nouvelles associations ou de supprimer les associations qui ne seraient plus pertinentes. Les neurones DA de la SNc quant à eux, auraient un rôle plus général dans la motivation et permettraient d'énergiser une action en réponse à un stimulus préalablement lié à une récompense (Keiflin et al., 2019; Saunders et al., 2018).

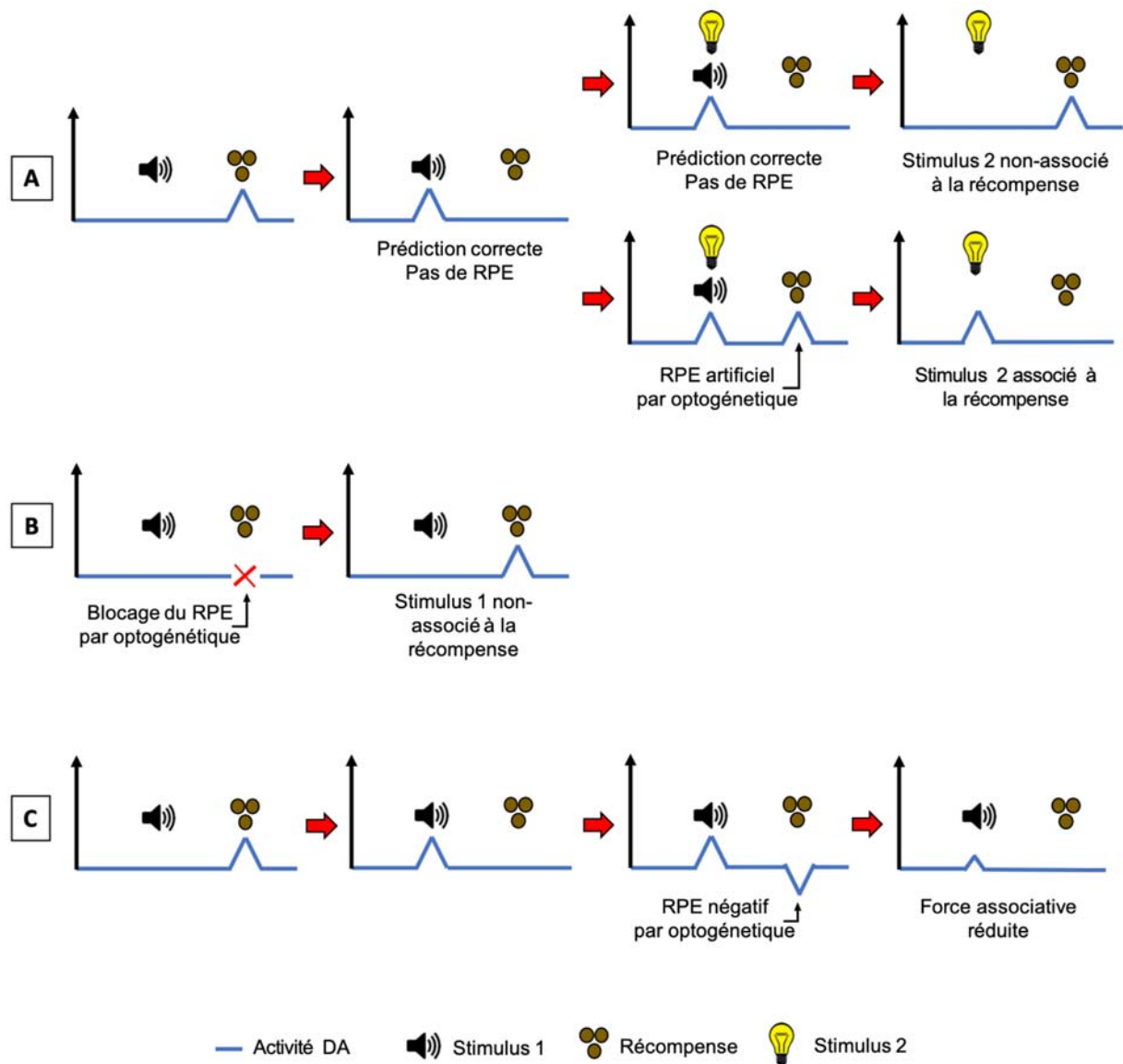


Figure 20 : Implication causale de l'activité DA phasique dans l'apprentissage associatif.

(A) L'activation phasique des neurones DA permet d'associer un nouveau stimulus à une récompense. Le stimulus 1 est tout d'abord associé à l'obtention de la récompense. Un deuxième stimulus (stimulus 2) est ensuite ajouté de manière concomitante au stimulus 1. La récompense, préalablement associée au stimulus 1, n'induit aucun RPE et n'est pas associée au stimulus 2, c'est le phénomène de « blocking ». Si un RPE est créé, au moment de l'obtention de la récompense, alors le stimulus 2 est associé à la récompense. **(B)** Le blocage de l'activation des neurones DA lors de l'obtention de la récompense empêche l'apprentissage associatif entre la récompense et le stimulus 1. **(C)** L'inhibition des neurones DA lors de l'obtention de la récompense diminue la force associative entre la récompense et le stimulus 1.

B. La DA, entre motivation et plaisir

En complément du rôle de la DA dans la composante « apprentissage », TE. Robinson, KC. Berridge, ainsi que d'autres auteurs, ont étudié l'importance de la DA dans les composantes motivationnelles et hédoniques de la récompense. Ainsi, des rongeurs présentant une déficience en DA induite par une lésion neurochimique ou par modification génétique, conservent leurs réactions oro-faciales en réponse à l'obtention d'une solution sucrée ou amère, suggérant que la DA n'est pas impliquée dans la composante hédonique de la récompense (Berridge et al., 1989; Berridge and Robinson, 1998; Cannon and Palmiter, 2003). Lorsque ces animaux sont soumis à un paradigme de choix à deux bouteilles, entre une solution d'eau ou de saccharose, la réduction drastique de l'activité comportementale induite par la déplétion DA conduit à une diminution importante de la consommation. Les animaux déplétés conservent, cependant, leurs préférences pour la solution sucrée (Cannon and Palmiter, 2003). Inversement, l'augmentation des quantités extracellulaires de DA par stimulation électrique, par utilisation d'amphétamine ou par modification génétique, augmente la motivation des animaux pour obtenir une récompense. Les réactions oro-faciales associées à son obtention ne sont toutefois pas augmentées (Berridge and Valenstein, 1991; Peciña et al., 2003; Smith et al., 2011; Wyvell and Berridge, 2000). Des études cliniques étayent également ces résultats. Ainsi, dans ces études de neuro-imageries, les variations de DA au niveau striatal sont davantage corrélées avec l'envie (« wanting ») de consommer une drogue ou de la nourriture, plutôt qu'avec le plaisir (« liking ») que sa consommation procure (Evans et al., 2006; Leyton et al., 2002). L'ensemble de ces travaux a confirmé l'implication de la DA dans la composante motivationnelle et écarté son implication dans la composante hédonique au sens strict. Ces résultats renforcent également la théorie de l'« incentive motivation », ou motivation incitatrice, proposée par TE. Robinson et KC. Berridge (Berridge, 2018, 2007, 2000; Berridge and Robinson, 2016, 1998). Dans cette théorie, la motivation incitatrice représente la force d'attraction ou de répulsion d'un stimulus, en fonction de l'historique qui lui est associé. Ainsi, les stimuli présents dans l'environnement d'un individu, agissent comme des aimants motivationnels et orientent le comportement de celui-ci afin de favoriser les situations récompensantes et diminuer les situations aversives (Berridge, 2012). Bien que cette théorie ait initialement placé le signal DA comme un signal purement motivationnel, et non comme un signal d'apprentissage (Berridge, 2007), les mécanismes de

motivation incitatrice et de RPE ne sont pas antinomiques. Au niveau du NAc, plusieurs études suggèrent que les variations de DA du NAc core seraient impliquées dans l'apprentissage associatif, alors que les variations de DA du NAc shell seraient impliquées dans les processus motivationnels (Heymann et al., 2020; Saddoris et al., 2015; Saunders et al., 2018). Il est donc possible que la force d'attraction ou de répulsion d'un stimulus soit apprise grâce aux RPE et s'exprime ensuite par l'intermédiaire de la motivation incitatrice.

Finalement, l'apprentissage serait « tourné vers le passé », mettant à jour les valeurs des stimuli précédemment associés à la récompense, alors que la motivation serait « tournée vers le futur », énergisant l'action à entreprendre (Berke, 2018).

C. Le signal DA tonique, motivation générale et maintien de l'effort

Si les variations d'activité phasique du système DA jouent un rôle clé dans les processus d'apprentissage associatif et dans la motivation incitatrice, l'activité tonique de ce système semble également avoir un rôle majeur dans la motivation générale et le maintien de l'effort (Drui et al., 2014; Palmiter, 2008; Salamone et al., 2016; Schultz, 2016). En effet, JD. Salamone et ses collaborateurs ont utilisé une procédure dans laquelle des animaux possédant une lésion DA dans le NAc avaient le choix entre une petite et une grosse récompense. Dans cette procédure, et malgré la lésion, les rats préféraient consommer la récompense possédant la valeur la plus importante⁸. Cependant, lorsqu'un effort important était demandé pour obtenir la grosse récompense, les animaux se tournaient alors vers la plus petite⁹ (Cousins et al., 1996). De plus, dans un paradigme comportemental d'auto-administration où l'effort demandé pour obtenir une récompense augmente entre les sessions (ratio progressif inter-sessions), les animaux lésés obtenaient moins de récompenses que les animaux contrôles au fur et à mesure que le nombre d'appuis pour obtenir la récompense augmentait (Aberman and Salamone, 1999). Inversement, une étude a plus récemment montré que l'augmentation d'activité tonique de la voie DA mésolimbique par chémozogénétique, permettait d'améliorer les performances de l'animal dans un paradigme comportemental d'auto-administration où

⁸ Ces résultats confirment également l'absence du rôle de la DA dans les processus hédoniques puisque l'animal conserve la préférence pour la récompense possédant la valeur la plus importante malgré la déplétion de DA.

⁹ Il est intéressant de noter que lorsque les animaux lésés ont le choix entre « effort important = grosse récompense » ou « aucun effort = absence de récompense » les animaux préfèrent fournir un effort important et obtenir la récompense. À la dimension motivationnelle s'ajoute alors le rapport coût/bénéfice.

l'effort demandé pour obtenir une récompense augmentait de manière exponentielle au cours de la session (ratio progressif intra-sessions) (Boender et al., 2014).

Les travaux s'intéressant au rôle tonique de la DA dans la motivation se sont principalement focalisés sur la voie DA mésolimbique. Cependant, l'équipe de RD. Palmiter s'est également intéressé au rôle de ce neurotransmetteur au niveau du striatum dorsal (Palmiter, 2008). En effet, ce laboratoire a utilisé des souris déficientes en DA et a restauré la transmission DA uniquement dans le striatum dorsal. Contrairement aux animaux présentant une déficience totale en DA, ces animaux étaient capables de fournir un effort comparable à celui fourni par les animaux contrôles, en auto-administration en ratio progressif intra- et inter-sessions (Robinson et al., 2007). Ces résultats soulignent l'importance du tonus DA au niveau du striatum dorsal dans la motivation générale et le maintien de l'effort. Ils confortent également les résultats obtenus par notre laboratoire démontrant qu'une lésion partielle de la voie DA nigrostriée induit, chez les animaux lésés, un déficit motivationnel sévère (Carnicella et al., 2014a; Drui et al., 2014; Favier et al., 2017).

D. Des motivations plutôt qu'une motivation

Le système DA, dans son ensemble module l'expression des comportements motivés, de leurs idéations jusqu'à leurs réalisations. Dès lors, plutôt que d'évoquer le rôle de la DA dans la motivation, il pourrait être plus approprié d'évoquer le rôle de ce neurotransmetteur dans les motivations (Berke, 2018).

La première motivation, limbique (NAc), permettrait à l'individu d'évaluer les ressources disponibles, le coût d'une action et le bénéfice associé à celle-ci afin de sélectionner le comportement le plus approprié (Cousins et al., 1996; Phillips et al., 2007; Salamone et al., 2016; Walton and Bouret, 2019). Cette évaluation reposerait principalement sur les stimuli présents dans l'environnement de l'individu, son état physiologique ainsi que son expérience. La motivation limbique serait également impliquée dans les processus récompensants demandant un coût important pour l'individu, comme un effort prolongé de la part de celui-ci où beaucoup d'actes ne sont pas récompensés immédiatement mais conduisent, *in fine*, à l'obtention d'une récompense (Aberman and Salamone, 1999; Nicola, 2010; Salamone and Correa, 2012).

La seconde motivation, cognitive (DMS), orienterait le comportement de l'individu afin de le diriger vers un but pertinent. Cette motivation serait importante pour traduire l'incentive motivation en un effort cognitif, et mettrait notamment en jeu les processus de flexibilité et d'inhibition comportementale, la mémoire de travail et les processus attentionnels (Berke, 2018; Westbrook and Braver, 2016). Au sein de cette composante motivationnelle, la DA aurait un rôle double en facilitant l'investissement de l'individu dans un effort cognitif et en stimulant la mémoire de travail impliquée dans les processus de décision, de raisonnement et d'optimisation du comportement (Cools et al., 2019; McGuigan et al., 2019; Westbrook and Braver, 2016).

La dernière motivation, motrice (DLS), aurait un rôle important dans l'initiation et la réalisation des actions et des comportements sélectionnés par l'individu (Berke, 2018; Da Silva et al., 2018; Mazzone et al., 2007). Cette motivation, moins sélective et moins flexible que les motivations évoquées précédemment, serait fondamentale pour la réalisation d'un acte moteur. La DA aurait pour rôle d'énergiser les actions appropriées tout au long de sa réalisation (Keiflin et al., 2019; Saunders et al., 2018). Des niveaux élevés de DA au niveau de cette région striatale favoriseraient ainsi l'initiation et la réalisation d'une action, tandis qu'une altération de cette composante motivationnelle induirait chez l'individu un état apathique important (Berke, 2018; Da Silva et al., 2018; Howe and Dombek, 2016; Mazzone et al., 2007).

IV. Le modèle Acteur/Critique

Au cours de ce deuxième chapitre, nous avons exposé le rôle crucial de la DA dans les apprentissages associatifs et la motivation. Nous avons également montré que la voie DA nigrostriée n'était pas une voie purement motrice mais, à l'instar de la voie DA mésolimbique, qu'elle possédait un rôle majeur dans les processus motivationnels. Les fonctions motivationnelles sous-tendues par ces deux voies semblent cependant distinctes. En effet, le comportement peut à la fois être énergisé par les neurones DA de l'ATV ou de la SNc, alors que seuls les neurones DA de l'ATV sont responsables du mécanisme de RPE (Keiflin et al., 2019).

Parmi les différents modèles proposés pour modéliser le fonctionnement intégré des ganglions de la base, le modèle « acteur-critique » a gagné en intérêt au cours des 20 dernières années (Barto, 1995; Fouyssac and Belin, 2019; Joel et al., 2002; Niv, 2009; Niv and Schoenbaum, 2008; Suri and Schultz, 1999). Ce modèle se base sur la coopération entre un système d'analyse, le « critique », et un système de réalisation, l'« acteur ». Le système « critique » va permettre d'évaluer l'environnement de l'individu en attribuant une valeur « prédictive » aux différents stimuli présents autour de lui. Plus le stimulus sera associé à l'obtention d'une récompense, plus cette valeur « prédictive » sera élevée. Basé sur ces informations, le système « acteur » réalisera le comportement permettant de maximiser l'obtention de la récompense. À la fin de la séquence comportementale, le système « critique » évaluera les actions effectuées par le système « acteur » en comparant la récompense obtenue à la récompense prédite. Ce retour améliorera le fonctionnement des systèmes afin de maximiser l'obtention des récompenses futures.

Au sein du modèle « acteur-critique », la voie DA mésolimbique pourrait appartenir au système « critique » tandis que la voie DA nigrostriée appartiendrait au système « acteur » (Keiflin et al., 2019). Le gradient de projection anatomo-fonctionnel de l'ATV vers la SNc, représenté au niveau du striatum par un gradient du NAc vers le DLS, se traduirait ainsi par un gradient du système « critique » vers le système « acteur » (Figure 21) (Takahashi et al., 2009; Westbrook and Braver, 2016). Le NAc aurait, à sa charge, l'analyse critique et la sélection des actions à réaliser, avec une très grande flexibilité dans l'apprentissage des associations stimulus-récompense, permettant à l'individu d'adapter son comportement à des situations nouvelles, changeantes ou inattendues (Coddington and Dudman, 2019). Le DMS aurait un rôle pivot, et associerait l'analyse critique avec la réalisation de l'action, ce qui pourrait expliquer son rôle majeur dans les comportements dirigés par un but (Yin et al., 2005). Enfin, le DLS posséderait un rôle restreint à la réalisation de l'action, avec peu de flexibilité, ce qui permettrait de réaliser certaines actions de manière stéréotypée, et expliquerait son rôle majeur dans les comportements habituels (Yin and Knowlton, 2006). Les connexions spiralées, évoquées précédemment, joueraient un rôle clé dans la communication de ces deux systèmes, en permettant la propagation du signal du striatum ventral vers le striatum dorsal (Haber and Knutson, 2010). Au cœur de ce modèle, les motivations « limbique, cognitive, motrice », sous

tendues par les voies DA mésolimbique et nigrostriée, modulerait l'activité des systèmes « critique » et « acteur », en modulant l'activité du NAc, du DMS et du DLS (Takahashi et al., 2009).

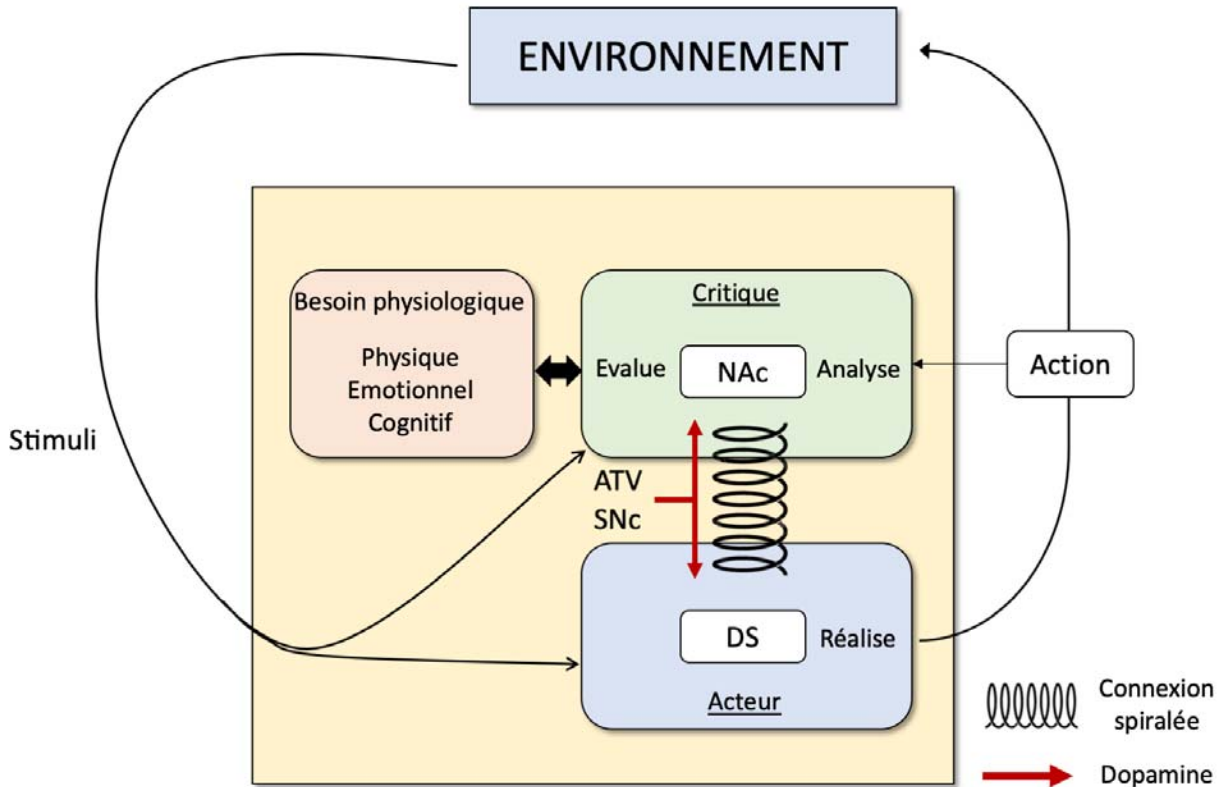


Figure 21 : Le modèle acteur / critique adapté au système DA.

Dans ce modèle, les stimuli arrivent au niveau du NAc et du striatum dorsal (DS). En réponse à ces stimuli, les actions ne nécessitant pas un effort émotionnel, cognitif ou physique particulier seront effectuées de manière quasi automatique par le DS. Les actions nécessitant un effort particulier seront évaluées au niveau du NAc, selon un rapport coût/bénéfice, en fonction de l'état physiologique de l'individu et de la valeur prédictive associée aux stimuli afférents. Une action, la plus adaptée possible, sera finalement sélectionnée et le signal sera ensuite transmis au DS, par l'intermédiaire des connexions spiralées, pour que l'action soit réalisée. La dopamine joue un rôle crucial dans le fonctionnement de ce modèle en modulant l'activité de ces deux systèmes. Adapté de Takahashi et *al.*, 2009.

Au cours du premier chapitre, le système DA est apparu comme une cible majeure de la molécule d'éthanol. Dans ce deuxième chapitre nous avons évoqué le rôle crucial de la DA dans les processus d'apprentissage associatif et les comportements motivés. Dans le dernier chapitre, nous allons nous focaliser sur le fonctionnement de ce système dans un cadre pathologique, celui de l'alcoolodépendance. Cette maladie pourrait, finalement, se placer à la croisée des chemins entre un apprentissage associatif biaisé et une motivation pathologique pour l'alcool.

Partie 3 : L'addiction, un trouble de l'apprentissage associatif et des motivations

I. Le NAc, une porte d'entrée vers l'addiction

À la suite des travaux d'A. Imperato et G. Di Chiara qui ont identifié les premiers effets pharmacologiques des substances d'abus sur le système DA, le NAc est devenu une cible d'étude privilégiée dans l'étude de l'addiction aux drogues. Un des enjeux majeurs a ainsi été de mieux caractériser les conséquences de l'augmentation des niveaux de DA induite par les substances d'abus au niveau de la voie mésolimbique (Engel and Jerlhag, 2014; Lüscher and Janak, 2021; Malenka et al., 2009; Solinas et al., 2019). Si l'état hyperdopaminergique induit par la consommation de drogue est transitoire et réversible dans le cas d'une consommation ponctuelle, la consommation chronique va conduire à l'apparition progressive d'un signal DA dysfonctionnel au sein du NAc (Saddoris et al., 2016; Self, 2004; Wolf, 2016). L'apprentissage associatif, la motivation limbique et, finalement, le système « critique » d'analyse du comportement sont alors altérés.

A. Renforcement positif et dysfonction du RPE

Nous avons précédemment décrit le mécanisme de RPE, un mécanisme clé de l'apprentissage associatif dans lequel l'activité des neurones DA mesure la différence entre la récompense qui est obtenue et la récompense qui était prédite (Schultz, 2016). Nous avons également expliqué qu'avec la répétition de l'expérience, si la prédiction devient exacte, les neurones DA ne s'activent plus au moment de l'obtention de la récompense, mais plutôt au moment du stimulus prédictif de celle-ci. Initialement proposé pour des récompenses dites « naturelles »¹⁰, il semble que ce mécanisme existe également pour les récompenses telles que les substances d'abus (Keiflin and Janak, 2015; Redish, 2004). En effet, des études utilisant la voltamétrie cyclique rapide ont démontré que la consommation de drogue induit une

¹⁰ En opposition aux drogues d'abus, considérées comme des récompenses « non-naturelles » (bien que ceci soit sur le fond inexact), les récompenses « naturelles » sont des récompenses présentes naturellement dans l'environnement de l'individu, et nécessaires à la survie de son espèce. Ces récompenses peuvent être d'ordre social (ex. interaction avec un autre animal), alimentaire (ex. solution sucrée) ou sexuelle (Cannon and Bseikri, 2004; Olsen, 2011)

augmentation de l'activité phasique des neurones DA, et conduit ainsi à des fluctuations de DA dans le NAc, un phénomène similaire à celui observé pour la récompense « naturelle » dans le cadre du RPE (Figure 22A) (Covey et al., 2014; Robinson et al., 2009; Sombers et al., 2009). Avec la répétition de l'expérience, les signaux DA phasiques, initialement restreints au moment de l'obtention de la drogue, sont observés au moment du stimulus prédicteur de la récompense, ce qui met en évidence un apprentissage associatif entre le stimulus prédicteur et la drogue obtenue (Aragona et al., 2009; Phillips et al., 2003; Stuber et al., 2005b). Cependant, à la différence des récompenses « naturelles » qui n'induisent aucun signal DA lorsque la prédiction est correcte, au moment de l'obtention de la substance d'abus, l'activation des neurones DA persiste, même si la récompense est parfaitement prédite (Figure 22B) (Stuber et al., 2005a, 2005b). La drogue induit ainsi un mécanisme de RPE anormalement persistant qui renforce l'association entre le stimulus prédicteur et la substance d'abus à chacune des intoxications¹¹ (Figure 22C) (di Chiara and Bassareo, 2007; Keiflin and Janak, 2015). Afin de démontrer l'implication possible du RPE dysfonctionnel dans l'addiction, l'équipe de C. Lüscher a entraîné des animaux dans une procédure d'auto-stimulation par optogénétique des neurones DA de l'ATV (Pascoli et al., 2018, 2015). Un test a ensuite été réalisé en couplant l'auto-stimulation à la délivrance d'un choc électrique afin d'évaluer le caractère compulsif du comportement réalisé, un des marqueurs clé des comportements de type addictifs. Dans ce test, près de la moitié des animaux continuent à s'auto-stimuler en dépit de la conséquence négative associée à leurs comportements. Il semblerait donc que le RPE anormal et persistant, généré à chaque stimulation, joue un rôle important dans l'expression de la compulsivité⁷ (Lüscher and Janak, 2021). Il faut noter, cependant, qu'il ne peut pas expliquer à lui seul le développement d'un comportement compulsif puisqu'une partie substantielle des animaux qui s'auto-stimulent arrête leurs comportements lors de l'ajout d'une conséquence négative.

La surévaluation des stimuli associés à la drogue et des actions menant à sa consommation pousserait finalement l'individu à favoriser les comportements dirigés vers la substance d'abus et, par conséquent, à minimiser ses comportements dirigés vers d'autres récompenses (Hyman et al., 2006; Saddoris et al., 2016). L'équipe de SH. Ahmed s'est intéressée à la dualité entre les comportements dirigés vers les drogues et les renforçateurs.

¹¹Le RPE et la compulsivité sont deux concepts neuropsychologiques retenus dans le cadre de l'étude « Delphi consensus » évoquée au chapitre 1, et sont considérés comme « primaires » à la compréhension de l'addiction (Yücel et al., 2019).

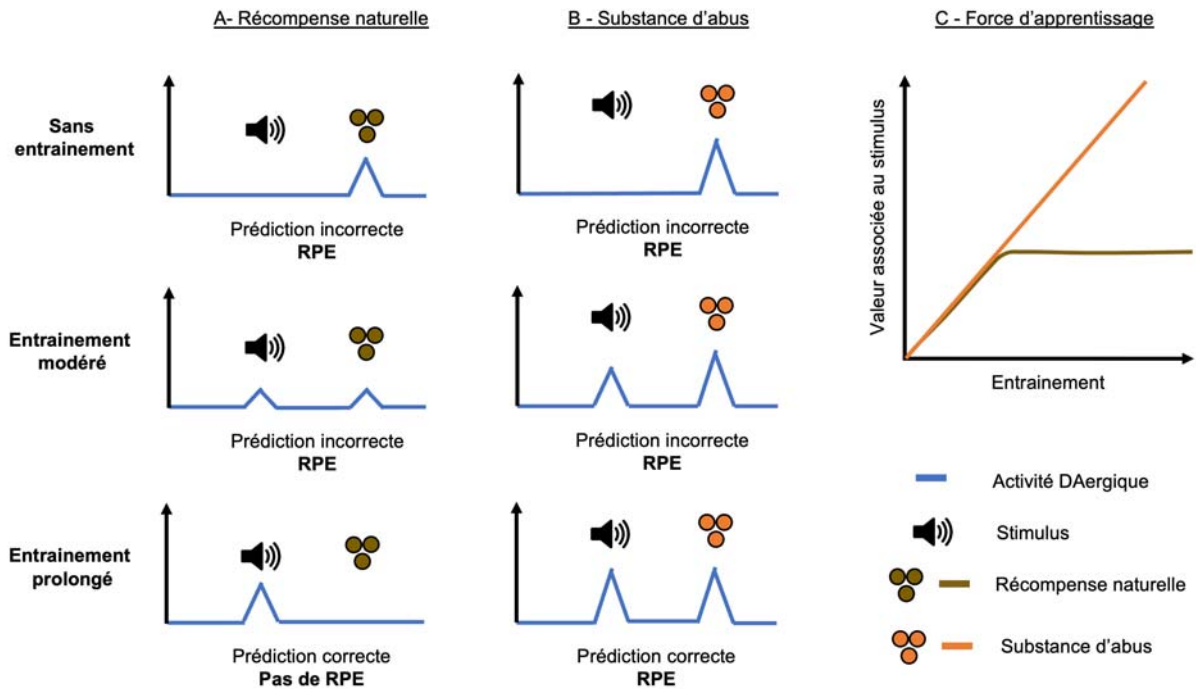


Figure 22: Différence dans l'expression du RPE induit par une récompense naturelle et une drogue : conséquences potentielles sur l'apprentissage associatif.

(A) Avant l'apprentissage, l'obtention inattendue d'une récompense naturelle (nourriture) se traduit par l'induction d'un signal DA phasique et d'un RPE positif. À mesure que les sujets apprennent que le stimulus signale l'arrivée de nourriture, les réponses DA sont transférées de la récompense au signal. (B) Les substances d'abus induisent également un signal DA phasique et un RPE positif lors de leurs obtentions. Comme pour les récompenses naturelles, le signal DA phasique apparaît progressivement au niveau du stimulus. Cependant, la drogue induit également un signal DA phasique au moment de l'obtention de son obtention, et ceux, même au cours d'un entraînement prolongé. (C) Conséquence de la sur-association entre le stimulus et la récompense obtenue. Le RPE évoqué par la récompense favorise l'apprentissage jusqu'à ce que la prédiction corresponde au résultat réel, ce qui se traduit par une association stable après quelques essais. En revanche, le RPE persistant induit par la substance d'abus renforce l'association entre le stimulus et la drogue. Finalement, la valeur associée au stimulus pour la drogue dépasse la valeur associée au stimulus pour la nourriture et peut biaiser la prise de décision en faveur de la drogue. Adapté de Keiflin and Janak, 2015.

naturels. Pour ce faire, cette équipe a proposé un modèle d'étude novateur de la consommation de drogue avec une procédure d'auto-administration où les rongeurs choisissent entre de la cocaïne et une solution sucrée (Lenoir et al., 2007). Dans cette procédure, et bien que les animaux aient des performances très élevées en auto-administration avec la cocaïne, une large majorité (> 80%) préfère consommer la solution sucrée par rapport à la substance d'abus (Canchy et al., 2020; Cantin et al., 2010; Lenoir et al., 2007). Cette préférence fut initialement décrite comme le « paradoxe du choix », car l'animal choisit la récompense naturelle alors que la drogue est, à priori, associée à une plus grande libération de DA et à un effet renforçant plus important, notamment si le RPE induit par sa consommation perdure au cours du temps. Le travail doctoral de L. Canchy a proposé une explication à ce paradoxe en démontrant que l'effet récompensant de la cocaïne, même si supérieur, est perçu plus tardivement que l'effet récompensant du sucre. Cette dévaluation temporelle de la valeur objective de la drogue paraît donc biaiser le choix de l'animal vers la récompense naturelle (Canchy et al., 2020). Une étude menée par l'équipe de recherche de D. Belin suggère également que ce paradoxe pourrait, somme toute, dépendre plus de certains paramètres expérimentaux de la tâche, que des propriétés renforçantes et motivationnelles intrinsèques des deux récompenses (Vanhille et al., 2015). En effet, en utilisant une procédure reposant sur des modalités différentes de choix entre de la cocaïne et une solution sucrée, la majorité des rats préféraient la cocaïne à la solution sucrée. La préférence de choix entre la récompense naturelle et la substance d'abus semble finalement dépendre de l'historique associé aux deux récompenses, de l'environnement dans lequel l'individu est placé, et de la valeur des récompenses obtenues (Russo et al., 2018; Vanhille et al., 2015). Enfin, la nature de la drogue est également importante car, dans une étude utilisant une procédure de choix entre une solution d'alcool et une solution sucrée, une préférence similaire est observée entre les deux solutions (Russo et al., 2018). De plus, dans cette étude, l'induction d'un état de dépendance chez l'animal favorise le choix de l'alcool par rapport à la récompense naturelle (Russo et al., 2018). Cependant, bien que divergeant dans les proportions, l'ensemble de ces travaux montrent l'apparition de deux groupes au sein des populations étudiées. Les animaux préférant la drogue pourraient ainsi représenter la proportion d'individus susceptibles de développer une addiction pour la drogue (Lüscher et al., 2020). Dans cette optique, l'étude de ces deux groupes dans des tâches comportementales

modélisant une autre facette de l'addiction, tels que la compulsivité, serait très intéressante pour mieux comprendre l'importance de la préférence de la drogue dans l'addiction.

En résumé, l'altération de la transmission DA au sein du NAc et l'apparition d'un mécanisme de RPE aberrants renforceraient l'association entre la drogue et les stimuli qui lui sont associés à chacune de ses utilisations (Keiflin and Janak, 2015; Lüscher and Janak, 2021; Solinas et al., 2019). Au cours du développement de l'addiction, la substance d'abus et ses stimuli associés pourraient alors être surévalués, ce qui favoriserait son choix dans les expériences futures au dépend des récompenses naturelles¹² (Ahmed, 2004). Afin de valider cette hypothèse, il faudrait mesurer les signaux DA associés au stimulus prédicteur et à la récompense obtenue pendant la procédure de choix puis corrélérer cette mesure à la préférence de l'animal. Cette expérience, réalisée au cours des premières expositions à la drogue puis, de façon longitudinale, au cours du développement de l'addiction permettrait de déterminer si les signaux DA associés à la drogue surpassent les signaux associés à la récompense naturelle et favorisent le choix de la substance d'abus.

B. Sensibilisation et motivation incitatrice, la théorie de la sensibilisation incitatrice

Si l'apprentissage permet d'intégrer les expériences passées au contact de la substance d'abus, les comportements de recherche et de consommation de drogue au cours des expériences futures reposent sur l'expression de comportements motivés. Se focalisant sur la composante motivationnelle de l'addiction, TE. Robinson et KC. Berridge ont proposé la théorie de l'« incentive-sensitization », ou sensibilisation incitative, une théorie combinant le phénomène de sensibilisation et la motivation incitatrice (Berridge and Robinson, 2016; Robinson and Berridge, 1993). Cette théorie postule que les neuro-adaptations induites par les consommations intermittentes de drogue sensibilisent les circuits de motivation et de récompense, pour les rendre hyper-réactifs aux effets de la substance d'abus, ainsi qu'aux stimuli qui lui sont associés. Cette hypersensibilisation aboutit à l'attribution d'une valeur incitative très élevée à la drogue et aux stimuli associés, qui agissent alors comme des aimants

¹² La valeur récompensante associée à la drogue et la préférence des actions associées à celle-ci sont deux concepts neuropsychologiques retenus dans le cadre de l'étude internationale « Delphi consensus » et sont considérés comme « primaires » à la compréhension de l'addiction (Yücel et al., 2019).

motivacionnels extrêmement puissants pour l'individu. La motivation « wanting » de l'individu pour rechercher et consommer la drogue est, *in fine*, exacerbée sans toutefois augmenter le plaisir « liking » que la consommation procure (Berridge and Robinson, 2016; Robinson and Berridge, 1993; Stewart and Badiani, 1993; Vanderschuren and Pierce, 2009). Placée au cœur du phénomène de sensibilisation incitative, l'activité de la voie DA mésocorticolimbique a été finement décortiquée (Berridge et al., 2009; Berridge and Robinson, 2016, 1998; Samaha et al., 2021). Différents travaux, réalisés sur l'animal et sur l'homme, ont montré que la prise répétée de drogues conduit à une augmentation de ses effets pharmacologiques avec, notamment, une hausse des niveaux de DA libérée au sein du NAc au cours des intoxications successives (sensibilisation neurobiologique – Figure 23) (Boileau et al., 2006; Cox et al., 2009; Kalivas and Duffy, 1990; Prisciandaro et al., 2014; Robinson et al., 1988; Vezina, 2007). Il faut cependant noter ici, que la sensibilisation du système DA pour certaines substances d'abus reste débattue par les spécialistes du domaine (Bradberry, 2007; Nona et al., 2018; Vezina and Leyton, 2009; Volkow et al., 2004). Pour l'alcool par exemple, l'observation (Didone et al., 2016; Szumlinski et al., 2008, 2005) ou l'absence (Zapata et al., 2006) d'un phénomène de sensibilisation du système DA, dépend de la procédure d'intoxication et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité de la voie DA mésolimbique.

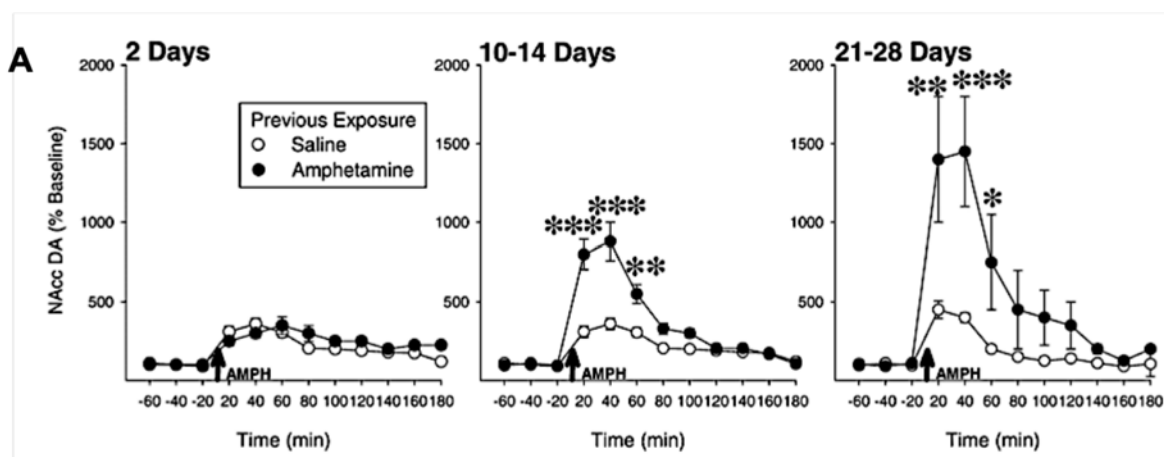


Figure 23 : Sensibilisation neurobiologique par injections chroniques d'amphétamines chez le rat. Des injections d'amphétamines ont été réalisées pendant 15 jours (1 injection/3 jours). À la fin de cette période d'intoxication, une nouvelle injection a été réalisée et les taux de DA dans le NAc ont été mesurés par microdialyse (le délai avant la nouvelle injection est indiqué au-dessus l'histogramme). Vezina, 2007.

L'activité ambulatoire a également été très étudiée afin de déterminer si la sensibilisation neurobiologique induit une modification du comportement de l'animal. En

effet, selon la théorie psychomotrice de l'addiction, les drogues qui stimulent le système DA induisent une augmentation de la locomotion chez l'animal (Wise and Bozarth, 1987). Avec la répétition des administrations, de nombreuses études ont mis en avant une augmentation progressive de l'activité ambulatoire induite par les substances d'abus (sensibilisation comportementale - Figure 24A) (Castner and Goldman-Rakic, 1999; Meyer et al., 2009; Paulson et al., 1991; Post et al., 1992; Valjent et al., 2010). Les études se focalisant sur la sensibilisation comportementale à l'alcool ont notamment observés chez la souris¹³, une augmentation progressive de l'activité locomotrice suite à l'injection chronique d'éthanol, un phénomène persistant jusqu'à 4 mois après la dernière administration (Camarini and Pautassi, 2016; González-Marín et al., 2020; Legastelois et al., 2014; Masur and Boerngen, 1980; Nona et al., 2018, 2015; Zapata et al., 2006). L'étude de la sensibilisation comportementale s'est plus récemment tournée vers les effets motivationnels de la drogue en utilisant des expériences d'auto-administrations opérantes. Le groupe de recherche de M. Naassila a ainsi comparé des souris ayant développé une sensibilisation locomotrice à l'alcool et des souris résistantes à cette sensibilisation, dans différentes expériences d'auto-administrations. (González-Marín et al., 2020; Legastelois et al., 2014). Si la consommation d'alcool était similaire entre les souris résistantes et les souris sensibilisées lorsqu'un effort très faible était requis pour obtenir la drogue (FR1, Figure 24B), les souris sensibilisées possédaient des performances plus élevées dès que l'effort requis pour obtenir la substance augmentait (FR2 ou Ratio Progressif, Figure 24C et 24D). Les souris sensibilisées continuaient également à consommer la solution d'alcool même si une substance amère et désagréable pour l'animal (quinine) était ajoutée dans la solution (Figure 24E). La sensibilisation comportementale paraît donc induire une plus grande motivation pour consommer l'alcool, et ce, en dépit des conséquences négatives associées à la consommation (González-Marín et al., 2020; Legastelois et al., 2014). Cette facilitation de l'acquisition du comportement de prise volontaire et motivée de drogue suite à une sensibilisation comportementale a également été montrée par d'autres drogues d'abus (Robinson and Berridge, 1993; Samaha et al., 2021; Vezina and Leyton, 2009).

¹³ Chez le rat, sensibilisation comportementale à l'alcool est plus difficile à étudier car ce phénomène est souvent masqué par l'effet sédatant de cette substance. Quelques études ont cependant pu observer de la sensibilisation comportementale en utilisant des concentrations faibles en éthanol et en se focalisant sur une fenêtre temporelle proche de l'injection (Hoshaw and Lewis, 2001; Nona et al., 2018; Xu and Kang, 2017).

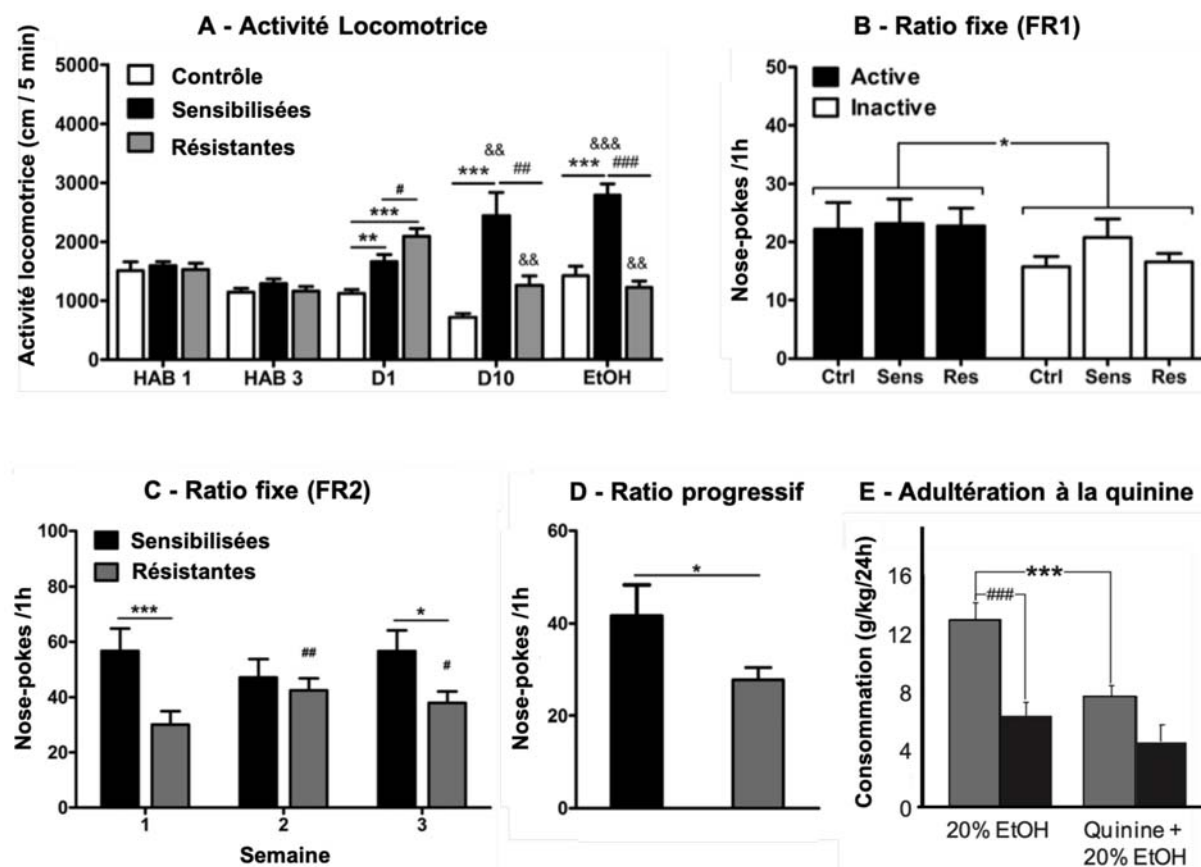


Figure 24 : Sensibilisation comportementale par injections chroniques d'alcool chez la souris.

(A) Activité locomotrice des souris contrôles, sensibilisées ou résistantes à la sensibilisation comportementale à l'alcool. Les mesures ont été réalisées après des injections de solution saline (HAB 1 et HAB 3), après des injections quotidiennes d'alcool (D1 et D10) et à la suite d'une injection réalisée après une semaine de sevrage (EtOH). (B – D) Performances des animaux dans des expériences d'auto-administrations d'alcool à ratio fixe (FR1 – 1 session) (B), (FR2 -3 semaines) (C) et ratio progressif (D). (E) Consommation d'alcool des animaux, dans une procédure de choix à deux bouteilles, en fonction de la présence (Quinine + 20% EtOH) ou non (20% EtOH) de quinine. Adapté de Legastelois et *al.*, 2013 et Gonzales-Marin et *al.*, 2020.

Bien que la théorie de la sensibilisation incitative explique certains aspects de l'addiction, elle ne peut, à elle seule, expliquer l'intégralité de ce phénomène complexe, et différentes limites peuvent être mises en avant (Bickel et al., 2018; Vanderschuren and Pierce, 2009). Tout d'abord, quelques intoxications avec la drogue suffisent pour induire des phénomènes de sensibilisation neurobiologique ou comportementale chez le rongeur, le singe et l'homme (Boileau et al., 2006; Bradberry, 2007; Nona et al., 2015; Valjent et al., 2010), alors que l'addiction est une maladie qui se développe à la suite d'intoxications répétées, sur une période prolongée, et non au cours de quelques intoxications (Deroche-Gamonet et al., 2004; Everitt et al., 2018; Kuhn et al., 2019; Vanderschuren and Pierce, 2009). De plus, la majorité des individus ayant une consommation de drogue récréative ne développe pas

d'addiction, et ce, même si les phénomènes de sensibilisation sont présents et exprimés (Boileau et al., 2006). Différentes études ont également mis en avant qu'un prétraitement à la drogue n'augmente pas uniquement la valeur incitative de la substance d'abus et des stimuli qui lui sont associés, mais également la valeur incitative de récompenses naturelles telles que la nourriture et le sexe (Fiorino and Phillips, 1999a, 1999b; Nordquist et al., 2007; Wyvell and Berridge, 2001). Puisque la sensibilisation induite par la drogue favorise également la réalisation des comportements dirigés vers des récompenses naturelles, d'autres mécanismes doivent entrer en jeu pour expliquer l'abandon de toutes autres activités au profit des activités se rapportant à la substance d'abus, une caractéristique importante de l'addiction évoquée au chapitre 1. Enfin, l'addiction s'accompagne d'une succession de phases d'intoxications, de sevrages et de rechutes. L'apparition de la sensibilisation incitative au cours de la phase d'intoxication, pourrait expliquer la forte motivation de l'individu pour la recherche et la consommation de la drogue. Cette théorie pourrait également expliquer pourquoi les individus abstinents ressentent une envie extrêmement puissante de consommer la substance d'abus en présence de cette dernière, ou des stimuli associés à celle-ci. Cependant, cette théorie n'explique pas pourquoi l'individu consomme la substance d'abus en dépit des conséquences négatives qui lui sont associées. Être extrêmement motivé pour réaliser une action, n'implique pas obligatoirement de réaliser cette action à n'importe quel prix. D'autres processus paraissent finalement importants pour expliquer la transition de l'usage récréatif à l'usage pathologique chez les individus sensibilisés (Koob and Schulkin, 2019; Vanderschuren and Pierce, 2009).

II. La théorie de l'allostasie dans l'addiction

Si la composante « phasique » du signal DA a particulièrement été mise en avant dans les processus de RPE et de sensibilisation incitatrice, il ne faut néanmoins pas négliger l'importance de la composante « tonique » dans les processus d'addiction. En effet, puisque tout signal phasique s'observe par rapport à une ligne de base, la composante tonique joue également un rôle majeur dans les processus mentionnés précédemment (Grace, 2000, 1995). Pour étudier l'importance de la balance tonique/phasique, EA. Budygin et ses collaborateurs ont, par exemple, entraîné des rats à s'auto-administrer de l'alcool, puis ont utilisé l'optogénétique afin de modifier les signaux DA générés au sein de la voie mésolimbique (Bass

et al., 2013; Budygin et al., 2020). Chez ces rats, l'augmentation de l'activité phasique de la voie mésolimbique promeut le comportement de recherche d'alcool, tandis que l'augmentation de l'activité tonique de cette voie inhibe ce comportement. Enfin, l'induction simultanée de l'activité tonique et de l'activité phasique aboutit à l'inhibition du relargage phasique de DA et à l'inhibition du comportement de recherche d'alcool. L'activité tonique semble donc réguler la production des signaux phasiques et permet, *in fine*, de moduler le comportement de recherche d'alcool. Ces résultats soulignent la pertinence de considérer le signal « tonique » et la balance « phasique/tonique » comme des éléments tout aussi importants dans l'alcoolodépendance.

A. De l'hyperdopaminergie phasique à l'hypodopaminergie tonique

À l'instar de l'activité DA phasique, la prise de drogue conduit à une hausse de l'activité DA tonique pendant la phase d'intoxication. Si la consommation répétée et intermittente d'une substance d'abus peut induire un phénomène de sensibilisation du signal DA phasique, la prise chronique de drogue paraît, à l'inverse, conduire l'individu dans un nouvel état caractérisé par une diminution du signal DA tonique (Koob and Volkow, 2010; Melis et al., 2005). Cet état hypodopaminergique a principalement été observé pendant la phase de sevrage. En effet, dans le cadre de l'alcoolodépendance, plusieurs études précliniques ont mis en avant une diminution de l'activité des neurones DA de l'ATV (Bailey et al., 2001; Diana et al., 1996, 1992; Shen, 2003) et des niveaux de DA extracellulaires du NAc pendant les phases de sevrage aigu et d'abstinence précoce (Barak et al., 2011; Diana et al., 2003, 1993; Rossetti et al., 1992; Weiss et al., 1996). Cette diminution d'activité du système au cours de la phase de sevrage peut être corrigée par la reprise de la consommation qui permet d'augmenter les niveaux de DA au niveau du NAc et de rétablir les niveaux mesurés avant le sevrage (Barak et al., 2011; Weiss et al., 1996). Ces observations précliniques ont également été renforcées par des études d'imagerie TEP réalisées chez des patients abstinents (Koob and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017; Volkow et al., 2017). Au niveau du striatum, ces travaux ont montré une diminution du stockage vésiculaire de DA au niveau présynaptique (Gilman et al., 1998), une

baisse de la disponibilité des récepteurs D2/D3¹⁴ (Martinez et al., 2005; Volkow et al., 2007, 2002), ainsi qu'une diminution de la libération de DA suite à l'administration de composés stimulant le système DA comme les amphétamines ou le méthylphénidate (Martinez et al., 2005; Volkow et al., 2007).

En parallèle, des études comportementales furent réalisées pour étudier l'état émotionnel et motivationnel des animaux pendant la phase de sevrage. Des expériences d'auto-stimulations intracrâniennes se sont ainsi intéressées au fonctionnement du circuit de la récompense pendant la phase de sevrage aiguë à l'alcool (Glover et al., 2019; Schulteis et al., 1995; Schulteis and Liu, 2006). Dans ces expériences, l'animal appuie sur un levier pour obtenir une stimulation électrique dans l'hypothalamus latéral, une structure du circuit de la récompense. Plus le circuit de la récompense de l'animal est sensible et plus l'animal percevra comme renforçantes des stimulations de faible intensité (seuil bas). En comparaison des animaux contrôles, mais également de leurs performances initiales, les animaux en phase de sevrage possédaient des seuils d'auto-stimulation beaucoup plus élevés. La phase de sevrage semble donc être associée à une diminution de la sensibilité et de la réactivité du circuit de récompense. D'autres études réalisées pendant cette phase, utilisant l'alcool ou d'autre substance d'abus, ont également mis en avant l'apparition de comportement de type anxieux (Glover et al., 2019; Kliethermes, 2005; Radke et al., 2011; Radke and Gewirtz, 2012; Zhang et al., 2007), de comportement de type dépressif (Cryan et al., 2003; Pang et al., 2013; Stevenson et al., 2009), de perte de motivation pour les récompenses naturelles (Denoble and Begleiter, 1976; Hofer et al., 2006) et d'une motivation exacerbée pour la recherche et la consommation de drogue (O'Dell et al., 2004; Pickens et al., 2011b; Roberts et al., 2000; Valdez et al., 2002). Si une substance d'abus comme l'alcool dérégule l'activité de plusieurs systèmes de neurotransmission, l'utilisation d'agonistes DA, l'inhibition de structures inhibant les neurones DA ou l'utilisation de facteurs neurotrophiques normalisant le tonus DA de la voie

¹⁴ Le raclopride a été utilisé dans ces études d'imagerie TEP. Cet agoniste des récepteurs D2/D3 agit en compétition avec la DA et permet de mesurer la biodisponibilité des récepteurs placés au niveau synaptique. Une diminution du marquage peut s'expliquer par une diminution du nombre de récepteurs synaptiques ou par une augmentation de la concentration en DA dans la fente (Hansson et al., 2019; Hirth et al., 2016; Samaha et al., 2021). Afin d'évaluer la quantité de récepteurs synaptiques sans biais induit par la concentration en dopamine, Martinez et ses collaborateurs ont ajouté une drogue permettant d'induire une déplétion aiguë en DA à leur expérience d'imagerie. Chez des patients abstinents à la cocaïne, une diminution du nombre de récepteurs D2/D3 disponibles a bien pu être observée (Martinez et al., 2009). Enfin, en utilisant un autre ligand, une étude post-mortem chez des patients alcoolodépendants a mis en évidence une diminution de la quantité de récepteurs D2 (Tupala et al., 2003; Volkow et al., 2007).

mésolimbique permettent d'atténuer les déficits observés (Carnicella et al., 2008; Glover et al., 2019; Hoefler et al., 2006; Radke and Gewirtz, 2012). Ces observations neurobiologiques et comportementales suggèrent, finalement, que la phase de sevrage dans l'addiction est associée à une baisse d'activité tonique de la voie DA mésolimbique qui participe à l'apparition d'un état émotionnel et motivationnel négatif, ainsi qu'à une baisse de la sensibilité du circuit de la récompense (Koob, 2021; Solinas et al., 2019).

B. Homéostasie, processus-opposants et théorie de l'allostasie

Le phénomène d'hypodopaminergie tonique ainsi que les corrélats comportementaux décrits au cours de la phase de sevrage s'intègrent parfaitement dans le cadre de la théorie de l'allostasie dans l'addiction proposée par M. Le Moal et GF. Koob (Koob and le Moal, 2005, 2001). Cette théorie, fondée sur les principes d'homéostasie et de processus-opposants, a proposé l'apparition d'un nouvel état d'équilibre motivationnel et affectif (état allostatique) au cours du développement de l'addiction (Koob, 2021, 2003, 1996; Koob et al., 2014; Koob and le Moal, 2005, 2001; Koob and Schulkin, 2019; Koob and Volkow, 2016, 2010). En effet, dans un cadre physiologique, et selon les deux principes susmentionnés, toute déviation d'un état par rapport à sa ligne de base est contrée par un processus opposant visant à rétablir l'homéostasie (Bernard, 1865; Cannon, 1934; Solomon and Corbit, 1974).

Ainsi, à la prise d'une drogue, deux processus consécutifs apparaîtraient. Le premier correspondrait à l'apparition d'effets positifs associés à la substance d'abus comme l'effet euphorisant. Le second correspondrait à l'apparition d'effets négatifs comme l'effet dysphorique éprouvé lors du sevrage (Figure 25A – individu sain, « Non-dépendant »). Avec la répétition des intoxications et le développement de la tolérance, les effets positifs diminueraient progressivement tandis que les effets négatifs seraient plus importants et persisteraient bien au delà des effets pharmacologiques de la drogue (Figure 25A – individu « Dépendant ») (Solomon and Corbit, 1974). Dans le cadre de l'addiction, GF. Koob et M. Le Moal ont étendu cette théorie en postulant qu'avec la surexposition à la substance d'abus, et l'expression de plus en plus importante des processus opposants, les systèmes de récompense et de stress déviaient progressivement d'un état homéostatique à un état allostatique (Figure 25B) (Koob and le Moal, 2005, 2001). Pour l'individu toxicomane, la consommation permettrait finalement de revenir à un état « normal », alors que l'absence de

drogue révélerait un état « anormal » et pathologique. Cet état pathologique, conduirait l'individu abstinent dans un état motivationnel et émotionnel négatif, défini très récemment par le terme d'*hyperkatifeia*¹⁵ (Koob, 2021; Koob and Schulkin, 2019). En opposition au renforcement positif, où l'individu consomme la drogue pour ses effets plaisants, l'apparition d'un état allostatique conduirait donc l'individu à consommer la drogue afin d'éviter l'*hyperkatifeia* du sevrage. Ce processus de motivation négative, ou renforcement négatif, conduirait à l'apparition d'un cercle vicieux où la substance d'abus représente à la fois le problème et la solution (Koob, 2021, 1996).

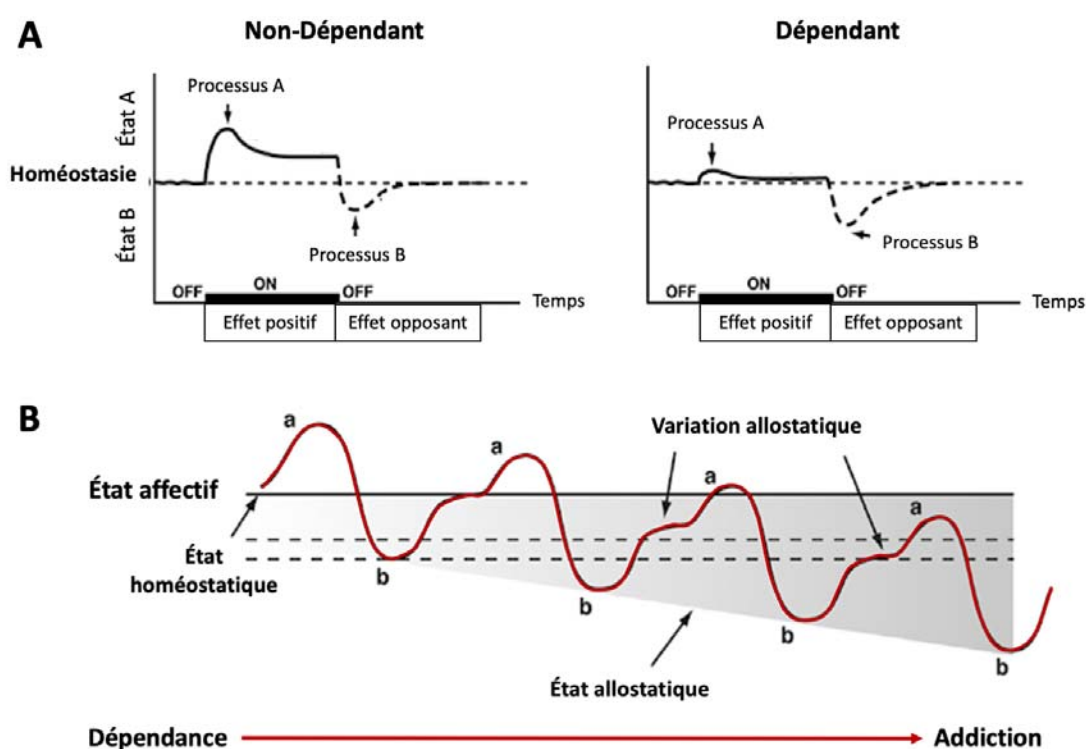


Figure 25 : Représentations schématiques du modèle des processus opposants et de la théorie de l'allostase.

(A) Effets positifs associés à l'usage d'une drogue « Processus A » et processus opposant « Processus B » chez un individu sain ou dépendant. Avec la répétition de la consommation et l'apparition de la dépendance, l'intensité de l'effet positif est diminuée, l'intensité et la durée de l'effet opposant est augmentée, mais l'état homéostatique reste conservé. Adapté de Solomon et Corbit, 1974. **(B)** La transition de la dépendance à l'addiction pourrait s'expliquer par la déviation progressive du point de référence homéostatique vers un état allostatique. Cet état, caractérisé par un déficit émotionnel et motivationnel, serait notamment sous-tendu par une dérégulation des circuits de stress et de récompense. Pour fuir cet état allostatique, l'individu n'aurait alors d'autres choix que de consommer la drogue de nouveau. Adapté de Koob et Le Moal, 2001.

¹⁵ L'*hyperkatifeia*, initialement décrit pour le sevrage aux opioïdes, est un terme dérivé du grec *katifeia* qui désigne le découragement ou l'état émotionnel négatif (Koob, 2021; Shurman et al., 2010). L'*hyperkatifeia*, récemment étendu à l'ensemble des drogues d'abus, se définit comme une augmentation de l'intensité des altérations émotionnelles et/ou motivationnelles et des symptômes associés à la phase de sevrage (Koob, 2021).

Différents systèmes de neurotransmissions et différentes structures ont été considérés pour expliquer les dérégulations des circuits de stress et de récompense au cours du développement de l'addiction (Barak et al., 2011; George et al., 2012; Koob, 2021; Koob and le Moal, 2005; Koob and Schulkin, 2019). En lien avec les travaux scientifiques développés dans la partie précédente, de nombreux auteurs ont suggéré que l'altération du tonus DA soit en partie responsable de l'état allostatique observé lors du sevrage. En effet, l'implication de la DA dans les comportements motivés, les processus récompensants et l'effet direct des drogues sur ce système a rapidement propulsé ce neurotransmetteur au centre de la théorie de l'allostasie dans l'addiction (Koob and le Moal, 2005, 2001). Les études normalisant le tonus DA de la voie mésolimbique au cours de la phase de sevrage renforcent également cette hypothèse en démontrant que le rétablissement du tonus DA atténue les symptômes observés et diminue la recherche et la consommation d'alcool (Barak et al., 2011; Carnicella et al., 2009b, 2008a; Radke and Gewirtz, 2012). Finalement, plus qu'une simple conséquence de la consommation chronique d'alcool, cette hypodopaminergie pourrait directement contribuer à la consommation compulsive d'alcool et à la rechute, car l'individu utiliserait la substance d'abus pour ramener le tonus DA à son état homéostatique afin de ne plus ressentir l'état pathologique induit par l'absence de drogue. Cette hypothèse reste néanmoins à démontrer.

Bien que l'hypodopaminergie de la voie DA mésolimbique soit observable quelques heures à quelques mois après le début du sevrage, il semble que cette altération soit réversible et disparaisse au cours de l'abstinence prolongée (Berridge, 2017; Hansson et al., 2019; Hirth et al., 2016; Koob, 2008; Samaha et al., 2021; Solinas et al., 2019). Pour expliquer les effets négatifs persistants pendant l'abstinence prolongée, une première hypothèse concerne l'implication d'autres neurotransmetteurs ou d'autres systèmes neuroendocriniens (Solinas et al., 2019). En effet, la théorie de l'allostasie dans l'addiction ne repose pas uniquement sur la DA, et d'autres systèmes directement ciblés par la drogue ou activés pour s'opposer à ses effets, ont été impliqués dans les dérégulations des circuits de la récompense et du stress (Figure 26) (Koob, 2021). Si ces différents systèmes ne seront pas développés dans le cadre de ce travail doctoral, le système de libération des corticotrophines (CRF) a été particulièrement mis en avant dans cette théorie (Koob and Schulkin, 2018; Simpson et al., 2020; Zorrilla et al., 2014). Très impliquée dans les processus de stress, l'activité de ce système

augmente pendant la phase de sevrage en réponse à l'intoxication à la drogue (Olive et al., 2002; Pich et al., 1995; Zorrilla et al., 2001). Avec la répétition des cycles d'intoxication et de sevrage, le niveau basal de CRF de l'amygdale étendue¹⁶ augmenterait de plus en plus pour atteindre un état allostatique caractérisé par une hyperactivité permanente de ce système (Koob, 2021, 2008; Koob and Schulkin, 2019; Zorrilla et al., 2014). Combinée à l'état allostatique du système DA, l'apparition d'état allostatique pour d'autres systèmes de neurotransmissions amplifierait les effets négatifs associés au sevrage et rendrait l'individu particulièrement vulnérable au stress, à la drogue et ses stimuli associés et augmenterait fortement le risque de rechute (George et al., 2012; Hupalo et al., 2019; Koob and le Moal, 2005). Si l'altération de la DA semble réversible, l'altération d'un système tel que le CRF pourrait perdurer à plus long terme et sous-tendre les effets négatifs au cours de l'abstinence prolongée (Koob, 2008; Zorrilla et al., 2014, 2001). Des stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'anxiété éprouvée lors de la phase de sevrage, ciblant notamment le système CRF, font l'objet d'essais cliniques, même si les résultats restent pour l'instant infructueux (Kwako et al., 2015; Schwandt et al., 2016; Shaham and De Wit, 2016; Spierling and Zorrilla, 2017).

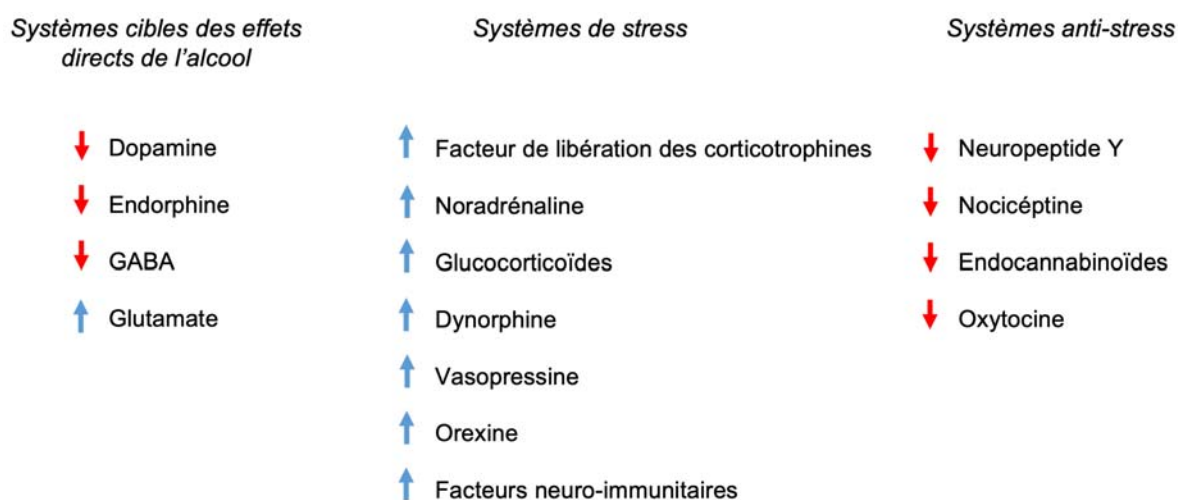


Figure 26 : Neuro-adaptations des systèmes neurotransmetteurs et neuroendocriniens associés à l'hyperkatifeia observées au cours de la phase de sevrage à l'alcool.

La consommation répétée d'alcool conduit à des dérégulations des systèmes directement ciblés par la molécule d'éthanol. Elle conduit également à des dérégulations de systèmes qui ne sont pas directement ciblés par la molécule d'éthanol, mais qui sont impliqués dans la réponse physiologique aux effets de la drogue. Au cours de la phase de sevrage, les systèmes de stress sont hyperactivés et les systèmes de lutte contre le stress sont hypoactivés. Adapté de Koob, 2021.

¹⁶ L'amygdale étendue regroupe différentes structures éminemment impliquées dans les fonctions limbiques telles que les noyaux central et médial de l'amygdale, le noyau du lit de la stria terminalis (BNST), la substance innommée de Reichert et le Shell du NAc (Koob, 2003).

Une explication alternative, ou complémentaire, à la disparition de l'hypodopaminergie mésolimbique et à la persistance des effets négatifs, pourrait également résider dans la migration de cette altération de la voie DA mésolimbique vers la voie DA nigrostriée.

En effet, nous avons précédemment décrit le système DA comme un système dynamique où les voies DA mésolimbique et nigrostriée communiquent par l'intermédiaire de boucles spiralées au sein du modèle Acteur/Critique. Initialement restreint à la physiologie du système DA, ce modèle a été étendu afin d'expliquer l'implication des deux voies DA, et de leurs territoires de projection principaux, dans la physiopathologie de l'addiction (Belin et al., 2013; Belin and Everitt, 2008; Haber, 2008; Keiflin and Janak, 2015; Murray et al., 2012; Takahashi et al., 2009). Avec le développement de l'addiction, les neuro-adaptations induites par la substance d'abus commenceraient ainsi au niveau de la voie DA mésolimbique et du NAc, et aboutirait progressivement au niveau de la voie DA nigrostriée et du striatum dorso-latéral (Belin et al., 2009; Belin and Everitt, 2008; Everitt and Robbins, 2016, 2005; Lüscher et al., 2020; Willuhn et al., 2014, 2012). En effet, les études cliniques, réalisées chez les individus souffrant d'addiction aux drogues et abstinents, n'ont pas uniquement mis en évidence une altération du tonus DA au niveau du striatum ventral, mais également au niveau du striatum dorsal (Martinez et al., 2009; Volkow et al., 2007, 2002; Vollstädt-Klein et al., 2010).

Cette possibilité reste pour l'instant une hypothèse et personne, à notre connaissance, n'a encore mesuré le tonus DA de la voie nigrostriée au cours de la phase de sevrage. Aucune équipe de recherche n'a également étudié si l'induction d'une hypodopaminergie sélective de cette voie conduisait à l'apparition de l'hyperkatifeia ou à la recherche et à la prise compulsive d'alcool. Cette voie semble pourtant fortement impliquée dans la régulation des comportements motivés et affectifs (Drui et al., 2014; Ilango et al., 2014; Magnard et al., 2016) et le striatum dorsal, notamment dans son cadran latéral, joue un rôle majeur dans le développement et l'expression des comportements compulsifs (Everitt and Robbins, 2016; Lüscher et al., 2020).

III. Le striatum dorsal, de l'usage récréatif à l'usage compulsif

Alors que le NAc est impliqué dans les processus d'apprentissage associatif, de motivation incitative et dans l'effet récompensant des drogues d'abus, la réalisation d'un comportement motivé nécessite également l'implication du striatum dorsal. En effet, cette structure permet, notamment, l'intégration des informations limbiques, cognitives et motrices pour produire une action (Yin et al., 2008). Et si le NAc a été pendant longtemps la cible privilégiée des recherches sur l'addiction, de nombreuses études démontrent aujourd'hui la contribution majeure du striatum dorsal dans cette pathologie (Corbit, 2018; Everitt and Robbins, 2013; Lovinger and Alvarez, 2017). L'addiction n'est alors plus perçue comme une affection neuro-psycho-biologique de la partie la plus ventrale du striatum, mais bien de l'ensemble de cette structure. La transition de l'usage récréatif à l'usage pathologique de la drogue pourrait ainsi être sous-tendue par la transition d'un comportement initialement dirigé par un but, sous le contrôle du DMS, vers un comportement habituel, sous le contrôle du DLS (Belin et al., 2013, 2009; Byrne et al., 2018; Corbit and Janak, 2016; Everitt and Robbins, 2016, 2005; Lipton et al., 2019).

A. L'usage récréatif, un comportement dirigé par un but ?

Lors de la réalisation d'un comportement dirigé par un but, l'individu réalise son comportement sous l'influence directe de la valeur associée à la récompense obtenue. Si la récompense est dévaluée, ou si cette récompense n'est plus obtenue à la suite du comportement, l'individu va arrêter de réaliser ce comportement puisqu'il ne conduit plus à la récompense souhaitée (Balleine and O'Doherty, 2010; Dickinson et al., 1985). Dans le cas de l'usage récréatif de drogue, l'individu recherche et consomme la substance d'abus pour les effets positifs qu'elle lui procure et, si ces effets disparaissent ou si une conséquence négative est associée à son usage, alors l'individu mettra un terme à sa consommation ; ce comportement semble donc dirigé par un but.

Afin de confirmer l'implication de ce type de comportement au cours des premières expositions à la drogue, des expériences d'auto-administration avec la substance d'abus ont été combinées avec des procédures de dévaluation chez le rongeur (Belin-Rauscent et al., 2016; Corbit and Janak, 2016; Furlong and Corbit, 2018; O'Tousa and Grahame, 2014). Dans ces procédures, la valeur de la drogue est dévaluée en couplant sa consommation à une

saveur désagréable, à un malaise gastrique ou en permettant sa consommation jusqu'à satiété avant la réalisation de la tâche d'auto-administration¹⁷. Dans le cadre de l'alcoolodépendance, différentes études ont montré que les animaux arrêtaient de rechercher ou de consommer la drogue lorsque sa valeur était dévaluée après une courte période d'exposition (Corbit et al., 2012; Giuliano et al., 2021; Lesscher et al., 2010; Lopez et al., 2014).

Cette réponse à la dévaluation confirme la mise en place d'un comportement dirigé par un but, représenté ici par l'obtention et la consommation d'alcool. En lien avec l'implication du DMS dans ce type de comportement, la modulation de l'activité de cette sous-région striatal, par optogénétique par exemple, permet d'augmenter ou de diminuer les comportements associés à la drogue (Roltsch Hellard et al., 2019). Enfin, l'altération du fonctionnement de cette structure, par inhibition de l'activité DA ou augmentation de l'activité GABA, au cours des premières intoxications, inhibe l'acquisition et la réalisation du comportement de recherche de drogue (Corbit et al., 2012; Murray et al., 2012).

B. L'usage abusif, un comportement habituel ?

À *contrario* du comportement dirigé par un but, les comportements habituels sont réalisés sous l'influence des stimuli présents dans l'environnement de l'individu, et non en lien direct avec la valeur de la récompense obtenue. Si la récompense est dévaluée, ou si elle n'est plus obtenue, mais que les stimuli préalablement associés à son obtention sont encore présents, alors la modification de la valeur de la récompense n'a pas d'effet immédiat sur le comportement réalisé par l'individu (Balleine and O'Doherty, 2010; Belin et al., 2013; Corbit and Janak, 2016; Dickinson et al., 1985). Dans le cas de l'usage abusif de drogue, les comportements de recherche et de consommation pourraient progressivement devenir indépendants des propriétés gratifiantes de la substance d'abus. À l'inverse, les stimuli associés à la recherche et à la prise de la substance d'abus acquièrent une valeur incitative de plus en plus importante pour l'individu (Berridge and Robinson, 2016; Corbit and Janak, 2016; Lüscher et al., 2020). La transition de l'usage récréatif à l'usage abusif de drogue pourrait donc

¹⁷ Afin de déterminer si la phase de dévaluation influence le comportement de l'animal, le test d'auto-administration post-dévaluation est réalisé en « extinction » ce qui signifie qu'aucune récompense n'est obtenue par l'animal pendant ce test (Turner and Parkes, 2020).

être assimilée à la transition d'un comportement dirigé par un but à un comportement habituel¹⁸ (Everitt and Robbins, 2005).

Chez l'animal, les procédures de dévaluations susmentionnées réalisées à la suite de périodes prolongées d'expositions ou de la répétition importante du comportement associé à l'alcool ou à d'autres drogues d'abus ont renforcé cette hypothèse. En effet, ces études ont montré une augmentation de la résistance à la dévaluation avec l'augmentation du temps d'exposition et l'entraînement, mettant ainsi en évidence la dissociation progressive entre la récompense obtenue et le comportement réalisé (Corbit et al., 2014, 2012; Giuliano et al., 2021; Lesscher et al., 2010; Lopez et al., 2014).

Au sein du striatum, cette transition comportementale est corrélée à une diminution du contrôle par le DMS au profit du DLS, dans lequel une augmentation des activités DA et glutamatergique, ainsi qu'une baisse de l'activité GABA, ont notamment été observées (Cuzon Carlson et al., 2011; Furlong et al., 2018; Willuhn et al., 2012). Contrairement aux effets évoqués pour le DMS, l'inactivation du DLS au cours des premières expositions, n'a aucun effet sur l'acquisition et l'expression du comportement de recherche de drogue. En revanche, l'inactivation de cette structure après un entraînement ou une exposition prolongés, par blocage du signal DA ou par augmentation du signal GABA, inhibe la réalisation du comportement de recherche de drogue, et rétablit la sensibilité de l'animal à la dévaluation (Corbit et al., 2014, 2012; Giuliano et al., 2019; Murray et al., 2012; Vanderschuren et al., 2005; Zapata et al., 2010).

Il est important de noter, cependant, que l'altération de l'activité du DLS inhibe uniquement le comportement de recherche de drogue, mais ne modifie pas directement le comportement de consommation (Giuliano et al., 2019; Murray et al., 2012). Une dissociation semble donc exister entre les comportements de recherche et les comportements de consommation de drogue (Everitt and Robbins, 2016; Zapata et al., 2010). Si les premiers évoluent progressivement sous la forme de comportements habituels, les deuxièmes perdureraient sous la forme de comportements dirigés par un but et resteraient sous la dépendance du DMS (Giuliano et al., 2021, 2019; Lüscher et al., 2020). La différence majeure entre ces deux comportements résiderait finalement dans la proximité entre le

¹⁸ L'habitude est un autre concept neuropsychologique retenu dans le cadre de l'étude internationale « Delphi consensus » (Yücel et al., 2019)

comportement réalisé et la récompense obtenue¹⁹. La recherche, plus éloignée de la récompense que la consommation, notamment dans les tâches dissociant ces deux comportements, aurait alors une probabilité beaucoup plus importante d'évoluer sous la forme d'un comportement habituel (Belin et al., 2009; Everitt et al., 2018).

Finalement, l'ensemble de ces observations suggère que le comportement de recherche de drogue passerait progressivement d'un comportement dirigé par un but, contrôlé par le DMS, à un comportement de type habituel, sous le contrôle du DLS (Figure 27A). Il faut noter, cependant, que « comportement habituel » ne signifie pas « comportement pathologique ». En effet, si la répétition des expositions favorise l'apparition d'un comportement habituel, ce type de comportement est également observé avec les récompenses dites « naturelles » ou les actions quotidiennement effectuées (Tricomi et al., 2009; Yin and Knowlton, 2006, 2004). Il semble même que la substance d'abus, dopant l'activité du système DA et des boucles spiralées méso-striatales, ait un effet promouvant la formation de comportements habituels de façon générale. L'exposition répétée à l'alcool favorise, par exemple, les comportements habituels avec d'autres renforçateurs comme le saccharose dans les études précliniques ou l'argent dans les études cliniques. (Byrne et al., 2018; Corbit et al., 2012; Ersche et al., 2016; Nelson and Killcross, 2006; Sjoerds et al., 2013). Si cet effet s'applique aux comportements habituels « normaux » et « pathologiques », les comportements habituels « normaux », bien que moins labiles que les comportements dirigés par un but, sont supprimés lorsqu'ils ne sont plus pertinents (Furlong and Corbit, 2018). À l'inverse, l'addiction et la recherche compulsive d'alcool pourraient, finalement, résider dans l'incapacité de l'individu à inhiber sa stratégie d'habitude lorsqu'elle n'est plus pertinente (Figure 27B) (Byrne et al., 2018; Giuliano et al., 2021, 2019; Lüscher et al., 2020).

¹⁹ Le paradigme instrumental utilisé apporte également des pistes de réflexion sur le comportement observé. En effet la règle instrumentale établie pour la recherche de drogue (intervalle aléatoire) n'est pas la même que celle établie pour la consommation (ratio fixe). Dans le premier cas, le renforçateur est obtenu après un intervalle de temps aléatoire, ce qui favorise l'apparition d'un comportement habituel en décorrélant partiellement l'action du renforcement obtenue (de Russo et al., 2010). Dans le second cas, le renforçateur est obtenu après l'action réalisée ce qui favorise plutôt la création d'un comportement dirigé par un but (de Russo et al., 2010).

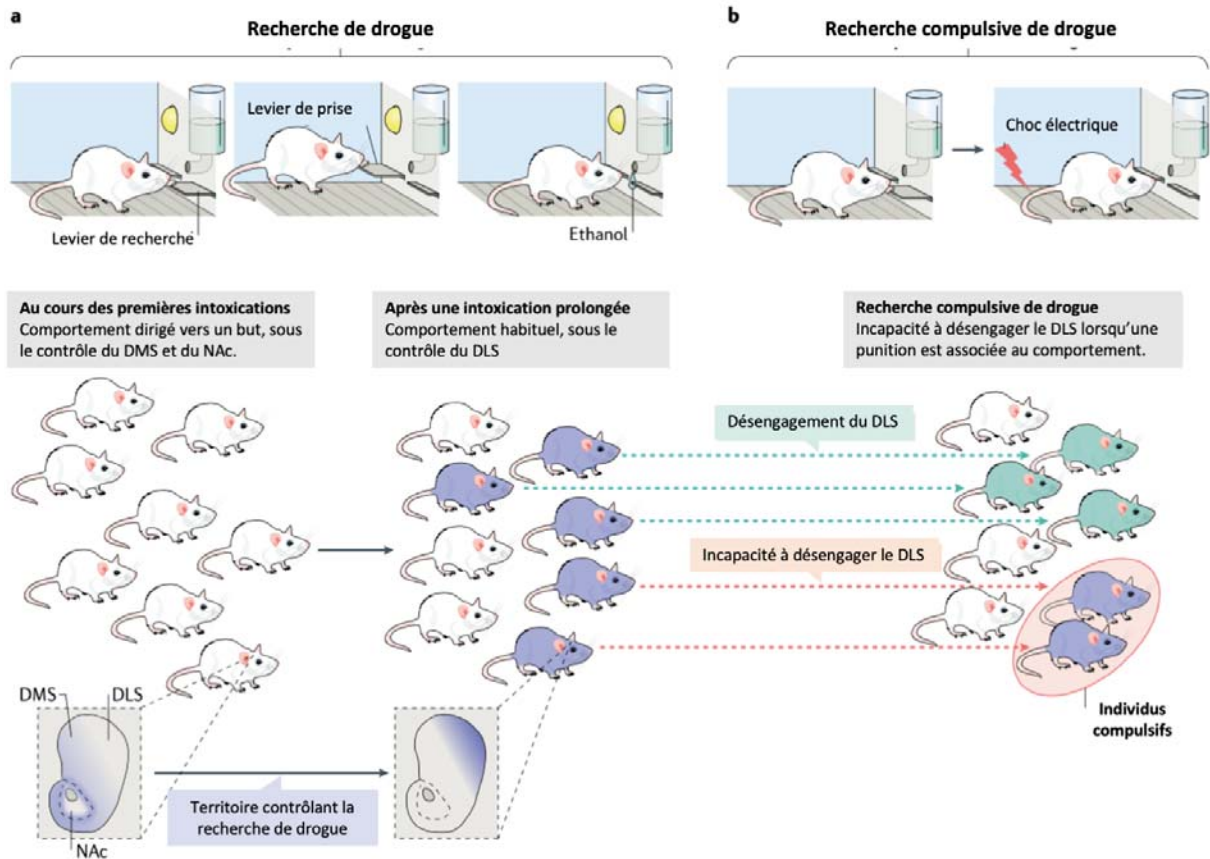


Figure 27: Le développement de la recherche compulsive d'alcool chez le rongeur.

(A) Évolution du comportement de recherche d'alcool dirigé par un but, sous le contrôle du DMS, à un comportement habituel, sous le contrôle du DLS. L'expérience utilisée est une expérience d'auto-administration d'alcool divisée en deux parties « seeking-taking task ». Pour obtenir la solution d'éthanol, l'animal doit d'abord appuyer sur le levier de recherche « seeking » pour obtenir l'accès au levier de prise « taking ». L'animal peut ensuite appuyer sur le levier de prise et obtenir la substance d'abus. Au cours des premières intoxications, l'effet renforçant de l'éthanol dépend de la DA dans le NAc tandis que l'acquisition du comportement de recherche dépend de la DA dans le DMS. Avec la répétition des intoxications et la répétition du comportement de recherche d'alcool, ce comportement perd sa dépendance à l'égard du DMS et devient dépendant de la DA dans le DLS. **(B)** Lorsqu'une conséquence négative est ajoutée à la recherche d'alcool, une sous-population de rats continue à rechercher l'alcool alors que la majeure partie des individus vont mettre un terme à leur comportement. Les rats qui recherchent l'alcool de manière compulsive sont incapables de désengager le DLS, et le comportement de recherche reste sous la dépendance de la DA dans cette structure. La recherche compulsive de drogue ne réside pas uniquement dans le développement de l'habitude, mais également dans l'incapacité de désengager le DLS et les processus habituels lorsqu'une conséquence négative est associée au comportement. Adapté de Lüscher et al., 2020.

C. L'addiction, une habitude poussée à l'extrême ?

À l'instar des comportements habituels, la recherche compulsive de drogue reposerait sur une interaction étroite entre un stimulus et une réponse. Si la réponse compulsive semble être la conséquence directe de l'incapacité de l'individu à inhiber les processus habituels sous-jacents au comportement réalisé, les stimuli à l'origine de cette réponse pourraient également jouer un rôle majeur dans l'apparition de la pathologie. Dans cette optique, l'équipe de recherche de D. Belin et B.J. Everitt a étendu l'idée de l'automatisation du comportement de recherche de drogue, et a proposé la théorie des « *incentive habits* », ou habitudes incitatives, dans l'addiction (Belin et al., 2013, 2009; Everitt et al., 2018). Selon cette théorie, l'addiction ne reposerait pas uniquement sur le développement d'un comportement habituel de recherche de drogue, mais plutôt sur la combinaison entre l'apparition du comportement habituel et l'augmentation de la force incitatrice des stimuli capables de déclencher ce comportement. La recherche compulsive de la substance d'abus serait ainsi déclenchée par des stimuli sur-associés avec la consommation de drogue, avec la phase de sevrage ou même avec l'état intéroceptif²⁰ de l'individu (Belin et al., 2013, 2009). Avec la répétition des expositions, ces stimuli, initialement cantonnés aux rôles de prédicteurs de la récompense, acquerraient eux-mêmes les propriétés renforçantes attribuées à la substance d'abus. Ils deviendraient alors des renforçateurs conditionnels, et permettraient à l'individu toxicomane de poursuivre son comportement de recherche même si la drogue n'est pas disponible immédiatement ou si elle est dévaluée (Belin et al., 2013).

Afin d'étudier l'influence des stimuli incitateurs associés aux substances d'abus ainsi que leurs propriétés motivationnelles sur le comportement de recherche de drogue, le groupe de recherche sur l'addiction de Cambridge a utilisé, chez le rongeur, une procédure instrumentale appelée « second-order schedule of reinforcement » (procédure de renforcement de second ordre) (Figure 28) (Arroyo et al., 1998; Everitt and Robbins, 2000; Giuliano et al., 2015). En utilisant cette procédure, l'équipe de Cambridge a démontré que les stimuli incitateurs devenaient de véritables renforçateurs du comportement puisqu'ils exacerbèrent la motivation de l'animal pour obtenir la substance d'abus, qu'ils augmentaient

²⁰L'état intéroceptif correspond à l'état interne perçue par l'individu. L'individu toxicomane pourra par exemple percevoir un état d'agitation importante, de stress ou de douleurs qui pourrait déclencher le comportement de recherche compulsif de drogues.

la probabilité de rechute après une période d'abstinence, et que l'omission de ces stimuli réduisait fortement le comportement de recherche de drogue (Arroyo et al., 1998; Everitt et al., 2018; Fouyssac et al., 2021; Giuliano et al., 2015, 2013; Markou et al., 1999).

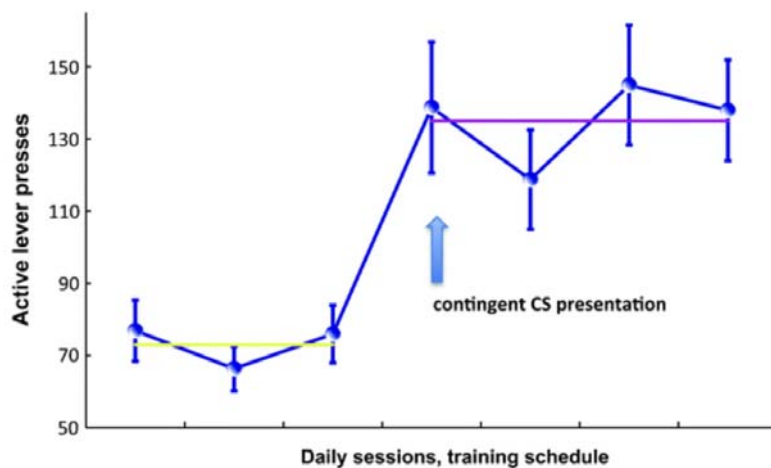


Figure 28: La procédure de renforcement de second ordre chez le rongeur.

Dans cette procédure, les rats apprennent dans un premier temps à s'auto-administrer la drogue sous renforcement continu (FR1) où l'obtention de la récompense est couplée à l'apparition du stimulus conditionnel (ex. lumière). À la suite de cet apprentissage, le programme de renforcement continu est commuté à intervalle fixe (FI), avec des incréments quotidiens : FI1, FI2, FI4, FI8, FI10, et FI15 min. Dans le programme de renforcement à intervalle fixe (FI15), l'animal appui sur le levier mais la récompense n'est obtenue qu'après 15 minutes. Un schéma de renforcement de second ordre est ensuite mis en place dans lequel le stimulus conditionnel est délivré lorsque l'animal réalise 10 appuis sur le levier (FR10). Dans cette configuration FI15(FR10:S), l'animal obtient le stimulus conditionnel tous les 10 appuis mais n'obtient la drogue qu'après 15 minutes ce qui permet d'étudier les propriétés renforçantes acquises par le stimulus conditionnel. Le graphique illustre les performances instrumentales d'une population de rats pendant le premier intervalle d'un programme de renforcement FI15 (ligne verte) et FI15(FR10:S) (ligne violette). Belin et al. 2011.

Au niveau neural, cette amplification du comportement de recherche pourrait s'expliquer par un changement dans les structures gouvernant la recherche de drogue et répondant aux stimuli associés à celle-ci. En effet, si la recherche de la substance d'abus sous l'influence des stimuli incitateurs est initialement médiée par l'amygdale baso-latérale, l'ATV, le NAc core et le DMS, le comportement habituel de recherche de drogue semble médié par le noyau central de l'amygdale et son interaction avec le DLS (Everitt et al., 2018; Ito et al., 2004; Murray et al., 2015, 2012; Puaud et al., 2021; Whitelaw et al., 1996). S'il n'existe aucune connexion directe entre ces deux structures, des projections existent du noyau central de l'amygdale à la SNc, et la SNc projette au DLS, par la voie DA nigrostriée (Belin-Rauscent et al., 2016; Everitt et al., 2018; Fouyssac and Belin, 2019). Ce couplage anormal entre système limbique et système des habitudes, pourrait fournir une « autoroute » par laquelle les

impulsions déclenchées au niveau limbique par des stimuli internes ou externes associés à la substance d'abus, initieraient et soutiendraient le comportement pathologique de recherche de drogue, dépendant du DLS (Figure 29) (Belin-Rauscent et al., 2016). Si l'implication causale des stimuli incitateurs dans la recherche compulsive de drogue reste à démontrer (Jonkman et al., 2012b), l'implication de la voie DA nigrostriée et du DLS dans ce comportement pathologique a bien été mise en évidence. En effet, le blocage de la voie DA nigrostriée dans le DLS, par infusion d'un antagoniste aux récepteurs DA, diminue fortement le comportement de recherche compulsif d'alcool (Giuliano et al., 2019).

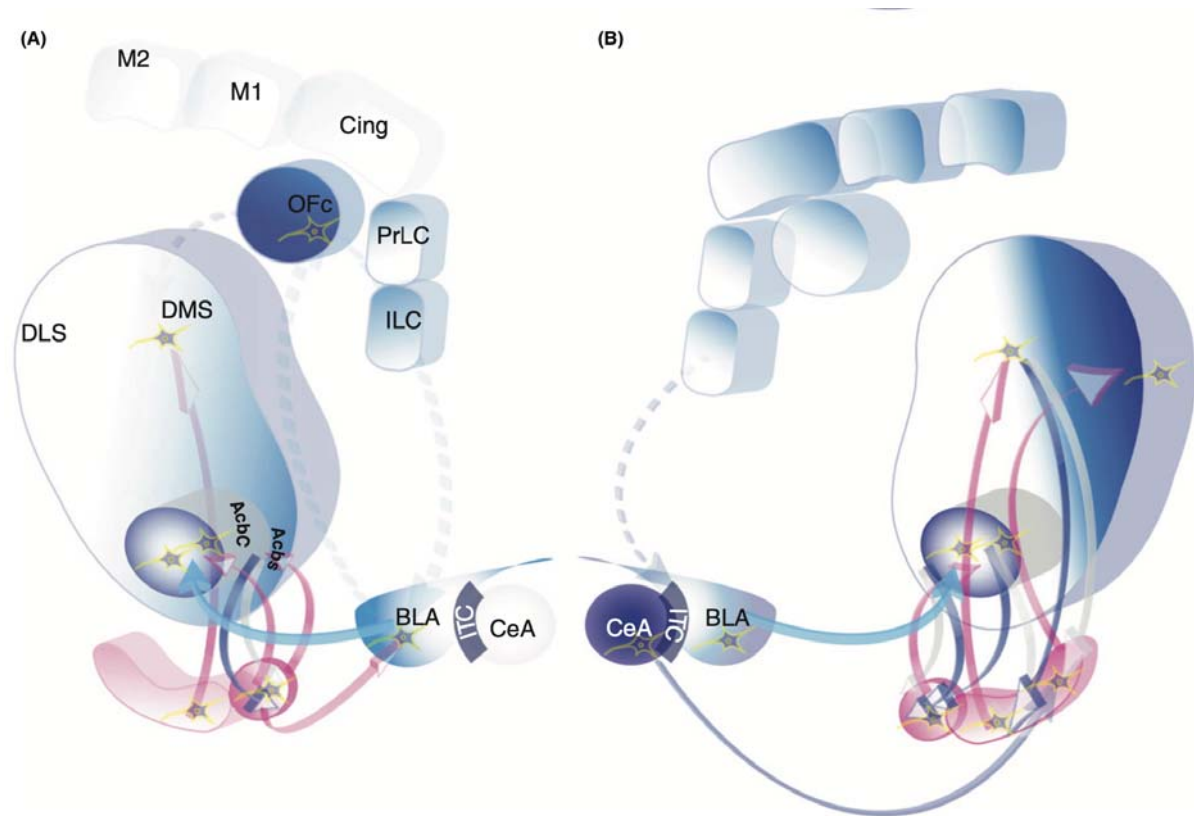


Figure 29: Du comportement dirigé par un but à l'habitude incitative : une autoroute entre le système limbique et le système des habitudes.

(A) Au cours des premières exposition à la drogue, le comportement de recherche est dirigé par un but et dépend d'un réseau globalement similaire à celui décrit pour les récompenses naturelles, comprenant le cortex orbitofrontal, le NAc core et ses interactions fonctionnelles avec l'amygdale baso-latérale (BLA) et la transmission de la dopamine dans le NAc et le DMS. **(B)** Après une exposition prolongée aux drogues, les adaptations neurobiologiques s'étendent du striatum ventral jusqu'au striatum dorsolatéral. Le recrutement de cette structure pourrait être réalisé par l'intermédiaire des connexions spiralées entre le striatum et le mésencéphale et dépendre de la DA. Un couplage aberrant entre le NAc core et le DLS pourrait premièrement, conduire au relais des informations générées par les stimuli conditionnels au niveau de la BLA, une structure associative importante, par le NAc core jusqu'au DLS et déclencher la formation d'habitudes incitatives. Avec la poursuite des intoxications, une transition se produit également au niveau de l'amygdale entre la BLA et le noyau centrale de l'amygdale (CeA). Ce noyau projette au niveau de la SNc qui relaie l'information jusqu'au DLS et semble particulièrement important pour l'expression et le maintien des habitudes incitatives à long terme. Ces deux voies : BLA – NAc Core – DLS et CeA – SNc – DLS, pourrait expliquer comment les stimuli conditionnels obtiennent l'accès direct au système des habitudes et son capable d'initier ou de maintenir le comportement de recherche de drogue alors que celui-ci n'est pas ou plus pertinent, en court-circuitant notamment les systèmes d'analyses et d'évaluations. Les altérations induites par la drogue sont représentées par une échelle d'intensité bleue. Les flèches en pointillées représentent les relations fonctionnelles avec le cortex qui pourrait être impliquées dans les actions et les habitudes pour les drogues. ITC : cellules intercalaires. Belin et al. 2013.

L'ensemble des travaux présentés démontre finalement l'importance du striatum dorsal dans les comportements de recherche et de consommation de drogue. Au sein de cette structure, la surexposition à la drogue et la répétition des comportements associés à celle-ci conduit à la dorso-latéralisation de la région striatale gouvernant le comportement de recherche de drogue (Lüscher et al., 2020; Lüscher and Janak, 2021). L'implication croissante du DLS dans ce comportement aboutirait à l'apparition de comportement de recherche de drogue habituel. Si la drogue promeut la formation de ces comportements, ces derniers ne conduisent pas nécessairement l'individu à la compulsivité. La recherche compulsive de drogue semble plutôt liée à l'incapacité de désengager le DLS lorsque le comportement réalisé par l'individu, sous la forme d'une habitude, n'est plus pertinent (Giuliano et al., 2019). Ce problème de désengagement pourrait, somme toute, être directement lié aux habitudes incitatives et au couplage aberrant entre l'amygdale et le DLS. Dans cette optique, même si le comportement perdait sa pertinence, les stimuli incitateurs persistants conserveraient leurs capacités à déclencher la recherche compulsive de drogue (Belin et al., 2013). Le comportement de consommation compulsif semble également impliquer également le striatum dorsal, notamment dans sa partie la plus médiale (Lüscher et al., 2020; Lüscher and Janak, 2021). Ce comportement reste, cependant, moins bien compris et nécessite de plus amples investigations (Lüscher et al., 2020). Modulateur principal de l'activité du striatum dorsal, la voie DA nigrostriée semble jouer un rôle important dans l'apparition et l'expression de la compulsivité (Giuliano et al., 2021, 2019). L'implication de cette voie dans l'addiction aux drogues étant très récente, les mécanismes neurobiologiques responsables de son implication restent à être décortiqués. Enfin, il est important de noter que, bien que l'addiction ait été abordée sous le prisme de la DA, de la motivation et de l'apprentissage, les processus décisionnels exprimés au niveau cortical jouent également un rôle important dans la pathologie²¹ (Smith and Laiks, 2018). Si les dysfonctions corticales ne seront pas approfondies dans le cadre de ce travail doctoral, il faut cependant garder à l'esprit que des altérations de l'activité de structures telles que le cortex préfrontal médial ou le cortex orbitofrontal contribuerait au développement de la compulsion et à la perte du contrôle de l'usage de la drogue (Lüscher et al., 2020; Lüscher and Janak, 2021).

²¹ L'altération des processus décisionnels et l'altération des processus d'inhibitions comportementales sont des concepts neuropsychologiques retenus dans le cadre de l'étude internationale « Delphi consensus » (Yücel et al., 2019).

IV. Une théorie intégrative du rôle de la DA dans l'addiction

Les différentes théories s'intéressant au rôle de la DA dans l'addiction ont souvent été mises en opposition (Berridge and Robinson, 2016; Koob et al., 2019; Samaha et al., 2021). Elles apparaissent pourtant extrêmement complémentaires pour expliquer une pathologie aux multiples facettes. A ce titre, le RPE anormal, généré à chaque consommation de drogue, conduit à une « hyper-association » entre la substance d'abus et les stimuli associés à son usage. Cette « hyper-association » s'intègre parfaitement dans la théorie de la sensibilisation incitatrice et permet d'expliquer comment la drogue, et les stimuli qui lui sont associés, acquièrent une valeur incitative très importante et dirige le comportement de l'individu vers la substance d'abus. Les théories de la sensibilisation incitatrice et du RPE anormal sont également très complémentaires à la théorie de l'allostase dans l'addiction. En effet, si les deux premières théories placent l'emphase sur l'hyperactivité du signal DA phasique en présence de la drogue, ou des stimuli associés à celle-ci, la dernière théorie souligne l'importance de l'hypoactivité du signal DA tonique lorsque la drogue n'est plus disponible. Puisque tout signal phasique s'observe par rapport à une ligne de base tonique, plus l'état DA tonique sera faible en l'absence de la substance d'abus, et plus les signaux DA phasiques générés par la drogue ou ses stimuli associés seront saillants. Plus les signaux DA phasiques seront saillants, et plus ils auront la capacité de déclencher un comportement motivé chez l'individu, ou de renforcer l'association entre la drogue et les stimuli associés à son usage. Finalement, dans cette théorie intégrative du rôle de la DA dans l'addiction, l'hypodopaminergie tonique s'accorderait parfaitement avec l'hyperactivité phasique et pourrait expliquer certaines contradictions rencontrées dans le domaine des addictions, notamment sur le sens de dérégulation du système DA (Samaha et al., 2021).

La combinaison de ces théories permet également de mieux comprendre comment les substances d'abus altérant le système DA, peuvent altérer le fonctionnement du système critique et de la motivation limbique. L'altération du système « critique » pourrait progressivement biaiser le rapport coût/bénéfice des comportements associés à la drogue en surévaluant le bénéfice associé à son usage, et en minimisant les coûts nécessaires à son obtention ou induits par sa consommation (Takahashi et al., 2009). En parallèle, la diminution des ressources DA disponibles chez cet individu pourrait le contraindre à effectuer un choix dans les comportements à effectuer (Berke, 2018). L'attraction motivationnelle, générée par

la substance d'abus et ses stimuli associés, favoriserait donc l'investissement de l'énergie « motivationnelle » restant à l'individu dans la recherche et la consommation de la drogue au détriment des autres activités ou centres d'intérêts. Avec la répétition des intoxications, les dysfonctions observées au niveau du NAc s'étendraient progressivement au striatum dorsal. L'altération du fonctionnement du système critique pourrait alors s'étendre au système « acteur » ainsi qu'aux motivations dites cognitives, puis motrices (Berke, 2018). Les stimuli incitateurs, décrits dans les théories de la sensibilisation incitative et de l'habitude incitative, obtiendraient finalement l'accès direct au système « acteur » et seraient capable d'initier les comportements de recherche ou de prise de drogue en court-circuitant le système « critique » (Figure 30) (Belin et al., 2013; Fouyssac and Belin, 2019; Piray et al., 2010; Takahashi et al., 2009)

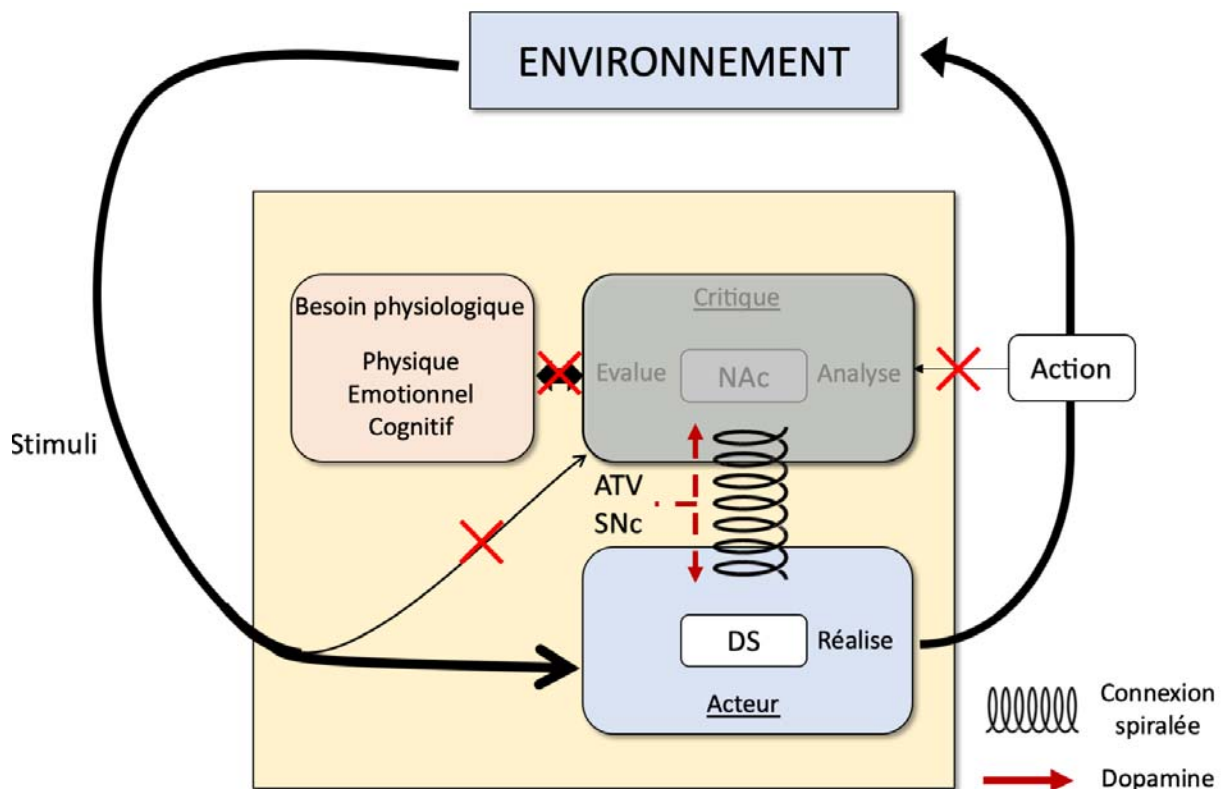


Figure 30 : Le modèle acteur/critique adapté au système DA dans l'addiction aux drogues.

Au cours du développement de l'addiction, les altérations neurobiologiques au sein du NAc vont progressivement conduire au dysfonctionnement du système critique. Le rapport coût/bénéfice associé à l'usage de la drogue sera biaisé en surévaluant la valeur prédictive associée aux stimuli associés à son obtention et en omettant l'état physiologique de l'individu. Le système acteur ne réalisera plus l'action la plus adaptée mais celle maximisant les chances d'obtenir et de consommer la substance d'abus. Enfin, le décalage entre l'action réalisée et la conséquence de celle-ci ne sera plus intégré par le système critique ce qui empêchera tout retour sur le comportement réalisé. Le système DA, qui modulant l'activité de ces deux systèmes et qui est une cible fondamentale des drogues d'abus, joue un rôle clé dans le développement de l'addiction.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les travaux scientifiques présentés au cours de la partie précédente ont largement mis en lumière l'importance de l'ATV, de la voie DA mésolimbique et du NAc dans l'addiction. L'implication du striatum dorsal, et particulièrement du DLS, a également été mise en avant dans des études réalisées au cours de la dernière décennie. Des zones d'ombres demeurent toutefois quant aux rôles des neurones DA de la SNc et de la voie DA nigrostriée dans l'addiction. En effet, cette voie reste très peu étudiée malgré son implication croissante dans les comportements motivés et affectifs, et malgré l'importance supposée de la DA, et plus précisément au sein du DLS, dans l'expression de la compulsivité. Pendant le sevrage, l'apparition d'un état allostatique, caractérisé par un état d'hypodopaminergie tonique de la voie nigrostriée pourrait notamment piéger l'individu dans un état émotionnel et motivationnel négatif. Cet état hypodopaminergique, altérant le ratio phasique/tonique, pourrait également conduire à la dysfonction des signaux DA au niveau du striatum dorsal, et mener l'individu à la compulsivité.

Mon travail de thèse a donc consisté à étudier, à l'aide d'un modèle rongeur et d'une approche de chimogénétique, l'implication de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée dans les déficits motivationnels et émotionnels associés au sevrage et l'usage compulsif d'alcool. Ce travail s'est articulé autour de trois objectifs, trois questions principales :

Objectif 1 : Déterminer si le développement d'un comportement de type compulsif associé à l'alcool est corrélé à un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée au cours du sevrage.

Objectif 2a : Déterminer si une hypodopaminergie de la voie nigrostriée, induite de façon expérimentale, cause des déficits motivationnels et émotionnels s'approchant des symptômes observés pendant le sevrage dans l'alcoolodépendance.

Objectif 2b : Déterminer si une hypodopaminergie de la voie nigrostriée, induite de façon expérimentale, mène à l'apparition d'un comportement de type compulsif associé à l'alcool.

APPROCHES EXPÉRIMENTALES PRINCIPALES



Figure 31 : Accès intermittent à l'alcool : la procédure de choix à deux bouteilles.

La succession des cycles de consommation et des cycles de sevrage va progressivement pousser l'animal à développer une consommation d'alcool de plus en plus importante. Si les raisons sous-jacentes à cette escalade restent encore mal comprises, une des hypothèses pourrait résider dans l'effet stressant induit par les cycles d'accès et de privation à la bouteille d'alcool. Adapté de Sanchis-Segura and Spanagel, 2006.

Différentes approches expérimentales ont été mises en place pour atteindre les trois objectifs principaux susmentionnés. Dans cette partie, je me concentrerai sur l'aspect théorique des approches utilisées afin de permettre une meilleure compréhension de la démarche expérimentale sous-jacente à mes travaux. Les détails techniques seront décrits dans les parties « matériels et méthodes » des articles scientifiques présentés dans la partie « résultats ».

Dans le but de « **Déterminer si le développement d'un comportement de type compulsif associé à l'alcool est corrélé à un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée au cours du sevrage.** », nous avons utilisé une lignée de rats capables de développer volontairement et progressivement une consommation excessive d'alcool (Carnicella et al., 2009b; Simms et al., 2008). Pour ce faire, des rats Long-Evans ont réalisé une expérience d'accès intermittent à l'alcool avec une succession de cycles de consommation (24h) et de sevrage (24h en semaine et 48h lors du week-end). Au cours des cycles de consommation, les animaux avaient accès dans leurs cages de stabulation, à deux bouteilles, une contenant de l'alcool (éthanol - 20%) et l'autre contenant de l'eau (Figure 31). Cette procédure expérimentale, initialement proposée par RA. Wise au début des années 70, puis bien caractérisée aux cours des quinze dernières années, permet par la succession des cycles d'intoxications et de sevrages, d'induire de façon volontaire et spontanée, une escalade progressive de la consommation d'alcool par les animaux (Carnicella et al., 2014b; Kimbrough et al., 2017; Simms et al., 2008; Wise, 1973). Différentes études ont, par exemple, démontré que les animaux entraînés dans cette procédure évoluaient d'une consommation d'alcool modérée (< 2,5 mg/kg/24h) à une consommation excessive (> 5 mg/kg/24h) en trois à quatre semaines d'exposition (Carnicella et al., 2009b, 2008; Simms et al., 2008). En analysant le schéma de consommation des animaux, le laboratoire de D. Ron a également observé qu'environ un tiers de la quantité totale d'alcool ingéré au cours du cycle d'intoxication, était consommé pendant les 30 premières minutes (Carnicella et al., 2009b). Dans ce court laps de temps, cette quantité génère une alcoolémie supérieure à 0,8 g/L de sang (20 mM), seuil correspondant à la définition du « binge drinking » (ou biture express) chez l'homme du National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) (Rolland et al., 2017). Cette alcoolisation excessive et rapide étant particulièrement pertinente dans le cadre de l'usage abusif et excessif d'alcool, nous avons choisi de mesurer la consommation d'alcool après 30

minutes en plus de la mesure réalisée après 24 heures. Les animaux ont été isolés pour réaliser ces mesures et suivre l'évolution de la consommation d'alcool, mais également pour favoriser l'escalade de la consommation (Carnicella et al., 2014b). Le rat étant un animal grégaire, en complément des rongeurs exposés à l'alcool, un groupe de rats a donc suivi la même procédure sans jamais être exposé à la substance d'abus. Ces animaux ont permis de distinguer l'effet de l'intoxication à la substance d'abus et l'effet de la procédure *per se*. Parmi les animaux exposés à l'alcool, nous avons ensuite sélectionné les animaux ayant développé une consommation excessive, et nous avons débuté une expérience d'auto-administration à ratio fixe (FR3 - 1 récompense/3 appuis) dans laquelle les animaux devaient fournir un effort instrumental pour obtenir la récompense d'alcool (Barak et al., 2011; Carnicella et al., 2011, 2009b, 2008). Une fois les animaux entraînés, le caractère compulsif du comportement réalisé a été évalué. La compulsivité d'un comportement se définissant par la poursuite de ce comportement en dépit des conséquences négatives associées à celui-ci, nous avons couplé l'auto-administration d'alcool à la délivrance d'un choc électrique (1 choc/8 appuis) selon le paradigme comportemental publié par Seif et ses collaborateurs (Seif et al., 2013). Cette approche a permis de discriminer deux populations d'animaux : les animaux présentant un comportement de type compulsif, qui continuaient à appuyer malgré le choc électrique, et les animaux non compulsifs, qui arrêtaient d'appuyer lors de l'ajout du choc électrique. Une semaine après la dernière exposition à l'alcool, les animaux compulsifs, non-compulsifs ainsi que les animaux non exposés à l'alcool ont été sacrifiés. Les différents cadrans du striatum (NAc, DMS, DLS) ont été disséqués, puis préparés afin de mesurer, en utilisant un dosage par kit ELISA, les niveaux de DA présents dans ces trois territoires (Résultats - Article II).

Afin de « **Déterminer si un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée, induite de façon expérimentale, cause des déficits motivationnels et émotionnels s'approchant des symptômes observés pendant le sevrage.** », nous avons mis en place une approche de chémogénétique appelée « Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs) ». L'approche DREADDs, développée par BL. Roth et ses collaborateurs, permet une manipulation tonique et sélective de l'activité cellulaire par le biais des voies de signalisation de la protéine G (Armbruster et al., 2007). Souvent comparés à un système de clé et de serrure, les DREADDs reposent sur la combinaison d'un récepteur muscarinique muté (Designer Receptors) qui a perdu son affinité pour l'acétylcholine, et d'un ligand (Designer

Drugs) qui se fixe au récepteur muté et ne possède pas, *a priori*, d'activité pharmacologique endogène (Roth, 2016; Sternson and Roth, 2014). Deux récepteurs sont couramment utilisés : le DREADD excitateur hM3Dq, couplé à une protéine Gq et le DREADD inhibiteur hM4Di, couplé à une protéine Gi. L'objectif de mes travaux étant d'induire une hypodopaminergie de la voie nigrostriée, nous avons sélectionné le DREADDs inhibiteur hM4Di.

Afin d'exprimer ce récepteur sélectivement dans les neurones DA de la SNc nous avons utilisé une lignée de rats transgéniques « *TH-Cre* » et un vecteur viral adéno-associé codant pour le DREADDs inhibiteur hM4Di. Les rats Long-Evans *TH-Cre* expriment la Cre Recombinase sous le promoteur de la Tyrosine Hydroxylase, une enzyme principalement exprimée dans les neurones DA (Witten et al., 2011). Le vecteur viral contient le transgène « hM4Di-mCherry », encadré par deux séquences Lox de chaque côté, dans une position inversée par rapport au sens de lecture du promoteur. En présence de la Cre Recombinase, le transgène subit une recombinaison qui change son orientation et déclenche sa transcription (Figure 32). En utilisant la chirurgie stéréotaxique, nous avons infusé le virus contenant le transgène au niveau de la SNc. Un virus contenant seulement le gène rapporteur mCherry a également été infusé afin de constituer un groupe contrôle. Après l'infusion virale, deux semaines ont été attendues afin de permettre l'expression stable du transgène.

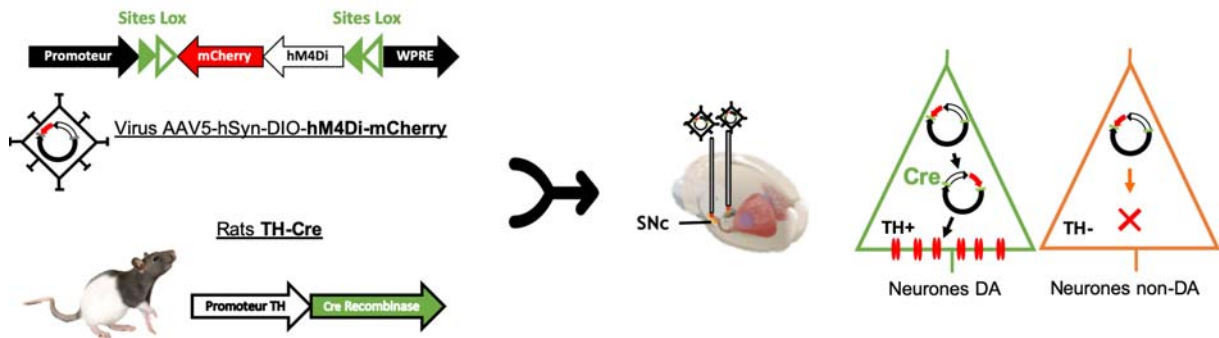


Figure 32 : Expression conditionnelle du DREADD inhibiteur hM4Di dans les neurones DA de la SNc chez le rat TH-Cre.

AAV : virus adéno-associé; Cre : Cre Recombinase; DIO : Double-floxed Inverse Orientation; hSyn : human Synapsin 1; TH : Tyrosine Hydroxylase; WPRE : Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Post-transcriptional Regulatory Element.

Parmi les ligands recommandés pour activer le récepteur, le premier fut le clozapine-N-oxyde (CNO), un métabolite dérivé de la clozapine, un antipsychotique atypique (Armbruster et al., 2007; Ashby and Wang, 1996; Meltzer, 1989). Très largement utilisé ces dernières années, la sélectivité de ce composé fut remise en cause par différentes études

démontrant que le CNO pouvait induire des effets aspécifiques chez des animaux qui n'exprimaient pas les DREADDs (Baerentzen et al., 2019; MacLaren et al., 2016; Manvich et al., 2018; Martinez et al., 2019). L'équipe de recherche de M. Michaelides a également identifié que le CNO était incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et que ce composé était en fait retro-métabolisé en clozapine avant d'activer le DREADD (Juan L Gomez et al., 2017; Jendryka et al., 2019). Notant que la clozapine était capable de traverser la BHE et de se lier aux DREADDs avec une plus grande affinité que le CNO, cette équipe proposa finalement d'utiliser directement de faibles doses de clozapine pour activer le récepteur muté (Juan L Gomez et al., 2017). Une nouvelle fois cependant, des études comportementales démontrèrent que ce ligand, même utilisé à de faibles doses, induisait des effets comportementaux chez des animaux contrôles et n'était donc pas approprié pour activer le récepteur muté (Ilg et al., 2018; Mahler and Aston-Jones, 2018; Manzaneque et al., 2002). L'ensemble de ces résultats a conduit les spécialistes du domaine à développer de nouveaux ligands. Une deuxième génération de ligands a ainsi été conçue, aboutissant à la création de quatre nouveaux ligands : le composé 21 (C21) (Chen et al., 2015), les composés JHU37152 et JHU37160 (JHUs) (Bonaventura et al., 2019) et la Deschloroclozapine (Chen et al., 2015; Nagai et al., 2020). Au début de mon travail doctoral, notre attention s'est portée sur le C21. En effet, bien que ce composé soit peu caractérisé du fait de son développement récent, il offrait une alternative intéressante aux ligands de première génération (Jendryka et al., 2019). KJ. Thompson et ses collaborateurs avaient par exemple démontré qu'une dose de 0,3 à 3 mg.kg⁻¹ était suffisante pour activer les DREADD et induire des effets comportementaux chez la souris, sans induire d'effet aspécifique chez les animaux n'exprimant pas le DREADDs (Thompson et al., 2018). La combinaison entre le récepteur hM4DI et le C21 semblait, finalement, particulièrement attrayante pour moduler l'activité de la voie DA nigrostriée. Il était cependant nécessaire de rester prudent, car de nombreuses études démontraient que les ligands avaient des effets différents en fonction des doses, de l'espèce, de la souche ou du sexe utilisé (Résultats – Commentaire général (Goutaudier et al., 2019) – p.107). Enfin, personne n'avait encore combiné l'utilisation des rats TH-Cre, du récepteur inhibiteur hM4Di et du composé C21. Afin de vérifier que la combinaison entre le C21 et le récepteur hM4Di permettait d'induire une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée chez les rats TH-Cre, nous avons mené des expériences d'électrophysiologie multi-unitaire et de microdialyse *in vivo*. L'expérience d'électrophysiologie multi-unitaire a,

premièrement, permis d'évaluer l'effet de l'approche de chémogénétique sur l'activité électrique des neurones de la SNc (Résultats – Article I (Goutaudier et al., 2020) – p. 113). L'expérience microdialyse a, ensuite, permis de confirmer que l'inhibition des neurones de la SNc, supposés neurones DA, conduisait bien à une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée et à une baisse des niveaux de DA spécifiquement au sein du DLS. Pour ce faire, les niveaux DA du DLS et du NAc ont été mesurés à l'aide de sondes de microdialyse placées au sein de ces deux structures. Les microdialysats recueillis ont ensuite été analysés par chromatographie liquide à haute performance (Résultats - Article II – p. 126). Une fois l'approche validée, nous avons réalisé différentes tâches comportementales afin de déterminer si l'hypodopaminergie de la voie nigrostriée, induite par notre approche, causait des déficits motivationnels et émotionnels (Résultats - Article II – p. 126). En raison de l'implication importante de la voie DA nigrostriée dans la motricité, les capacités motrices des animaux ont également été mesurées afin de vérifier que les animaux ne présentaient pas de déficit moteur pouvant interférer avec les tâches comportementales évoquées précédemment.

Enfin, pour « **Déterminer si un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée, induite de façon expérimentale, mène à l'apparition d'un comportement de type compulsif associé à l'alcool.** », l'approche d'accès intermittent à l'alcool décrite au 1^{er} objectif a été réalisée avec des rats transgéniques TH-Cre. À l'instar de la procédure décrite précédemment, les animaux ayant développé une consommation excessive d'alcool ont ensuite été entraînés à s'auto-administrer de l'alcool. À la fin de la période d'entraînement de la procédure d'auto-administration, nous avons mis en place l'approche de chémogénétique décrite pour le 2^{ème} objectif, afin d'altérer l'activité de la voie DA nigrostriée. Les animaux ont donc été infusés au niveau de la SNc avec le virus codant pour le récepteur hM4Di ou le virus contrôle. Deux semaines après l'infusion du virus, les animaux ont réalisé la procédure d'auto-administration couplée à la délivrance d'un choc électrique. À cette étape, les animaux ont d'abord, été traités avec une solution contrôle pour identifier les animaux présentant un comportement de type compulsif et ceux ne présentant pas ce comportement. Les animaux ont ensuite été traités avec le ligand C21 afin d'induire une hypodopaminergie de la voie nigrostriée et déterminer si cette altération conduisait au développement d'un comportement de type

compulsif associé à l'alcool chez des animaux qui ne présentaient pas initialement ce comportement (Résultats - Article II – p. 126).

RÉSULTATS

Mes résultats seront présentés sous forme de deux publications (un commentaire et article original signés en premier auteur) et d'un manuscrit soumis pour publication (en premier auteur également).

Je commencerai par un commentaire général, présentant les forces et les faiblesses de la chémogénétique, et plus particulièrement de l'approche DREADDs. Ce commentaire, « **DREADDs: the power of the lock, the weakness of the key. Favoring the pursuit of specific conditions rather than specific ligands** » a été publié, en **2019** dans le journal **eNeuro**.

Sur la base des recommandations préconisées dans ce commentaire, je présenterai ensuite le développement et la validation de l'approche de DREADDs dans notre laboratoire, qui a constitué la première partie de mon travail de thèse et a abouti à la publication de l'article « **Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats** », en **2020** dans le journal **PloS One**.

Les résultats décortiquant l'importance du tonus dopaminergique de la voie nigrostriée dans les comportements de type compulsif liés à l'alcool ainsi que dans les comportements motivés et affectifs seront présentés sous la forme d'un manuscrit « **Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use** », déposé sur la plateforme **Biorxiv** et soumis pour publication dans le journal **Molecular Psychiatry**.

Commentaire général - DREADDs: The Power of the Lock, the Weakness of the Key.
Favoring the Pursuit of Specific Conditions Rather than Specific Ligands.

Contexte et objectif : L'approche de chémogénétique DREADDs a révolutionné le domaine des neurosciences intégratives en proposant une nouvelle méthode permettant la modulation tonique et réversible d'une population de neurones (ou non-neuronale) avec une grande sélectivité. La combinaison entre un composé pharmacologique, facilement administrable et sans aucune activité endogène, et un récepteur muté ne présentant pas d'affinité pour les ligands endogènes, a rapidement propulsé cette approche parmi les plus utilisées et discutées dans le domaine (> 1 publication/jour en moyenne depuis 2017). Cependant, des études ont progressivement remis en question la spécificité des DREADDs, en démontrant que les ligands supposés inertes pouvaient induire des effets aspécifiques en absence du récepteur muté, et que les récepteurs mutés pouvaient modifier l'activité des neurones en absence du ligand. Face à ces récents développements, nous avons rédigé un commentaire permettant d'identifier les forces et les faiblesses de l'approche DREADDs. Ce commentaire a également permis de présenter les nouveaux ligands synthétiques, développés pour minimiser les risques d'effets aspécifiques. Enfin, nous avons proposé des recommandations qui permettront de minimiser les risques associés à cette approche et de maximiser son apport dans les études comportementales.

Novel Tools and Methods

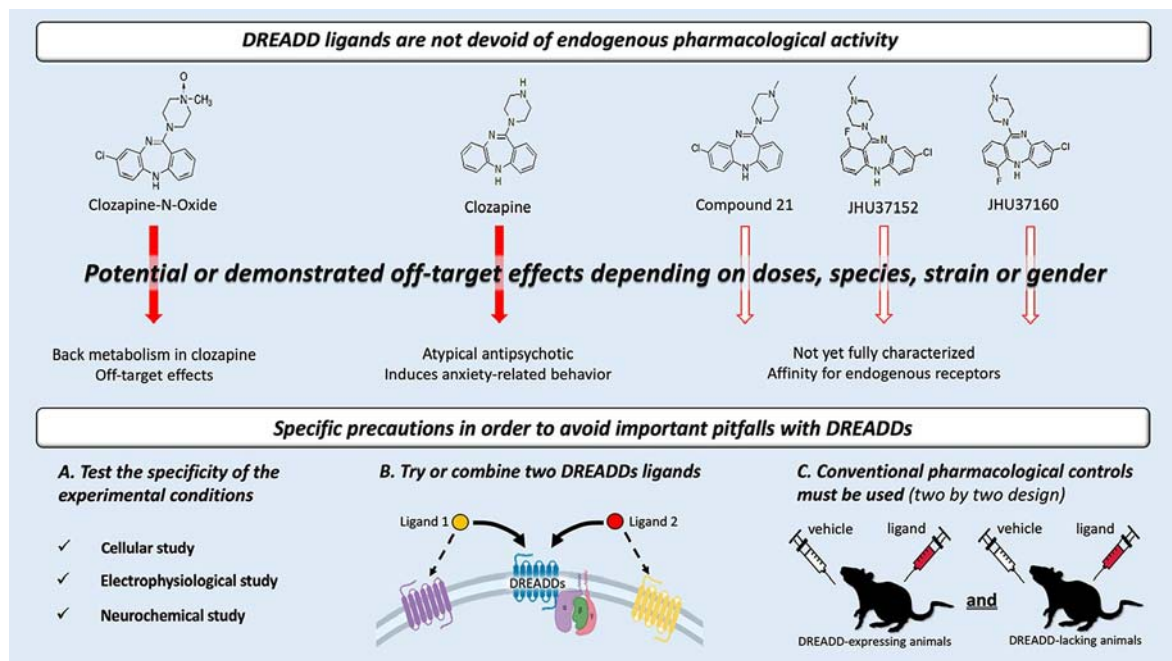
DREADDs: The Power of the Lock, the Weakness of the Key. Favoring the Pursuit of Specific Conditions Rather than Specific Ligands

Raphaël Goutaudier,  Véronique Coizet, Carole Carcenac, and  Sébastien Carnicella

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0171-19.2019>

Grenoble Institut Des Neurosciences, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1216, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Visual Abstract



Key words: behavior; C21; clozapine; CNO; DREADDs; electrophysiology

Significance Statement

DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs) are a powerful and tremendous new technique for selectively manipulating a specific neuronal (or non-neuronal) subpopulation. Recent studies indicate, however, that ligands used for DREADDs, such as clozapine-*N*-oxide or its parent compound clozapine, are not as selective as expected, even at reasonable concentrations. Although the new generation of ligands specifically developed for DREADDs or alternative chemogenetic receptors may present some improvements, the absence of potential off-target effects remains to be fully demonstrated. Together, indications from the recent literature on DREADDs should warn current and future users about some weaknesses of this expanding technique in the field of integrative neuroscience and encourage them to take some specific precautions to avoid important pitfalls with DREADDs, which remain a promising and complementary approach to optogenetics with the relevant controls.

Over the past decade, chemogenetic and optogenetic techniques have revolutionized integrative neuroscience by providing new tools to reversibly manipulate the activity of specific populations or neurotransmitter systems with greater selectivity (Sternson and Roth, 2014; Roth, 2016; Wiegert et al., 2017). Compared with optogenetics, which allow fast and phasic neuronal modulation with high temporal resolution, chemogenetics allow more extended modulation of systems, which is particularly useful for studies focusing on tonic phenomena (e.g., investigation of the implication of dopamine in motivational processes; Whissell et al., 2016). Among chemogenetic tools, designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs) are widely used and are referred to as a biological “lock-and-key” system for selective manipulation of cell activity through G-protein signaling pathways. First developed very elegantly by the Roth’s group (Armbruster et al., 2007), this G-protein-coupled receptor (GPCR) is a muscarinic receptor: the lock, which was mutated to respond only to clozapine-*N*-oxide (CNO), the key, a derived metabolite of the atypical antipsychotic clozapine, otherwise with, potentially, no pharmacological activity.

However, since 2016, some publications have raised worrying issues concerning the use of CNO. First, relatively high doses of CNO (10 mg/kg) administered systemically can have pharmacological off-target activity, as evidenced by the induction of behavioral effects in rats and mice not mediated by DREADDs (MacLaren et al., 2016; Gomez et al., 2017; Baerentzen et al., 2019). In addition, Gomez et al. (2017) showed that CNO does not readily cross the blood–brain barrier, may exhibit low DREADD binding affinity, and was back-metabolized into clozapine, becoming the real effector of the DREADDs. Based on these striking observations, they suggested the direct use of low doses of clozapine (0.1 mg/kg) to activate DREADDs instead of CNO. However, using low doses of clozapine instead of large doses of CNO gradually converting to clozapine leads to two major limitations. First, it is not obvious that clozapine, in acute injection or prolonged diffusion, acts on DREADDs in the same way (Mahler and Aston-Jones, 2018). Second, since clozapine is an atypical antipsychotic agent, it has numerous endogenous targets such as serotonergic, muscarinic, or dopaminergic receptors, with relatively strong

affinities (Meltzer, 1989; Schotte et al., 1993; Brunello et al., 1995; Ashby and Wang, 1996; Armbruster et al., 2007) and are likely to induce off-target effects, even with low doses. Indeed, the 0.1 mg/kg dose of clozapine recommended for DREADD experiments has been found to significantly increase anxiety-related behavior in mice (Manzaneque et al., 2002) as well as in rats (an effect that we also observed; R. Goutaudier and S. Carnicella, unpublished observations), where clozapine also affects locomotion through potential sedation and impairs cognitive flexibility (Ilg et al., 2018).

Although the occurrence of these effects may depend on the species, strain, or sex used, and may be very discrete (as not all behavioral dimensions are affected); they have the potential to significantly interfere with the performance of animals in a variety of behavioral tasks. High stress and anxiety can be confounding factors in memory or pain studies, for example (Sousa et al., 2006; Sorge et al., 2014). Moreover, behavior related to drugs of abuse or psychiatric disorders such as schizophrenia, anxiety, or cognitive flexibility can modify the whole phenotype (Floresco et al., 2009; Koob and Schulkin, 2018). Based on these observations, important precautions are needed with clozapine to avoid biased behavioral studies.

Would a new molecule specifically designed for DREADDs be more selective? Compound 21 (C21) is a synthetic DREADD ligand, developed in 2015 (Chen et al., 2015) and partially characterized *in vitro* as well as *in vivo* in 2018 (Thompson et al., 2018). Once again, at low doses (<3 mg/kg), it was described to be devoid of behavioral off-target effects and able to alter the behavior of DREADD-expressing animals. This study was strengthened by Jendryka et al. (2019), who conducted pharmacokinetic and pharmacodynamic experiments using mice and C21 (3 mg/kg). They showed that 30 min after C21 administration the concentration of the molecule in the CSF was >10 times higher than the estimated EC₅₀ for DREADD activation ([C21]_{CSF} = 40 nM and EC_{50DREADDs} = 3 nM), and without back-metabolization into clozapine. However, the results of a recent *BioRxiv* preprint study in rats, mice and macaques (Bonaventura et al., 2018) suggest that, although C21 exhibits a low brain penetrance, a dose of 1 mg/kg may already modify brain function in wild-type mice. In addition, a weak affinity and occupancy for DREADDs was observed *in vitro* in rat brain slices, as well as *in vivo* in mice and macaques in a positron emission tomography study. Based on the same experimental investigation as for C21, they proposed, as an alternative, two other ligands, JHU37152 and JHU37160, that possess a higher *in vivo* potency for DREADDs and potentially fewer off-target effects (Bonaventura et al., 2018). Although this new generation of DREADD ligands appears promising, due to their novelty, they are still poorly characterized and remain structurally homologous to clozapine and CNO. Exhaustive characterization in cellular to behavioral investigation will therefore be crucial to exclude the potential pitfalls found for CNO.

An alternative solution for improving the selectivity of chemogenetic approaches would be to use another lock and key combination. As such, the κ -opioid receptor-

Received May 9, 2019; accepted August 9, 2019; First published September 27, 2019.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: R.G., V.C., C.C., and S.C. wrote the paper.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-16-CE16-0002, to S.C.), and Université Grenoble Alpes.

Acknowledgments: We thank Fiona Hemming for English corrections, as well as Sabrina Boulet and Elodie Fino for critical reading of the manuscript.

Correspondence should be addressed to Sebastien Carnicella at Sebastien.carnicella@inserm.fr.

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0171-19.2019>

Copyright © 2019 Goutaudier et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

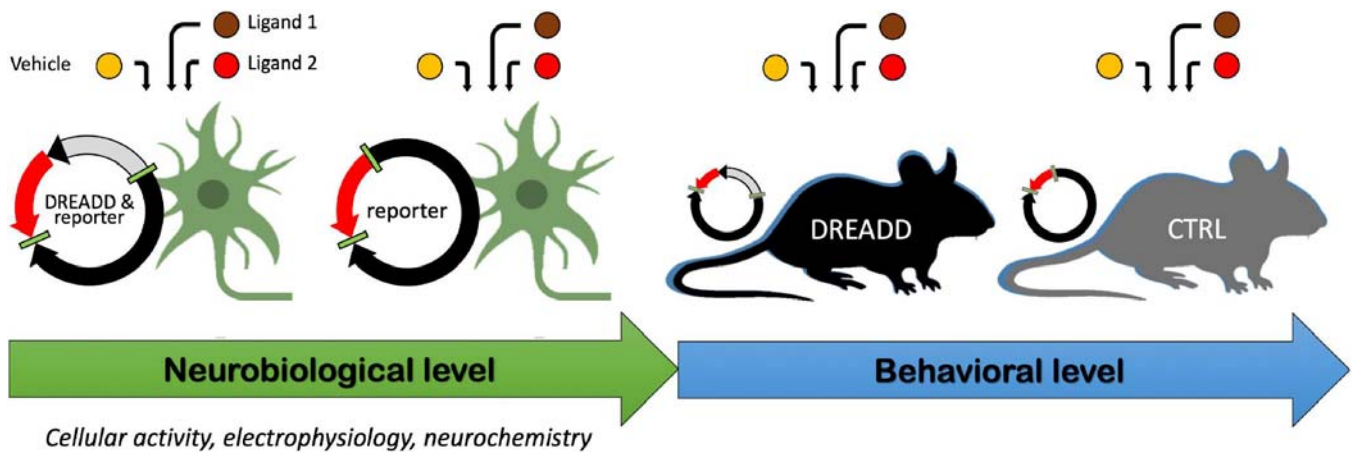


Figure 1. Three steps proposed to validate experimental conditions for DREADD selectivity and efficiency. (1) At a neurobiological level, find the optimal experimental conditions, ligand, and concentration with cellular, electrophysiological, or neurochemical experiments before behavioral investigation. (2) Confirm that an effect is DREADD mediated using two different ligands compared with the vehicle. (3) Do not forget to include DREADD-lacking animals (expressing only the reporter gene) during experiments to verify that the effect, at the chosen dose, is specific to the receptor–ligand interaction.

DREADD (KORD) is a mutated inhibitory GPCR derived from human κ -opioid receptor (Vardy et al., 2015). Compared with classical DREADDs that bind clozapine, CNO, C21, or JHU compounds, KORD is engaged by salvinorin B, a drug-like metabolite of the KOR-selective agonist salvinorin A. Although this chemogenetic approach was elegantly used in combination with an activatory DREADD to create an “ON and OFF” system within the same neuronal population (Vardy et al., 2015, Aldrin-Kirk et al., 2016), it remains marginally used because it only reduces the neuronal activity over a short period of time (Aldrin-Kirk and Björklund, 2019). In addition, salvinorin B exhibits some affinity for endogenous KOR at high concentrations and has not yet benefited from in-depth characterization as it is currently performed for DREADD-related compounds (Roth, 2016). Replacing the GPCR by a mutated ion channel, another alternative designed receptor called ligand-gated ion channels (LGICs) is an option developed by the Stenson laboratory (Magnus et al., 2011). Compared with DREADDs, LGICs combine the ligand-binding domain of a mutated nicotinic receptor with the ion pore domain of another chosen receptor to create a chimeric ion channel. Similar to DREADDs, this hybrid channel is activated by a small agonist derived from quinuclidinyl benzamide, an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, and allows ion exchange across the neuronal membrane. Among other limitations specific to this approach (Aldrin-Kirk and Björklund, 2019), it also shares with DREADDs the use of a pharmacological ligand that can potentially interact with endogenous receptors, depending on the experimental conditions. Finally, all these locks derive from endogenous receptors and, as such, fail to get rid of the limitations intrinsically linked to pharmacology.

Beyond these recent developments and the questions that remain, a crucial question should be asked: will a totally selective and inert key ever be found? Probably not. It is essential to bear in mind that DREADDs are chemogenetic tools combining genetics and pharmacol-

ogy. Although genetic approaches offer powerful control of the expression of the locks (i.e., DREADDs) in specific cell populations, or subpopulations with conditional approaches, they derive from endogenous GPCRs and, as such, are subject to the same limits as classical pharmacology for the key. It is therefore unlikely that molecules will be found that will exhibit high binding affinity for DREADDs without affinity for some of the numerous receptors that are already present in the brain and are closely related to DREADDs. For instance, clozapine has a very high affinity for DREADDs, but also for the serotonergic receptor 5-HT₂ ($K_i = 10^{-8}$ for both; Armbruster et al., 2007; Gomez et al., 2017), and a high affinity for a broad range of other GPCRs ($K_i = 10^{-7}$ to 10^{-6} ; Armbruster et al., 2007). Even synthetic ligands that are specifically designed for this chemogenetic technique exhibit substantial affinities for endogenous receptors. For instance, although JHU37152 and JHU37160 have a lower affinity for 5-HT receptors than clozapine, they have an overall similar target profile to this drug, with an even higher affinity for the muscarinic receptors (Bonaventura et al., 2018), suggesting potentially stronger off-target effects. C21 also exhibits a higher affinity for the histaminergic H₁ receptor than for DREADDs ($K_i > 10^{-8}$ and $K_i = 10^{-7.2}$, respectively; Thompson et al., 2018) and a greater binding potential to opioid receptors than clozapine (Bonaventura et al., 2018). To minimize the pitfalls of this powerful approach, regardless of the key choice, critical precautions must be taken (Fig. 1).

First, before any behavioral experiment, the experimental conditions must be tested to find the best ligand and the optimal dose or doses, depending on the experimental approach. DREADDs must not be considered as a turnkey tool; cellular, neurochemical or electrophysiological experiments should be performed before the behavioral study (Mahler et al., 2014; Beloate et al., 2016; Boekhoudt et al., 2016) to confirm the efficacy of the ligand at the chosen dose in the system of interest. In addition, DREADD-lacking control animals must also be

included to verify the absence of aspecific neurobiological effects of the ligand or the receptor per se that may be activated by a neurotransmitter or have a constitutive activity (Saloman et al., 2016).

Second, when possible, two different DREADD ligands should be tested to confirm that the observed behavioral effects are specifically DREADD mediated. The specific pharmacological actions on DREADDs would be similar, but off-target effects may differ.

Third, and the most critical point, conventional pharmacological controls must be used. The same philosophy as in pharmacology should be applied, and, as for neurobiological experiments, groups of transgenic animals without expressing DREADDs (e.g., DREADDs empty viral vectors) must be integrated to verify the selective effects of the ligand and chosen dose (Smith et al., 2016; Campbell and Marchant, 2018; Mahler and Aston-Jones, 2018; for an example of experimental studies following this design, see also Xia et al., 2017; Cope et al., 2019). This statement may appear trivial, but the pursuit of an absolute selective ligand and the attractiveness of this approach have already led to some overconfident behavioral studies, sometimes conducted in the complete absence of this control.

In conclusion, DREADDs provide a precise way of manipulating neural circuits and behavior, and afford a great alternative to optogenetics to tonically manipulate a specific cellular subpopulation, thus opening exciting new avenues of research. However, just as thermal properties of light in optogenetics can lead to aspecific effects (see also Owen et al., 2019), greater precaution is needed with chemogenetics, and standard controls must be mandatory. DREADD limitations must be recognized and time must be taken to avoid or to control possible off-target effects and to verify that this approach does not induce bias per se. Using the strengths of genetics while paying attention to the weaknesses of pharmacology will maximize the potential of this approach.

References

- Aldrin-Kirk P, Björklund T (2019) Practical considerations for the use of DREADD and other chemogenetic receptors to regulate neuronal activity in the mammalian brain. *Methods Mol Biol* 1937:59–87.
- Aldrin-Kirk P, Heuer A, Wang G, Mattsson B, Lundblad M, Parmar M, Björklund T (2016) DREADD modulation of transplanted DA neurons reveals a novel parkinsonian dyskinesia mechanism mediated by the serotonin 5-HT6 receptor. *Neuron* 90:955–968.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5163–5168.
- Ashby CR, Wang RY (1996) Pharmacological actions of the atypical antipsychotic drug clozapine: a review. *Synapse* 24:349–394.
- Baerentzen S, Casado-Sainz A, Lange D, Shalgunov V, Tejada IM, Xiong M, L'Estrade ET, Edgar FG, Lee H, Herth MM, Palner M (2019) The chemogenetic receptor ligand clozapine N-oxide induces in vivo neuroreceptor occupancy and reduces striatal glutamate levels. *Front Neurosci* 13:187.
- Beloate LN, Omrani A, Adan RA, Webb IC, Coolen LM (2016) Ventral tegmental area dopamine cell activation during male rat sexual behavior regulates neuroplasticity and *D*-amphetamine cross-sensitization following sex abstinence. *J Neurosci* 36:9949–9961.
- Boekhoudt L, Omrani A, Luijendijk MCM, Wolterink-Donselaar IG, Wijbrans EC, van der Plasse G, Adan RAH (2016) Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:1784–1793.
- Bonaventura J, Eldridge MA, Hu F, Gomez JL, Sanchez-Soto M, Abramyan AM, Lam S, Boehm M, Ruiz C, Farrell M, Moreno A, Galal Faress IM, Andersen N, Lin JY, Moaddel R, Morris P, Shi L, Sibley DR, Mahler SV, Nabavi S, et al. (2018) Chemogenetic ligands for translational neurotherapeutics. *bioRxiv*. Advance online publication. December 7, 2018. doi:10.1101/487637.
- Brunello N, Masotto C, Steardo L, Markstein R, Racagni G (1995) New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacology* 13:223–234.
- Campbell EJ, Marchant NJ (2018) The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. *Br J Pharmacol* 175:994–1003.
- Chen X, Choo H, Huang XP, Yang X, Stone O, Roth BL, Jin J (2015) The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chem Neurosci* 6:476–484.
- Cope ZA, Vazey EM, Floresco SB, Aston Jones GS (2019) DREADD-mediated modulation of locus coeruleus inputs to mPFC improves strategy set-shifting. *Neurobiol Learn Mem* 161:1–11.
- Floresco SB, Zhang Y, Enomoto T (2009) Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 204:396–409.
- Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357:503–507.
- Ilg A-K, Enkel T, Bartsch D, Böhner F (2018) Behavioral effects of acute systemic low-dose clozapine in wild-type rats: implications for the use of DREADDs in behavioral neuroscience. *Front Behav Neurosci* 12:173.
- Jendryka M, Palchadhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Kätzel D, Nissen W, Pekcec A (2019) Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep* 9:1.
- Koob GF, Schulkin J (2018) Addiction and stress: an allostatic view. *Neurosci Biobehav Rev* 106:245–262.
- MacLaren DAA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, España RA, Clark SD (2016) Clozapine N-oxide administration produces behavioral effects in Long-Evans rats: implications for designing DREADD experiments. *eNeuro* 3:ENEURO.0219-16.2016.
- Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM (2011) Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* 333:1292–1296.
- Mahler SV, Aston-Jones G (2018) CNO evil? Considerations for the use of DREADDs in behavioral neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 43:934–936.
- Mahler SV, Vazey EM, Beckley JT, Keistler CR, McGlinchey EM, Kaufling J, Wilson SP, Deisseroth K, Woodward JJ, Aston-Jones G (2014) Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat Neurosci* 17:577–585.
- Manzanares JM, Brain PF, Navarro JF (2002) Effect of low doses of clozapine on behaviour of isolated and group-housed male mice in the elevated plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:349–355.
- Meltzer HY (1989) Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 99 [Suppl]:S18–S27.
- Owen SF, Liu MH, Kreitzer AC (2019) Thermal constraints on in vivo optogenetic manipulations. *Nat Neurosci* 22:1061–1065.
- Roth BL (2016) DREADDs for neuroscientists. *Neuron* 89:683–694.

- Saloman JL, Scheff NN, Snyder LM, Ross SE, Davis BM, Gold MS (2016) G_i-DREADD expression in peripheral nerves produces ligand-dependent analgesia, as well as ligand-independent functional changes in sensory neurons. *J Neurosci* 36:10769–10781.
- Schotte A, Janssen PFM, Megens A, Leysen JE (1993) Occupancy of central neurotransmitter receptors by risperidone, clozapine and haloperidol, measured ex vivo by quantitative autoradiography. *Brain Res* 631:191–202.
- Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler SV (2016) DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behav Neurosci* 130:137–55.
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, Wieskopf JS, Acland EL, Dokova A, Kadoura B, Leger P, Mapplebeck JC, McPhail M, Delaney A, Wigerblad G, Schumann AP, Quinn T, Frasnelli J, Svensson CI, Sternberg WF et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11:629–632.
- Sousa N, Almeida OFX, Wotjak CT (2006) A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 5 [Suppl 2]:5–24.
- Sternson SM, Roth BL (2014) Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci* 37:387–407.
- Thompson KJ, Khajehali E, Bradley SJ, Navarrete JS, Huang XP, Slocum S, Jin J, Liu J, Xiong Y, Olsen RHJ, DiBerto JF, Boyt KM, Pina MM, Pati D, Molloy C, Bundgaard C, Sexton PM, Kash TL, Krashes MJ, Christopoulos A, et al. (2018) DREADD Agonist 21 is an effective agonist for muscarinic-based DREADDs in vitro and in vivo. *ACS Pharmacol Transl Sci* 1:61–72.
- Vardy E, Robinson JE, Li C, Olsen RHJ, DiBerto JF, Giguere PM, Sassano FM, Huang XP, Zhu H, Urban DJ, White KL, Rittiner JE, Crowley NA, Pleil KE, Mazzone CM, Mosier PD, Song J, Kash TL, Malanga CJ, Krashes MJ, et al. (2015) A New DREADD facilitates the multiplexed chemogenetic interrogation of behavior. *Neuron* 86:936–946.
- Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ (2016) The use of DREADDs to deconstruct behavior. *Front Genet* 7:1–15.
- Wiegert JS, Mahn M, Prigge M, Printz Y, Yizhar O (2017) Silencing neurons: tools, applications, and experimental constraints. *Neuron* 95:504–529.
- Xia F, Richards BA, Tran MM, Josselyn SA, Takehara-Nishiuchi K, Frankland PW (2017) Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *Elife* 6:e27868.

Article I - Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats.

Contexte et objectif : Afin de moduler l'activité de la voie DA nigrostriée de façon sélective et transitoire, nous avons choisi de développer au laboratoire l'approche des DREADDs en combinant l'utilisation du récepteur inhibiteur hM4Di et le C21. Avant d'entamer de longues expériences de comportement, nous avons voulu déterminer les paramètres optimaux permettant d'inhiber efficacement les neurones DA de la SNc, sans induire d'effet aspécifique.

Méthodologie : Des rats TH-Cre ont été infusés au sein de la SNc avec un virus floxé codant le récepteur hM4Di ou un transgène contrôle, ce qui a permis l'expression conditionnelle des transgènes dans les neurones DA. Des expériences d'électrophysiologie extracellulaire ont ensuite été réalisées afin de mesurer l'activité électrique des neurones de la SNc, avant et après l'injection de C21. En se basant sur les données existantes, deux doses de C21 ont été testées : 0,5 et 1 mg/kg. Enfin, des critères électrophysiologiques ont permis de vérifier que la population de neurones enregistrés était principalement constituée de neurones DA.

Principaux résultats : Chez les mâles, la dose de 1 mg/kg a induit une forte augmentation de l'activité neuronale de la SNc chez les rats contrôles n'exprimant pas le DREADD. La dose de 0,5 mg/kg n'a pas induit cet effet aspécifique chez les rats contrôles, mais a bien conduit à une inhibition transitoire de l'activité des neurones de la SNc chez les rats exprimant le récepteur hM4Di. Chez les femelles en revanche, une augmentation transitoire de l'activité neuronale est toujours observée à la dose de 0,5 mg/kg, à la fois chez les rattes exprimant le DREADDs et celles ne l'exprimant pas.

Conclusion : Nos résultats montrent que même pour des doses recommandées dans la littérature, le C21 peut, à l'instar du CNO, ne pas s'avérer aussi inerte qu'initialement décrit. Chez les mâles, la dose de C21 de 0,5 mg/kg est cependant efficace pour activer le récepteur inhibiteur hM4Di et conduire à une inhibition des neurones de la SNc sans induire d'effet aspécifique. Chez les femelles, il persiste un risque d'effet aspécifique, même avec la dose de

0,5 mg/kg. Afin d'éviter tout biais induit par notre approche DREADD, nos études comportementales se focaliseront sur les rats mâles et la dose de 0,5 mg/kg.

RESEARCH ARTICLE

Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats

Raphaël Goutaudier, Véronique Coizet, Carole Carcenac, Sebastien Carnicella¹*

Institut national de la santé et de la recherche médicale, Grenoble Institut des Neurosciences, U1216, Université, Grenoble Alpes, Grenoble, France

* sebastien.carnicella@inserm.fr

Abstract

Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs) represent a technical revolution in integrative neuroscience. However, the first used ligands exhibited dose-dependent selectivity for their molecular target, leading to potential unspecific effects. Compound 21 (C21) was recently proposed as an alternative, but *in vivo* characterization of its properties is not sufficient yet. Here, we evaluated its potency to selectively modulate the activity of nigral dopaminergic (DA) neurons through the canonical DREADD receptor hM4Di using *TH-Cre* rats. In males, 1 mg.kg⁻¹ of C21 strongly increased nigral neurons activity in control animals, indicative of a significant off-target effect. Reducing the dose to 0.5 mg.kg⁻¹ circumvented this unspecific effect, while activated the inhibitory DREADDs and selectively reduced nigral neurons firing. In females, 0.5 mg.kg⁻¹ of C21 induced a transient and residual off-target effect that may mitigated the inhibitory DREADDs-mediated effect. This study raises up the necessity to test selectivity and efficacy of chosen ligands for each new experimental condition.

OPEN ACCESS

Citation: Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S (2020) Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. PLoS ONE 15(9): e0238156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238156>

Editor: Gilberto Fisone, Karolinska Institutet, SWEDEN

Received: May 14, 2020

Accepted: August 10, 2020

Published: September 18, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238156>

Copyright: © 2020 Goutaudier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Introduction

Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs) are chemogenetic tools that represent one of the major breakthroughs of the last ten years in integrative neuroscience [1,2]. Combining the precision of genetics with pharmacology, DREADDs provide a remote, prolonged and reversible control of neuronal or extra-neuronal subpopulations via conditional expression and allow the study of complex phenomena in awake animals. As such, they were elegantly used to easily induce tonic modulation, affording an alternative to optogenetics which is more adapted for phasic modulation [3], and to study the implication of different neural system in various behaviors such as feeding, memory, pain or motivation (reviewed in [4]). Initially described as a “lock and key” system, DREADDs are G-protein-coupled receptors that rely on the combination of a mutated muscarinic receptors, that have lost their affinity for acetylcholine, and a designed drug which binds to the mutated receptor with potentially otherwise no pharmacological activity [5]. Two Designed Receptors were originally and are

(Inserm), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE16-0002, to SC) and Grenoble Alpes University.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

commonly used for DREADD modulation: hM3Dq, coupled to Gq protein which increases neuronal activity and hM4Di, coupled to Gi protein which decreases neuronal activity. A next generation of DREADDs deriving from other endogenous metabotropic and ionotropic receptors were developed over time [6]. Similarly, different DREADDs ligands have been developed. The first DREADD ligand was Clozapine-N-oxide (CNO), a derived metabolite of the atypical antipsychotic clozapine. Initially described to be devoid of endogenous activity at moderate doses [5], this ligand was widely used to activate DREADDs during the past decade. However, the selectivity of this compound depends on the dose (e.g., [7]), and it was observed that CNO induced behavioral off-target effects in both mice and rats which did not express DREADDs [8,9]. In addition, Gomez et al. [10], reported that CNO was not the real DREADDs activator since it was not able to cross the blood brain barrier (BBB) and was in fact back-metabolized in low doses of clozapine. However, behavioral investigations quickly showed that even low doses of clozapine induce anxiety-related behaviors in naive animals [11,12], indicating that this molecule is not appropriated as a DREADDs ligand (see also [3]). All these observations together led to the necessity of developing new ligands. As such, a second generation of ligands was engineered leading to the creation of three new synthetic ligands: compound 21 (C21) developed by Chen et al. [13], JHU37152 and JHU37160 (JHUs) developed by Bonaventura et al. [14]. Compared to JHUs, C21 has been developed earlier and as such, has gained interest in the field. For instance, Thompson et al. [15], have demonstrated that C21 from 0.3 to 3 mg.kg⁻¹ was sufficient to activate DREADDs in mice and to induce selective behavioral alterations. C21 appears therefore to be an interesting DREADDs activator. However, it remains to be fully characterized in other species and other experimental conditions, as caution is needed since designed ligands could have different outcomes depending on the doses, species, strains or gender used [3]. In the present study, we aimed at further document the *in vivo* properties of C21 by extending its DREADDs application to transgenic *TH-Cre* rats. Indeed, *TH-Cre* rats are frequently used in combination to DREADDs as they appear as a powerful tool for the investigation of tonic modulation of mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic (DA) systems in motivated, cognitive and affective behaviors [16–19]. However, no one has tested yet the potential efficiency and selectivity of C21 in this experimental model.

Materials and methods

Animals

29 males and 13 females *TH-Cre* rats (breeding at the Plateforme Haute Technologie Animal, La Tronche) were included in this study. They were housed in a 12h/12h reverse light cycle, with food and water *ad libitum*. At the beginning of the experiments, the males weighed between 240 and 430g and females weighed between 200g and 320g. All experimental protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the new French directive 2010/63, and were approved by the French national ethics committee no. 004.

Stereotaxic viral infusion

Animals were anesthetized with a mixed intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (Chlorkétam, 60 mg.kg⁻¹, Merial SAS, Lyon, France) and xylazine (Rompun, 10 mg.kg⁻¹, Bayer Santé, Puteaux, France). Then local anesthesia was provided by a subcutaneous injection of lidocaine (Lurocaïne, 8 mg.kg⁻¹, Laboratoire Vetoquinol S.A., France) on the skull surface and animal were secured in a Kopf stereotaxic frame under a microbiological safety post (PSM). Coordinates for SNc injections were determined according to [20], adjusted to the body weight and set at, relative to bregma: -4.3 mm (AP), ±2.4 mm (ML), -7.9 mm (DV). Animals were infused bilaterally with 1 µl of AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (10¹² particles.ml⁻¹, Addgene,

Watertown, Massachusetts, États-Unis, #44362-AAV5) or 1 μL of AAV5-hSyn-DIO-mCherry (10^{12} particles. mL^{-1} , Addgene, #50459-AAV5). The virus was infused at a rate of $0.2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ using microinjection cannula (33-gauge, Plastic One, USA) connected to a 10 μL Hamilton syringe and a microinjection pump (Stoelting Co., Wood Dale, IL). After injection, the cannula remained *in situ* for 5 min before withdrawal to allow the injected solution to be absorbed into the parenchyma. The skin was sutured, disinfected, and the animal placed in a heated wake-up cage, before being replaced in its home-cage after complete awakening and monitored for a couple of days.

Reagent

C21 (Hello Bio, Bristol, UK) was dissolved in 0.9% saline and kept at -20°C before testing. All the injections were given intraperitoneally, at 0.5 or $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (at a volume of $1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$). A vehicle solution (NaCl 0.9%) was prepared and kept in the same conditions.

In vivo extracellular electrophysiology

At least two weeks after viral infusion, we performed extracellular multiunit recordings to assess neuronal activity of SNc neurons. Rats were anesthetized continuously with isoflurane and body temperature was maintained at 37°C with a thermostatically controlled heating blanket. Two tungsten electrodes (Phymep, Paris, France), allowing recording of a neuronal population, were implanted bilaterally into the SNc using the coordinates determined according to [20], and set at: -4.3 mm (AP, bregma), $\pm 2.3 \text{ mm}$ (ML, bregma) and -6.5 mm (DV, brain surface). Coordinates between infusion and electrophysiology were slightly changed to avoid the area of mechanical injury induced by the injection. Extracellular voltage excursions were amplified, band-pass filtered (300 Hz–10 kHz), digitized at 10 kHz and recorded directly onto computer disc using a Micro 1401 data acquisition system (Cambridge Electronic Design [CED] Systems, Cambridge, UK) running CED data capture software (Spike 2). Once electrodes were implanted and signal stabilized, baseline (BL) without treatment was recorded during 10 minutes before *i.p.* administration of a vehicle solution (VEH—NaCl 0.9%). The VEH period of 20 minutes was followed by *i.p.* administration of C21 ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ or $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), for a recording period of 240 minutes. Then, the position of SNc recording sites were marked with a small lesion caused by passing 10 μA DC current for 1 min through the tungsten recording electrode. Multi-unit activity was normalized by the baseline activity of the first 10 minutes. Recordings with more than 25% of variation of the multi-unit activity between the baseline pre-injection and the vehicle periods were excluded from the study. One recording per hemisphere were performed. Recordings were excluded after histological and immunohistological analyses (see below) when the recording site was outside the SNc and/or when DREADDs or control virus expression in the SNc was absent.

As SNc contains of a majority of DA neurons but also a minority of GABA neurons [21], to decipher the nature of the neurons recorded we performed additional spike analysis, focusing on the action potential's shape. In multi-unit recordings, DA neuronal extracellular signals are characterized by a triphasic spike, with a duration greater than 2 ms, and a duration measured from spike initiation to the maximal negative phase of the action potential greater than 1.1 ms [22–24]. Only recording fulfilling these criteria were included in the study. In addition, we observed a low variability in the shape of the waveform average obtained from our recordings indicating that this average is from a highly homogeneous population of putative dopaminergic neurons with a long duration triphasic action potentials, and is unlikely to include GABA neurons with biphasic short-lasting spikes (Fig 1).

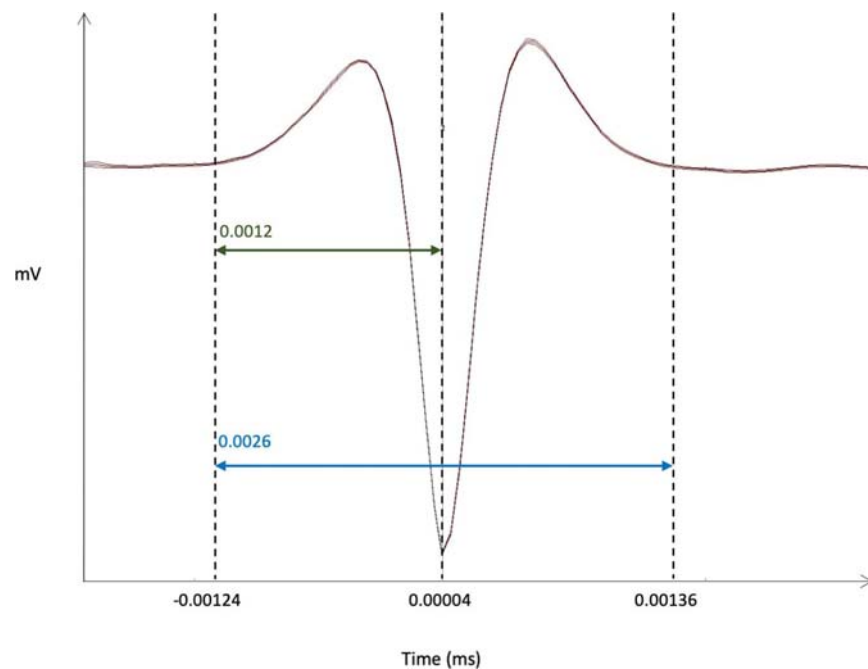


Fig 1. Representative example of the waveform average of recordings. The total duration of the triphasic spike is indicated in blue. The duration, from spike initiation to the maximal negative phase of action potential, is indicated in green. Data are presented as the waveform average \pm SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238156.g001>

Tissue preparation and histological validation

At the end of the experiment, rats were deeply anesthetized by isoflurane saturation and transcardially perfused with 0.9% NaCl (100 mL) followed by 4% paraformaldehyde (300 mL, PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). After decapitation, brains were extracted and post-fixed for 24h in 4% PFA. They were then cryoprotected in 20% sucrose/PB for 24h and frozen in isopentane cooled to -50°C on dry ice. Coronal sections (30 μm) of mesencephalon were cut using a cryostat (Microm HM 525; Microm, Francheville, France). Placement of electrodes were verified by Cresyl violet staining and visualized with the ICS FrameWork computerized image analysis system (TRIBVN, 2.9.2 version, Châtillon, France), coupled to a light microscope (Nikon, Eclipse 80i) and a Pike F-421C camera (ALLIED Vision Technologies, Stadroda, Germany) for digitalization. Meanwhile, floating coronal section of three levels of the mesencephalon were selected as previously described [25] for assessment of DREADDs expression.

TH-immunohistochemistry and DREADDs expression localization

To assess DREADDs expression in DA mesencephalic regions, immunostaining for tyrosine hydroxylase (TH) was performed. Free-floating 30 μm thick coronal sections were washed with TBS and incubated for 1 h in 0.3% Triton X-100 in TBS (TBST) and 3% normal goat serum (NGS). They were then incubated with primary monoclonal mouse anti-TH antibody (mouse monoclonal MAB5280, Millipore, France, 1/2500) diluted in TBST containing 1% NGS overnight (4°C). Then, slices were incubated with a green fluorescent conjugated goat anti-mouse Alexa 488 antibody (1/500, Invitrogen[™], Waltham, Massachusetts, USA) for 1h30 at room temperature. They were finally mounted on superfrost glass slides, with Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., Germany). Fluorescent pictures of TH labelling and mCherry

expression were taken using a slide scanner (Z1 Axioscan, Zeiss Göttingen, Germany), at x20 magnification and analyzed with ImageJ. DREADD expression was quantified for each hemisphere by comparing the number of TH-labeled-mCherry-positive neurons with the number of TH-labeled neurons within three areas: the lateral SNc (lSNc), the medial SNc (mSNc) and the Ventral Tegmental Area (VTA). We have also verified first that mCherry was only detected in TH-positive neurons. Fluorescent illustrations presented in this article were taken with a laser-scanning confocal microscope (LSM710, Zeiss). Z-stacks of digital images were captured using ZEN software (Zeiss).

Data analyses

For DREADDs expression, data were expressed as the mean number of quantified hemispheres for which recordings were included \pm SEM (number of quantified hemispheres and animals for each group are detailed in figure legends). For extracellular electrophysiology, data were expressed as the mean number of recordings \pm SEM (number of included recordings and animals for each group are detailed in figure legends). Parametric analyses were performed after verification of the assumptions of normality (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests) and sphericity (Bartlett's test). Data were analyzed by t-test, RM one-way ANOVA, two-way ANOVAs and RM two-way ANOVAs, depending on the experimental design, using GraphPad Prism 8 (summarized in [S1 Table](#)). As the electrophysiological recordings were long, some values were missing due to artefacts (3% of the data recorded in extracellular electrophysiology). In this case, data were analyzed by fitting a mixed model proposed by the statistical software. This mixed model uses a compound symmetry covariance matrix, and is fit using Restricted Maximum Likelihood (REML). When indicated, post hoc analyses were carried out with the Bonferroni's correction procedure. Significance for p values was set at $\alpha = 0.05$. Effect sizes for the ANOVAs were also reported using partial η^2 values [26,27]. Determining these values from the mixed-model analysis was however not accessible.

Results

We thereby infused into the substantia nigra pars compacta (SNc) of male and female *TH-Cre* rats, a floxed virus encoding for the inhibitory DREADDs hM4Di coupled to mCherry (σ -hM4Di and φ -hM4Di). Meanwhile, a floxed virus encoding only for mCherry was infused in control groups (σ -mCherry and φ -mCherry) ([Fig 2](#)). With extracellular electrophysiology, we first verified that basal activity of the neuronal subpopulations recorded within the SNc were comparable between our different experimental groups, since DREADDs may have a constitutive activity [28]. We found neither differences between σ -hM4Di and σ -mCherry animals (23.6 events/s \pm 1.9 and 21.2 events/s \pm 2.9 respectively, $t(39) = 0.65$, $p = 0.521$) nor between φ -hM4Di and φ -mCherry animals (38.8 events/s \pm 7.3 and 26.7 events/s \pm 4.3 respectively, $t(13) = 1.48$, $p = 0.164$). We also verified that basal activity of this multi-unit recording remains stable over time in groups of mCherry and hM4Di animals only treated with saline (RM one-way ANOVAs report no effect of time: $F_s < 0.98$, $p > 0.46$, partial $\eta^2 < 0.12$; [S1 Fig](#)).

Then, we tested the potential effect of two concentrations of C21, 1 mg.kg⁻¹ and 0.5 mg.kg⁻¹, on the neuronal activity of the SNc in σ -mCherry or σ -hM4Di animals ([Figs 3 and S2](#)). We first assessed the effect of 1 mg.kg⁻¹ of C21 in σ -mCherry animals ([Fig 3B and 3D](#)). We observed a robust and persistent increase in the activity of nigral neurons, indicating that, even within the recommended range of doses [15], C21 can have strong non-DREADDs mediated pharmacological effects. Importantly, decreasing the dose of C21 to 0.5 mg.kg⁻¹ allowed to completely circumvent this unspecific effect on SNc neuronal activity (Mixed-effects analysis highlights a main effect of treatment: $F_{(1, 13)} = 16.08$, $p < 0.01$; of the time: $F_{(8, 98)} = 6.38$,

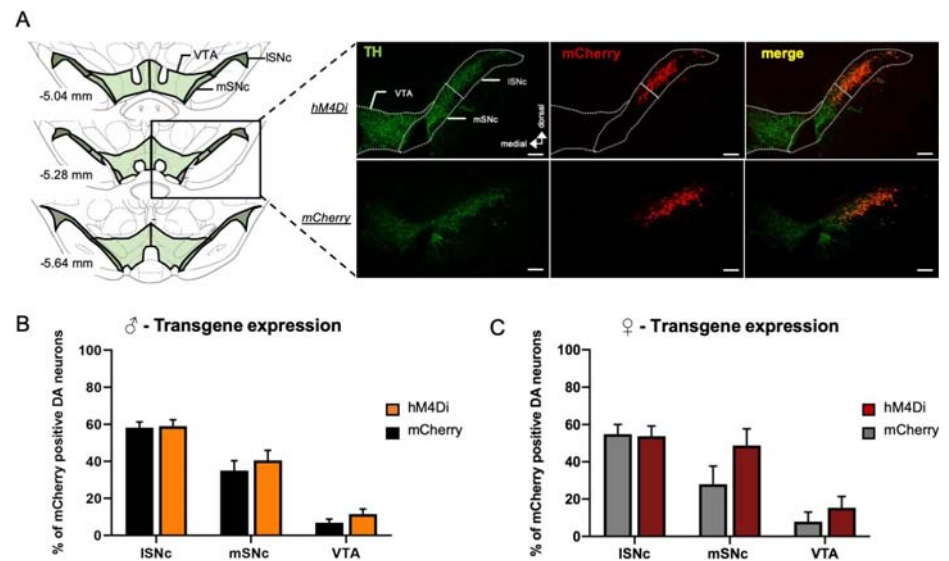


Fig 2. hM4Di-mCherry and mCherry expression in mesencephalic DA neurons of *TH-Cre* rats. (A) On the left, schema of the three levels of mesencephalon used for quantified viral expression with three areas: lateral SNc (ISNc), medial SNc (mSNc) and Ventral Tegmental Area (VTA). The black rectangle indicates the level at which representative images, on the right, were taken to illustrate TH immunostaining and hM4Di-mCherry or mCherry expression. (B-C) Percent of transgenes expression in the ISNc, mSNc and VTA for males (B) (hM4Di, orange, $n = 18$ hemispheres, 13 animals; mCherry, black, $n = 23$ hemispheres, 16 animals) or females (C) (hM4Di, red, $n = 7$ hemispheres, 7 animals; mCherry, grey, $n = 8$ hemispheres, 6 animals). A similar pattern of expression was observed between males and females with a gradient of expression from ISNc to the VTA (two-way ANOVAs: $F_s > 18.83$, $p < 0.001$, $\text{partial } \eta^2 > 0.49$), in both transgene conditions (two-way ANOVAs: $F_s < 2.45$, $p > 0.16$, $\text{partial } \eta^2 < 0.06$). For each area, the given percent of expression correspond to the mean expression of the three levels of mesencephalon. Scale bar: 200 μm . Data were expressed as the mean number of quantified hemispheres for which recordings were included \pm SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238156.g002>

$p < 0.001$; and treatment \times time interaction: $F_{(8, 98)} = 5.44$, $p < 0.01$; Fig 3D, left panel). Overall, a 100%-increase was observed between 90 to 180 minutes after the injection of C21 at 1 mg.kg^{-1} compared to vehicle, an effect that was absent at 0.5 mg.kg^{-1} (Two-way ANOVAs showed a main effect of the treatment: $F_{(1, 13)} = 17.45$, $p < 0.01$, $\text{partial } \eta^2 = 0.57$; of the transgene: $F_{(1, 13)} = 17.81$, $p < 0.01$, $\text{partial } \eta^2 = 0.59$; and treatment \times transgene interaction: $F_{(1, 13)} = 15.74$, $p < 0.01$, $\text{partial } \eta^2 = 0.55$; Fig 3D, middle and right panel). We next tested whether the dose of 0.5 mg.kg^{-1} of C21, devoid of off-target effect in the SNc, was sufficient to activate the DREADDs in σ -hM4Di animals and to produce significant *in vivo* chemogenetic effects. As shown on Fig 3C and 3E, 0.5 mg.kg^{-1} of C21 induced in σ -hM4Di but not in σ -mCherry animals, a significant reduction of SNc neuronal activity, as expected from the activation of an inhibitory receptor selectively expressed in a DA neuronal subpopulation. This decrease became evident 90 minutes after the injection of C21 and ended 120 minutes later (Mixed-effects analysis highlighted a main effect of transgene: $F_{(1,17)} = 5.89$, $p < 0.05$; marginal effect of time $F_{(8,130)} = 1.97$, $p = 0.055$ and no significant transgene \times time interaction $F_{(8,130)} = 1.67$, $p = 0.113$; Fig 3E, left panel). Overall, a 30%-decrease was observed between 90 to 180 minutes after injection of 0.5 mg.kg^{-1} of C21 compared to vehicle and the mCherry control condition (Two-way ANOVAs showed a main effect of the treatment: $F_{(1, 17)} = 6.52$, $p < 0.05$, $\text{partial } \eta^2 = 0.28$; of the transgene: $F_{(1, 17)} = 6.69$, $p < 0.05$, $\text{partial } \eta^2 = 0.38$; and treatment \times transgene interaction: $F_{(1, 17)} = 10.26$, $p < 0.01$, $\text{partial } \eta^2 = 0.37$; Fig 3E, middle and right panel). Notably, we also observed a complete recovery of the basal activity in σ -hM4Di rats at 240 minutes post-injection. This indicates that, consistently with the DREADDs approach, this effect was

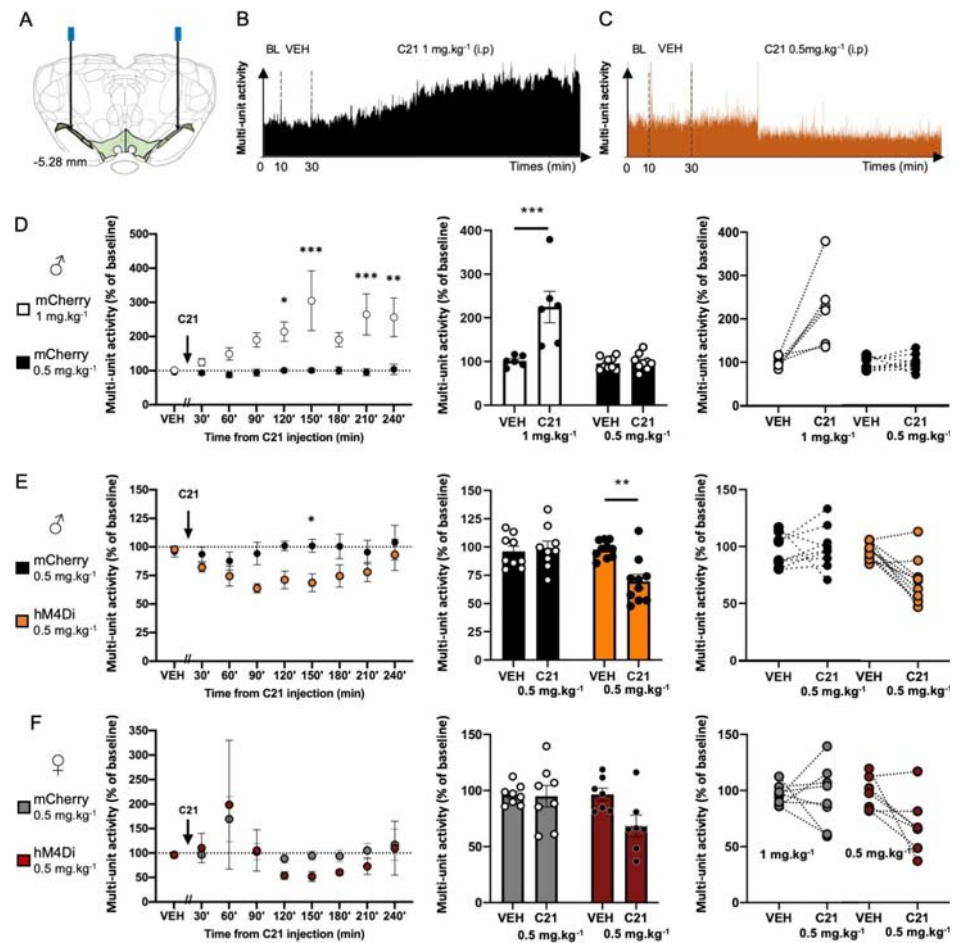


Fig 3. Dose dependent effect of C21 on multi-unit activity of SNc neurons expressing hm4Di-mCherry or mCherry. (A) Schema of the bilateral electrodes implantations. (B) Representative data obtained during recording of neuronal subpopulation within the SNc from male mCherry rat treated with 1 mg.kg⁻¹ of C21. (C) Representative data obtained during recording of neuronal subpopulation within the SNc from male hm4Di rat treated with 0.5 mg.kg⁻¹ of C21. (D-F) On the left, effect of C21 along time on SNc neuronal multi-unit activity, during vehicle (VEH, a 20-minutes interval) and C21 periods (30-minutes intervals), normalized to 10-minutes baseline recording. In the middle and on the right, mean neuronal multi-unit activity, during the VEH period and between the 90 and 180 minutes post-C21 injection intervals, normalized to baseline. (D) Effect of C21 in mCherry male rats treated with 1 (white, n = 6 recordings, 4 animals) or 0.5 (black, n = 9 recordings, 7 animals) mg.kg⁻¹. (E) Effect of C21 in mCherry (black, n = 8 recordings, 7 animals) or hm4Di (orange, n = 10 recordings, 8 animals) male rats treated with 0.5 mg.kg⁻¹. (F) Effect of C21 in mCherry (grey, n = 8 recordings, 6 animals) or hm4Di (red, n = 7 recordings, 7 animals) female rats treated with 0.5 mg.kg⁻¹. Data were expressed as the mean number of recording sides +/- SEM. BL: baseline, VEH: vehicle. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238156.g003>

reversible, and not due to a loss of signals along time. These findings indicate that, in male *TH-Cre* rats, 0.5 mg.kg⁻¹ of C21 is sufficient to potently activate hm4Di in *TH-Cre* rats, without inducing endogenous off-target effects.

As brain responses may differ between males and females [29], we next investigated the effect of 0.5 mg.kg⁻¹ of C21 in female *TH-Cre* rats. As in male, this dose of C21 selectively decreased the activity of nigral neurons in female hm4Di rats (Fig 3F). This effect was however not detected as significant (Fig 3F, left panel: Mixed-effects analysis report no significant effect of the transgene: $F_{(1, 13)} = 0.28, p = 0.605$; neither of time: $F_{(8, 95)} = 1.88, p = 0.072$; nor time x transgene interaction: $F_{(8, 95)} = 0.23, p = 0.977$; Fig 3F, middle and right panel: Two-way

ANOVAs report a marginal effect of treatment: $F_{(1,13)} = 3.63$, $p = 0.079$, no significant effect of the transgene: $F_{(1, 13)} = 3.13$, $p = 0.1$, or significant treatment x transgene interaction: $F_{(1, 13)} = 3.13$, $p = 0.1$, consistent with lower effect sizes of DREADDs as compared to male (Fig 3F, middle and right panel: partial $\eta^2 = 0.22$, partial $\eta^2 = 0.18$, partial $\eta^2 = 0.19$, for the treatment, the transgene an treatment x transgene interaction respectively). This is probably due to the fact that, in contrast to male, a residual unspecific effect of C21, highlighted by a clear transient increase of 169% of the activity at 60 min post-injection (Fig 2F), likely mitigated the following DREADDs-mediated effect. (Fig 3F, left panel). Therefore, detecting a statistically significant DREADDs-mediated effect may require a greater number of animals for female with this dose of C21.

Discussion

Here, we demonstrated that C21 possesses both specific and unspecific effect on rats depending on doses used. In males, at 0.5 mg.kg^{-1} , C21 activated hM4Di with a potent *in vivo* effect, without inducing off-target effect. This led to a reversible inhibition of nigral neurons activity selectively in hM4Di-expressing animals. Conversely, at 1 mg.kg^{-1} , C21 induced a robust and long-lasting increase of SNc neurons activity in hM4Di-lacking animals. In females, this unspecific effect was also transiently observed, in both hM4Di-expressing and hM4Di-lacking animal, with the dose of 0.5 mg.kg^{-1} , meaning that precaution must be taken in studies using both genders. This is critical because scientists working on transgenic lines often used males and females to obtain larger cohorts (e.g., [10,14,28,30]). Relative potent affinity of C21 for some endogenous receptors may account for the off- target effect evidenced in the present study. Indeed, C21 may exhibit similar affinity for serotonergic 5-HT₂ Gi-coupled and histaminergic H₁ Gq-coupled receptors than for hM4Di behaving potentially as a competitive antagonist of these receptors [3,7,15]. Given that 5-HT₂ Gi-coupled receptors are expressed on SNc DA neurons [31,32], by blocking this inhibitory receptor, C21 can promote SNc neurons activity [33]. In addition, blocking H₁ Gq-coupled receptors that are located on nigral GABAergic neurons can lead to a reduction of the GABAergic inhibition on nigral DA neurons and therefore enhance their activity [34,35]. Although these two hypotheses remain speculative and deserve further investigations, it appears not unlikely that, depending on the dose, C21 exhibits such off-target effect on SNc neuronal activity.

Finally, this study demonstrates that C21 can be a potent DREADDs activator in rats. It also clearly illustrates that, because DREADDs derive from endogenous receptors and rely on the use of pharmacological compounds, they are unlikely to be fully devoid of off-target effects, even if new ligands are proposed each year and help to maximize this approach. These effects will always depend on the dose, the species, the strains and the gender used. Therefore, regardless of the chosen ligand, a “model-dependent” approach must be adopted to assess the selectivity and efficiency of the ligand for every new experimental condition prior any behavioral experiment.

Supporting information

S1 Fig. Basal neuronal activity and recording remain stable over time in animals treat with saline solution. Effect of vehicle along time on SNc neuronal activity rate in rats expressing mCherry (n = 8 recordings, 5 animals) (A) or hM4Di (n = 8 recordings, 5 animals) (B). To keep the same experimental conditions, two saline injections were realized, one at the end of the 10-minutes baseline recording (VEH, a 20-minutes interval) and one at the end of the vehicle period corresponding to the time of C21 injection (30-minutes intervals). Data were

expressed as the mean number of recording sides +/- SEM.
(TIF)

S2 Fig. Location of recording sites within the SNc among the different groups studied. Male expressing mCherry treated with 1 mg.kg⁻¹ of C21 (A) or 0.5 mg.kg⁻¹ of C21 (B). Male expressing hM4Di treated with 0.5 mg.kg⁻¹ of C21 (C). Female expressing mCherry (D) or hM4Di (E) and treated with 0.5 mg.kg⁻¹ of C21.
(TIF)

S1 Table. Summary of statistical analyses.
(TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Sabrina Boulet and Yvan Vachez for critical reading of the manuscript. The authors also would like to thank Jacques Brocard and the PIC GIN Platform for technical assistance in fluorescence microscopy and analysis, as well as the in vivo experimental platform.

Author Contributions

Conceptualization: Raphaël Goutaudier, Sebastien Carnicella.

Data curation: Raphaël Goutaudier.

Formal analysis: Raphaël Goutaudier, Véronique Coizet, Sebastien Carnicella.

Funding acquisition: Sebastien Carnicella.

Investigation: Raphaël Goutaudier.

Methodology: Raphaël Goutaudier, Véronique Coizet, Carole Carcenac.

Resources: Véronique Coizet.

Supervision: Sebastien Carnicella.

Validation: Véronique Coizet, Carole Carcenac, Sebastien Carnicella.

Writing – original draft: Raphaël Goutaudier, Véronique Coizet, Carole Carcenac, Sebastien Carnicella.

References

1. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*. 2016; 89: 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040> PMID: 26889809
2. Campbell EJ, Marchant NJ. The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. *Br J Pharmacol*. 2018; 175: 994–1003. <https://doi.org/10.1111/bph.14146> PMID: 29338070
3. Goutaudier R, Carcenac C, Coizet V, Carnicella S. DREADDs: the power of the lock, the weakness of the key Favoring the pursuit of specific conditions rather than specific ligands. *eNeuro*. 2019; 0–14.
4. Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ. The use of DREADDs to deconstruct behavior. *Front Genet*. 2016; 7: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00001> PMID: 26858746
5. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 5163–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700293104> PMID: 17360345
6. Aldrin-Kirk P, Björklund T. Practical considerations for the use of DREADD and other chemogenetic receptors to regulate neuronal activity in the mammalian brain. *Methods in Molecular Biology*. 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9065-8_4 PMID: 30706390

7. Jendryka M, Palchadhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Kätzel D, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep*. 2019; 9: 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37186-2> PMID: 30626917
8. MacLaren DAA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, Espana RA, et al. Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *eNeuro*. 2016; 3. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0219-16.2016> PMID: 27822508
9. Baerentzen S, Casado-Sainz A, Lange D, Shalgunov V, Tejada IM, Xiong M, et al. The chemogenetic receptor ligand Clozapine N-oxide induces *in vivo* neuroreceptor occupancy and reduces striatal glutamate levels. *Front Neurosci*. 2019; 13: 187. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00187> PMID: 31001069
10. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-shah P, Rodriguez LA, et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. 2017; 507: 503–507.
11. Mahler S V., Aston-Jones G. CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Neuropsychopharmacology*. 2018; 43: 934–936. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.299> PMID: 29303143
12. Ilg A-K, Enkel T, Bartsch D, Böhner F. Behavioral Effects of Acute Systemic Low-Dose Clozapine in Wild-Type Rats: Implications for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Front Behav Neurosci*. 2018; 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00173> PMID: 30154702
13. Chen X, Choo H, Huang XP, Yang X, Stone O, Roth BL, et al. The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chem Neurosci*. 2015; 6: 476–484. <https://doi.org/10.1021/cn500325v> PMID: 25587888
14. Bonaventura J, Eldridge MAG, Hu F, Gomez JL, Sanchez-Soto M, Abramyan AM, et al. High-potency ligands for DREADD imaging and activation in rodents and monkeys. *Nat Commun*. 2019; 10: 4627. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12236-z> PMID: 31604917
15. Thompson KJ, Khajehali E, Jin J, Liu J, Krashes MJ, Roth BL, et al. DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs *In Vitro* and *In Vivo*. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2018; 1: 61–72. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.8b00012> PMID: 30868140
16. Mahler S V, Vazey EM, Beckley JT, Keistler CR, McGlinchey EM, Kaufling J, et al. Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat Neurosci*. 2014; 17: 577–85. <https://doi.org/10.1038/nn.3664> PMID: 24584054
17. Boekhoudt L, Voets ES, Flores-Dourojeanni JP, Luijendijk MC, Vanderschuren LJ, Adan RA. Chemogenetic Activation of Midbrain Dopamine Neurons Affects Attention, but not Impulsivity, in the Five-Choice Serial Reaction Time-Task in Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2016; 1–11. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.306> PMID: 26657948
18. Beloate LN, Omrani A, Adan RA, Webb IC, Coolen LM. Ventral Tegmental Area Dopamine Cell Activation during Male Rat Sexual Behavior Regulates Neuroplasticity and D-Amphetamine Cross-Sensitization following Sex Abstinence. *J Neurosci*. 2016; 36: 9949–9961. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-16.2016> PMID: 27656032
19. Runegaard AH, Fitzpatrick CM, Woldbye DPD, Andreasen JT, Sørensen AT, Gether U. Modulating dopamine signaling and behavior with chemogenetics: Concepts, progress, and challenges. *Pharmacol Rev*. 2019; 71: 123–156. <https://doi.org/10.1124/pr.117.013995> PMID: 30814274
20. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. Elsevier Acad Press. 2007.
21. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*. 2008; 152: 1024–1031. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046> PMID: 18355970
22. Ungless MA, Grace AA. Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.02.003> PMID: 22459161
23. Coizet V, Dommett EJ, Redgrave P, Overton PG. Nociceptive responses of midbrain dopaminergic neurones are modulated by the superior colliculus in the rat. *Neuroscience*. 2006; 139: 1479–1493. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.030> PMID: 16516396
24. Coizet V, Comoli E, Westby GWM, Redgrave P. Phasic activation of substantia nigra and the ventral tegmental area by chemical stimulation of the superior colliculus: An electrophysiological investigation in the rat. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 28–40. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02415.x> PMID: 12534966

25. Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*. 2014; 19: 358–67. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.3> PMID: 23399912
26. Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, Boulet S, Houeto JL, Savasta M, et al. Nigrostriatal dopaminergic denervation does not promote impulsive choice in the rat: Implication for impulse control disorders in Parkinson's disease. *Front Behav Neurosci*. 2018; 12: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001> PMID: 29403366
27. Levine TR, Hullett CR. Eta Squared, Partial Eta Squared, and Misreporting of Effect Size in Communication Research. *Human Communication Research*. 2002. <https://doi.org/10.1093/hcr/28.4.612>
28. Saloman JL, Scheff NN, Snyder LM, Ross SE, Davis BM, Gold MS. Gi-DREADD Expression in Peripheral Nerves Produces Ligand-Dependent Analgesia, as well as Ligand-Independent Functional Changes in Sensory Neurons. *J Neurosci*. 2016; 36: 10769–10781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3480-15.2016> PMID: 27798132
29. Choleris E, Galea LAM, Sohrabji F, Frick KM. Sex differences in the brain: Implications for behavioral and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018; 85: 126–145. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.005> PMID: 29287628
30. Xia F, Richards BA, Tran MM, Josselyn SA, Takehara-Nishiuchi K, Frankland PW. Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *Elife*. 2017; 6: 1–25. <https://doi.org/10.7554/elife.27868> PMID: 28960176
31. Fink KB, Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev*. 2007; 59: 360–417. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07103> PMID: 18160701
32. Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cornéa-Hébert et al. 1999.pdf. 1999; 209: 187–209. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/2/026010> PMID: 23428937
33. Di Giovanni G, De Deurwaerdère P, Di Mascio M, Di Matteo V, Esposito E, Spampinato U. Selective blockade of serotonin-2C/2B receptors enhances mesolimbic and mesostriatal dopaminergic function: A combined in vivo electrophysiological and microdialysis study. *Neuroscience*. 1999; 91: 587–597. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00655-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00655-1) PMID: 10366016
34. Korotkova TM, Haas HL, Brown RE. Histamine excites GABAergic cells in the rat substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Neurosci Lett*. 2002; 320: 133–136. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00050-2) PMID: 11852180
35. Dringenberg HC, De Souza-Silva MA, Schwarting RKW, Huston JP. Increased levels of extracellular dopamine in neostriatum and nucleus accumbens after histamine H1 receptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998; 358: 423–429. <https://doi.org/10.1007/pl00005274> PMID: 9826064

Article II - Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use

Contexte et objectifs : Les mécanismes à l'origine de l'apparition de la compulsivité et de l'état d'hyperkatifeia dans les phases les plus sévères de l'alcoolodépendance restent aujourd'hui mal compris. Déjà impliquée dans les phases précoces de la pathologie, la DA pourrait également jouer un rôle majeur dans les phases les plus sévères, notamment par son action au sein du striatum dorsal, une structure importante associée aux comportements compulsifs, et qui reçoit son innervation DA de la SNc par la voie DA nigrostriée. Nous avons donc étudié ici l'implication potentielle de la voie DA nigrostriée dans les déficits motivationnels et émotionnels associés à la phase de sevrage, ainsi que dans l'usage compulsif d'alcool.

Méthodologie : Les niveaux de DA tissulaires dans le DLS, le DMS et le NAc ont été mesurés par ELISA dans trois groupes d'animaux : des rats exprimant un comportement compulsif pour l'alcool (opérationnalisé par la résistance à la punition dans une expérience d'auto-administration d'alcool couplée à des chocs électriques), des rats n'exprimant pas ce comportement et des rats jamais exposés à l'alcool. Sur la base de nos résultats, l'approche DREADDs a ensuite été utilisée pour induire une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée chez des rats ne présentant pas un comportement de type compulsif et pour déterminer si cette altération était suffisante pour induire de la compulsivité. Nous avons également étudié l'effet de cette altération sur les comportements motivés et émotionnels tels que les comportements de type anxieux et dépressif.

Principaux résultats : Une diminution des niveaux de DA spécifiquement au sein du DLS a été retrouvée uniquement dans le groupe de rats exprimant un comportement compulsif vis-à-vis de la prise d'alcool. Cette hypodopaminergie de la voie nigrostriée corrélait également avec le degré de résistance à la punition. Aucune différence dans les niveaux de DA n'a par ailleurs été observée au niveau du DMS ou du NAc entre les trois groupes d'animaux. L'induction d'un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée a permis de faire apparaître un comportement compulsif chez des animaux qui n'exprimaient pas initialement ce comportement. Enfin, cet état a permis d'induire des comportements de type apathique

(déficit motivationnel pour un renforçateur naturel, ici du saccharose en accès opérant), mais n'a eu aucun effet sur les comportements liés à l'anxiété et à la dépression.

Conclusion : Nos résultats démontrent l'implication causale de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée dans le développement des comportements compulsifs associés à l'usage d'alcool. Nos résultats suggèrent également que cet état pourrait être à l'origine des altérations motivationnelles observées au cours du sevrage, et soulignent le rôle important de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés, aussi bien au niveau physiologique que pathologique.

Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use

Running title: Nigrostriatal hypodopaminergia drives compulsivity

Authors: Raphaël Goutaudier Ph.D¹, David Mallet Ph.D¹, Magali Bartolomucci M.S², Denis Guicherd B.S³, Carole Carcenac Ph.D¹, Frédérique Vossier B.S¹, Thibault Dufourd Ph.D¹, Sabrina Boulet Ph.D¹, Colin Deransart Ph.D², Benoit Chovelon Ph.D^{3,4}, Sebastien Carnicella Ph.D^{1*}

Affiliation:

¹Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

²Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

³Service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Toxicologie Environnementale, CHU de Grenoble-Alpes Site Nord – Institut de Biologie et de Pathologie, F-38041 Grenoble, France.

⁴Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000, Grenoble, France

***Corresponding author:**

Sebastien Carnicella, Ph.D.

Grenoble Institute of Neurosciences

31 Chemin Fortuné Ferrini

38700 La Tronche

France

E-mail: sebastien.carnicella@inserm.fr

Tel.: +33-(0)4-56-52-06-67/(0)6-23-88-26-65

Abstract: The neurobiological mechanisms underlying compulsive alcohol use, a cardinal feature of alcohol use disorder, remain elusive. The key modulator of motivational processes dopamine (DA) is suspected to play an important role in this pathology, but its exact implication remains to be determined. Here, we found that rats expressing compulsive alcohol-related behavior, operationalized as punishment-resistant self-administration, showed a decrease in DA levels restricted to the dorsolateral territories of the striatum, the main output structure of the nigrostriatal DA pathway. We then causally demonstrated that a chemogenetic-induced selective hypodopaminergia of this pathway results in compulsive alcohol self-administration in rats otherwise resilient, accompanied by the emergence of alcohol withdrawal-like motivational impairments. These results demonstrate a major implication of tonic nigrostriatal hypodopaminergic state in alcohol addiction and provide new insights into our understanding of the neurobiological mechanisms underlying compulsive alcohol use.

Introduction:

More than 300 million people suffer from alcohol use disorder (AUD) worldwide (1), a pathology that encompasses a broad spectrum of health, social and economic problems with various degrees of severity (2). The most severe form is frequently referred as alcohol addiction, a chronic relapsing disease occurring only in a subset of vulnerable users (3). It is notably characterized by compulsive alcohol use, that is the continuation of seeking and drinking alcohol despite having significant negative consequences, and the presence of a negative motivational and affective state in absence of alcohol (2,4). While neuroscientists have identified a plethora of actors in AUD, treatments are limited mainly due to the poor understanding of the psychobiological mechanisms underlying the shift from controlled to compulsive alcohol seeking and taking (3). At the neural systems level, dopamine (DA) is considered as a prominent actor in the pathophysiology of addiction mainly through its role in incentive motivation and reinforcement (4). However, forty years of research have hitherto failed to provide a clear idea of its exact contribution (5). While alcohol consumption transiently increases DA levels in the ventral striatum, especially in the nucleus accumbens (NAc), the main output of the mesolimbic system (6), extended consumption instead leads to an overall and prolonged decrease of DA levels upon abstinence in this structure (7,8). Over the past decade, tonic hypodopaminergic states of the mesolimbic pathway have been causally linked to the emergence of both acute drug withdrawal symptoms and excessive alcohol seeking and taking (9,10). However, implication of these DA hypofunctions in protracted abstinence and in the compulsive dimension of AUD remains controversial (11,12).

Beyond the mesolimbic DA pathway, a growing body of research had recently demonstrated the strong implication in motivated and affective behaviors of the neighboring nigrostriatal DA pathway, originally restricted to motor functions (13,14). Interestingly, clinical studies in abstinent individuals with AUD not only have shown an altered DA function in the

ventral striatum, but also within the dorsal striatum (8), the major output of the nigrostriatal DA pathway, that is assumed to play a prominent role in compulsive drug use (3,15–17). More specifically in rodents, compulsive alcohol seeking has been found to depend on the anterior part of the dorsolateral striatum (aDLS) and DA signaling in this structure (18). In striking contrast with the mesolimbic pathway however, study of potential tonic hypodopaminergic states of the nigrostriatal pathway in AUD has been neglected so far (16). We therefore hypothesized here that the existence of a nigrostriatal hypodopaminergia would contribute to the development of compulsive alcohol use and of a negative affective state.

Materials and Methods:

Animals

Experiments were performed on *Wild-Type (WT)* and *TH::Cre* Long-Evans males rats. They were housed in a 12h/12h reverse light cycle, with food and water *ad libitum*. At the beginning of the experiments, rats were 7 to 8 weeks old. All experimental protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the new French directive 2010/63, and were approved by the French national ethics committee no. 004.

Experimental design

Experiment 1: 21 *WT* rats were trained during 26 sessions in an intermittent access to 20% alcohol two-bottle choice drinking procedure (IA 20%-EtOH 2BC). Operant ethanol self-administration was then performed during 38 sessions before the beginning of the footshock-punished ethanol self-administration. At this step, half of the rats performed 6 punished sessions followed by 6 unpunished sessions, while tests were carried out in opposite orders for the other half, thereby ensuring that any decrease in performance was the result of footshocks and not an

effect of the time or environmental conditions. Additionally, 8 *WT* rats were kept under identical conditions but never experienced alcohol. Rats were euthanized after a period of abstinence (one week after the last self-administration session), and brains were processed for striatal tissues DA quantification with DA ELISA kit. During striatal tissues quantification, DA levels in NAc, dorsomedial striatum (DMS) and aDLS were analyzed for all rats, except for one rat where technical reasons prevented us from measuring DA levels in DMS.

Experiment 2: 27 *TH::Cre* rats were infused with a virus coding for the inhibitory DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug(19)) hM4Di-mCherry or mCherry alone in the substantia nigra pars compacta (SNc). Microdialysis experiments were performed at least two weeks after the surgeries to allow the proper recovery of the animals and a stable transgene expression (20). At the end of the experiment, rats were euthanized, and brains were processed for histological validation of the probe placement and transgenes expression.

Experiment 3: Similarly to experiment 1, 25 *TH::Cre* rats were trained in IA 20%-EtOH 2BC and operant ethanol self-administration. After 38 sessions of operant ethanol self-administration, viral surgeries were performed. Following two weeks of recovery, hM4Di and mCherry rats were trained for 8 additional sessions, allowing stabilization of performances, before starting footshock-punished ethanol self-administration. At this step, 5 punished sessions under saline treatment were conducted to identify rats without compulsive alcohol-related behaviors (17 rats), followed by 6 unpunished sessions in absence of treatment (wash period) and, finally, 6 punished sessions under DREADDs agonist Compound 21 (C21) treatment. At the end of the experimental procedure, the sensitivity to footshocks was measured. Rats were then euthanized, and brains were processed for histological validation of transgenes expression.

Experiment 4: 48 *TH::Cre* rats were trained in operant sucrose self-administration during 15 sessions before viral surgeries. After 14 days of recovery, hM4Di and mCherry rats were trained

again during 5 sessions, allowing stabilization of performances ($\leq 30\%$ performance variation over three consecutive sessions). Then, they were tested for 3 sessions under C21 or saline treatment. Finally, recovery from treatments (wash period) was assessed during 6 sessions. Following sucrose self-administration experiment, rats performed in this following order: 2.5% sucrose two-bottle choice drinking test, open arena test, stepping test, light/dark avoidance test, elevated plus-maze and forced-swim test. Over the 48 rats, 11 rats that did not reach a minimum of 40 rewards obtained during a session were excluded of from this protocol but kept for the rest of the tests. At the end of the experimental procedure, rats were euthanized, and brains were processed for histological validation of transgenes expression.

hM4Di-DREADDs expression

Chemogenetic manipulation of SNc DA neurons was achieved through stereotaxic bilateral infusion of a AAV5-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (10^{12} particles/mL, plasmid #44362, Addgene, Watertown, MA, USA) or AAV5-hSyn-DIO-mCherry (10^{12} particles/mL, plasmid #50459, Addgene) in the SNc of *TH::Cre* rats (20,21). As previously described and validated in (20), 1 μ L was infused at a rate of 0.2 μ L/min on each hemisphere and coordinates for SNc injections were set at: -4.3 mm (AP), ± 2.4 mm (ML), -7.9 mm (DV) relative to bregma (22).

hM4Di-DREADDs activation

DREADD agonist C21 (Hello Bio, Bristol, UK) was dissolved in 0.9% saline and kept at -20°C before testing. All the injections were given intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/kg (1 ml/kg bodyweight). Saline solution (NaCl 0.9%, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was prepared and kept in identical conditions.

***In vivo* microdialysis experiment**

Microdialysis experiment was carried out as previously described in (23) and is deeply detailed in Supplement 1. Briefly, homemade microdialysis probes were prepared and bilaterally implanted in the NAc and aDLS. The stereotaxic coordinates were set at: +2.2 mm (AP); ±3.2 mm (ML) and -6.5 mm (DV) for the aDLS; +2.6 mm (AP); ±1.2 mm (ML) and -8 mm (DV) for the NAc, relative to bregma (22). The dialysis fractions were collected every 45 min, over a 6-h period divided in a 1h30 period without treatment and a 4h30 period following injection of C21 or saline solution. After histological validation, DA contents of dialysis fractions were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Behavioral procedures

Intermittent access to 20% alcohol two-bottle choice drinking procedure: High levels of voluntary alcohol consumption were obtained in IA 20%-EtOH 2BC drinking procedure as previously described (24,25). Briefly, single-housed rats were given 24h concurrent access to one bottle of 20% (v/v) alcohol (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) in tap water and one bottle of water with 24 or 48h alcohol deprivation periods between the alcohol-drinking sessions. At the end of the procedure, rats consuming less than 2 g/kg/24h over the last three days were excluded from the study.

Operant ethanol self-administration: Rats were trained to orally self-administer the 20% ethanol solution in operant self-administration chambers housed within light-resistant, sound-attenuating boxes (ENV-022MD, Med Associates, St Albans, VT, USA). At the beginning of each session, two levers were extended around the liquid cup: an active, reinforced, lever, for which presses resulted in the delivery of 0.1 ml of the ethanol solution (20% v/v) in the liquid cup associated to light stimulus above the lever, and an inactive, non-reinforced, lever for which a press causes neither delivery of ethanol nor light stimulus. Lever presses on both lever and

reinforcer deliveries were recorded by MED-PC IV software (Med Associates). After 2 to 3 nights in the chambers to allow acquisition of a lever-press response for ethanol under a fixed ratio 1 (FR1), operant sessions were conducted 5 days per week, with the schedule requirement increased to FR3 and the length of session shortened from 60 to 30 min over the first 2 weeks (25). Rats pressing for less than 0.3 g/kg/30min at the end of the training were excluded from the study.

Footshock-punished ethanol self-administration: Identification of rats expressing compulsive alcohol-related behavior, defined by the persistence of alcohol use despite knowledge of negative associated consequences (3), was achieved by coupling ethanol self-administration with intermittent footshocks. During punished sessions, self-administration parameters were identical to baseline self-administration (i.e., FR3, 30 min) but footshocks (0.25 mA, 0.5 s) were delivered each 8 presses on the reinforced lever, following the paradigm developed by (26). By doing so, footshock punishment coincide with the preparatory response (lever presses) but not consummatory behaviors (alcohol delivery), and favor the punishment of seeking rather than of taking (18,27). Rats that continued to press the lever, despite footshocks ($\geq 70\%$ of the baseline performances), were considered as footshock-resistant whereas rats that stop to press the lever in face of the negative consequence were considered as footshock-sensitive. This cut-off was determined based on the variances of the basal operant performances we standardly obtained and the bimodal distribution of our rats' population (see also Supplementary Fig. S1A in Supplemental 1).

Sensitivity to footshocks: Rats were place in a StartFear chamber (Panlab, Barcelona, Spain) and footshocks were delivered at 0.2, 0.25 and 0.3 mA. At each intensity, triplicates were made with 20 s spaced, and 1 min was left before increasing the intensity. Footshocks threshold was defined as a freeze or a jump off the grid. Footshock responses were recorded with a video-

tracking system (EthoVision XT 15 software, Noldus Information Technology) and scored by two observers blind to the experimental conditions.

Operant sucrose self-administration: Rats were trained to orally self-administer a 2.5% sucrose (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) solution as described for the operant ethanol self-administration, except that each lever press results in the delivery of 0.2 mL of sucrose (13). After 2 to 3 nights in the chambers to allow acquisition of a lever-press response for sucrose under a fixed ratio 1 (FR1), 60 min operant sessions were daily conducted with a maximum of sucrose deliveries set at 100 before ending the session.

2.5% sucrose two-bottle choice drinking test, open arena test, stepping test, light/dark avoidance test, elevated plus-maze and forced-swim test: They were performed according to (13). A fully detailed description of the methodological procedures is provided for each behavioral test in Supplement 1.

Striatal tissues DA quantification

aDLS, DMS and NAc were dissected from frozen brains and homogenized in: HCl 0.01N, EDTA 1 mM and Na₂S₂O₅ 4 mM to prevent catecholamine degradation. DA levels were next measured using DA ELISA kit (Immusmol SAS, Talence, France) according to the manufacturer's instruction and the literature (28,29). At the end of the reaction, a sulfuric acid 0.25 M was added, and the optical density was detected by spectrophotometer (PHERAstar, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) at the wavelength of 450 nm. A reference wavelength was additionally used at 620 nm to evaluate non-specific absorbance. Finally, DA levels were determined by comparing absorbance of samples with external standards and were expressed as the amount of DA, in ng per mg of protein present in the homogenate determined with BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France).

Histological analysis

Brain tissue preparation and processing: A detailed description of brain tissue preparation and processing is provided in Supplement 1.

Quantification of transgenes expression: To assess transgenes expression in DA mesencephalic regions, immunostaining for tyrosine hydroxylase (TH) were carried out as previously described (20) and as detailed in Supplement 1. DREADD expression was quantified for each hemisphere by comparing the number of TH-labeled-mCherry-positive neurons with the number of TH-labeled neurons within three areas: the distal SNc, the medial SNc and the ventral tegmental area. Rats with less than 30% of transgene expression in the distal SNc in each hemisphere were excluded from the study (20).

Statistical analyses

Statistical analyses are described in figure legends, summarized in Table S1 and fully detailed in Supplement 1.

Results:

Compulsive alcohol use is specifically associated with a decrease in DA levels in the aDLS

We first tested whether compulsive alcohol use is associated with a hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway, by assessing striatal DA levels in rats expressing, or not, compulsive alcohol seeking behavior. In the first experiment, animals were first trained to voluntarily consume IA 20%-EtOH 2BC, before being challenging instrumentally to respond for alcohol in operant chambers (24,25). When operant performances reached stable levels, lever presses for alcohol were coupled to mild footshocks to identify rats expressing compulsive

alcohol use, operationalized as resistance to punishment of alcohol self-administration (26,30) (Fig. 1A). During these punished sessions, a bimodal distribution progressively appeared, which clearly indicates the existence of two distinct sub-populations: one with a strong decrease in lever presses, the footshock-sensitive (FS) rats (58%), while the other, the footshock-resistant (FR) rats (42%), maintained their responses despite footshocks (Fig. 1, C and D, Supplementary Fig. S1A in Supplement 1; see also (30,31)). No differences were observed on the second, inactive lever, indicating that the tendency to resist to the punishment was specifically related to the search for alcohol (Supplementary Fig. S1B in Supplement 1). Importantly, and as already observed for alcohol (18) and cocaine (32), the history of intake cannot account for these two distinct phenotypes. Indeed, we found a similar escalation of alcohol consumption during IA 20%-EtOH 2BC (Fig. 1B and Supplementary Fig. S1C in Supplement 1), as well as similar lever presses levels during unpunished self-administration sessions between FR and FS rats (Fig. 1, C and D). While DA levels measured by ELISA assays on striatal extracts did not differ between FS and FR rats in the NAc or DMS and appeared similar to those obtained from a non-exposed alcohol condition (water control rats), FR rats showed a significant decrease in DA levels in the aDLS (Fig. 1E). In addition, a robust negative correlation was found between the degree of resistance to footshocks and the amount of aDLS DA (Fig. 1F). Thus, in line with our working hypothesis, compulsive alcohol seeking is associated with a decrease in aDLS DA level, suggesting an important link between a tonic hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway and the emergence of this maladaptive behavior.

Chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia induces compulsive alcohol use

Consequently, we next investigated whether this DA hypofunction is causally implicated in the emergence of compulsive alcohol use. To that end, an experimental and reversible nigrostriatal hypodopaminergia was induced using the inhibitory DREADD hM4Di (19). *TH::Cre* rats were transduced in the SNc with AAVs that Cre-dependently express

hM4Di-mCherry, or mCherry alone (control condition), allowing its specific expression in SNc DA neurons (Fig. 2, A-C). hM4Di was activated by the synthetic ligand C21 (33), at a dose that we previously reported as potent and selective to inhibit SNc neurons in *TH::Cre* rats (20). We first confirmed with *in vivo* microdialysis that this approach efficiently decreases aDLS DA levels (Fig. 2D and Supplementary Fig. S2 in Supplement 1). In hM4Di rats, a 30%-decrease in aDLS DA level was observed between 90 and 135 minutes after C21 injection (Fig. 2E), which is consistent with the temporal inhibition of SNc neurons previously reported (20). Importantly, this strategy did not influence NAc DA levels (Fig. 2E), confirming that chemogenetic inhibition of SNc DA neurons induces a reversible and selective hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway.

Then, we tested whether induction of this experimental nigrostriatal hypodopaminergia state is sufficient to induce compulsive alcohol seeking in FS rats. In the third experiment, *TH::Cre* rats were therefore trained in IA 20%-EtOH 2BC and operant ethanol-self-administration procedures as in the first experiment (Fig. 3A), and then transduced with DREADDs ensuring a same history of alcohol exposure between hM4Di and mCherry control rats (Fig. 3, B and C). After selection of FS-hM4Di and FS-mCherry rats under punishment sessions preceded by saline injections, we assessed their tendency to persist in seeking alcohol despite punishment over the course of a second series of sessions, this time following administration of C21 (Fig. 3D). In these sessions, we found that chemogenetic inhibition of SNc DA neurons progressively increased the resistance of FS rats to punishment (Fig. 3, D and E), while it did not affect their intrinsic footshocks sensitivity (Supplementary Fig. S3A in Supplement 1). Interestingly, this increase was observed for each hM4Di FS rat (Fig. 3F) and correlated only with the level of hM4Di expression within the distal SNc (Fig. 3, G and H), the main DA input of the DLS (34). In marked contrast, effect of the chemogenetic manipulation was found neither on the inactive lever during punishment sessions (Supplementary Fig. S3B

in Supplement 1), nor on operant alcohol self-administration under baseline conditions (Supplementary Fig. S3C in Supplement 1), confirming that this effect was related to punishment and not to a non-selective or general change in operant behavior. Taken together, these results demonstrated that an hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway is sufficient to induce compulsive alcohol seeking behavior in animals that were otherwise resilient.

Chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia leads to a prolonged negative motivational, but not affective, state

Because we previously showed that a partial DA denervation of the nigrostriatal pathway leads to motivational impairments as well as depression- and anxiety-related behaviors (13), three core features of the negative psychological state experienced during withdrawal (35), we finally test whether chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia recapitulates such phenotype (Fig. 4, A and B). Motivated behavior was evaluated in an operant sucrose self-administration task as previously performed (13,14). In comparison to the control groups, hM4Di-C21 treated rats exhibited a prolonged decrease in their performance to obtain sucrose, that persisted beyond the last session under C21 (Fig. 4, C and D). This result was not due to a motor deficit associated with nigrostriatal hypodopaminergia, as revealed by the absence of motor alterations in an open arena and fine use of the forepaws in a stepping test (Fig. 4, E and F). It cannot be attributed either to an inability to discriminate between the active and inactive lever that was preserved throughout the task (Supplementary Fig. S4A in Supplement 1), or to a decrease in sensitivity to the reinforcing properties of sucrose, as preference (Fig. 4G) and consumption (Supplementary Fig. S4B, in Supplement 1) for the sucrose solution was unchanged in a two-bottle choice paradigm. Taken together, these data confirm that the chemogenetically-induced decrease in operant sucrose behavior reflects a motivational deficit (13). In sharp contrast, no increase in anxiety- or depression-related behaviors were observed in light/dark avoidance and elevated-plus maze tests (Fig 4. H and Supplementary Fig. S4C in

Supplement 1) and in the forced swim test (Fig. 4I) respectively. Finally, in addition to its implication in compulsive alcohol use, hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway leads to a prolonged negative motivational, but not affective, state.

Discussion

At a time of great controversies about the exact role of DA in addiction (12), we shed to light here hitherto overlooked implication of the DA nigrostriatal pathway in AUD. Our findings indicate that chronic exposure to alcohol leads to the development of a tonic hypodopaminergic state in the nigrostriatal pathway in vulnerable individuals that directly contributes to the development of compulsive alcohol use and probably participates to the maintenance of the negative motivational state experienced during abstinence.

Mesolimbic tonic hypodopaminergic states have been proposed to be part of the allostasis phenomenon observed during abstinence that underlines the emergence of a negative motivational and affective state and participates to the development of excessive alcohol seeking and intake (9,36). In regard to the present data, it suggests that, in vulnerable chronic users, these DA hypofunctions might eventually propagate or migrate to the nigrostriatal pathway through different possible interconnexions (37,38). This might be the tonic counterpart of striatal DA phasic signals transition, that have been observed to emerge progressively in the aDLS over the course of drug taking, while they concomitantly fade in the ventral portion (39).

Interestingly, DA phasic signals are directly modulated by DA tonic state (40) and the relation between these two complementary modes of signaling has been suggested to be important to consider for alcohol and other substance use disorder (41). Emergence of the hypodopaminergic state of the mesolimbic pathway in the early phase of the disorder might therefore lead to an aberrant enhanced DA phasic signaling in the NAc, that would contribute to aberrant learning (42) and sensitization of the mesolimbic DA pathway to drugs or associated

cue (43,44). Within this framework, optogenetic studies conducted within the mesolimbic pathway have shown that increasing DA phasic firing promotes excessive alcohol seeking, whereas increasing DA tonic firing decrease consumption and annihilates the effect of DA phasic signal when induced simultaneously (45,46). In the ultimate stages of AUD, the hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway revealed in our study, would strengthen similar abnormal phasic DA signals in the aDLS engaged by drug-paired cues, facilitating the formation of maladaptive incentive habits and the ensuing rigidity in drug seeking (18,38,47) exacerbated by negative urgency during abstinence (48). This therefore suggests that DA-based therapy normalizing DA tonic firing may eliminate aberrant DA phasic signals and suppress excessive as well as compulsive alcohol seeking and drinking. In this respect, normalization of DA tone in the mesolimbic pathway, using GDNF or OSU6162, has already been shown effective at suppress excessive alcohol consumption in rodents and diminish alcohol craving in humans (9,49,50). Further studies, build on the present findings, would be of high interest to determine whether normalization of tonic DA state in the nigrostriatal pathway with new DA-based therapy is efficient to limit compulsive alcohol use.

Beside compulsivity, our study also intriguingly reports a dissimilar effect of the nigrostriatal hypodopaminergia on the motivation to obtain alcohol and sucrose. Indeed, whereas nigrostriatal hypodopaminergia did not change motivation to self-administer alcohol, and even increased resilience to obtain alcohol in the presence of footshocks, it markedly decreases motivation to self-administer sucrose. It suggests that hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway may have different behavioral outcomes depending on the history associated to- and the natural properties of the reward. If this observation requires further investigations to directly compare motivation for sucrose and alcohol (51), it represents an interesting feature to note, as a shift in interest in the drug at the expense of other natural rewards or activities is an important dimension of addiction (2,52,53).

In conclusion, this study points toward the causal implication of a tonic hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway in compulsive alcohol use, a cardinal feature of AUD (3). These data also emphasize the importance of the nigrostriatal DA pathway in motivated behavior and suggest that this hypodopaminergic state contributes to the negative motivational state observed during withdrawal. The role of this pathway in motivation-related processes has long been neglected (13), while it could represent one of the key elements to understanding the complex pathophysiology of AUD. Future works will be necessary to decipher the neurobiological and molecular mechanisms underlying this tonic hypodopaminergic state, as well as how this state leads to the emergence of compulsive alcohol use. Although these questions remain, it is likely to open new avenues of research in AUD and therapeutic strategies based on the restoration of a normal DA tone to annihilate this maladaptive behavior.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE16-0002, to SC) and Grenoble Alpes University.

Acknowledgments: We thank Pr David Belin for critical reading of the manuscript; the PIC GIN Platform for technical assistance in fluorescence microscopy and analysis, as well as the GIN behavioral facility that is supported by the Grenoble Center of Excellence in Neurodegeneration (GREEN).

Conflict of Interest: Authors report no conflict of interest.

References:

1. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018 [Internet]. 2018 [cited 2021 Dec 16]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>
2. American Psychiatric Association. DSM-5 Diagnostic Classification. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 2013.
3. Lüscher C, Robbins TW, Everitt BJ. The transition to compulsion in addiction. *Nature Reviews Neuroscience* [Internet]. 2020 May 30;21(5):247–63. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41583-020-0289-z>
4. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760–73.
5. Nutt DJ, Lingford-Hughes A, Erritzoe D, Stokes PRA. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(5):305–12.
6. di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(14):5274–8.
7. Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyttiä P, Lorang MT, Bloom FE, et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *Journal of Neuroscience*. 1996;16(10):3474–85.
8. Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, et al. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: Possible orbitofrontal involvement. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(46):12700–6.

9. Barak S, Carnicella S, Yowell Q V., Ron D. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Reverses Alcohol-Induced Allostasis of the Mesolimbic Dopaminergic System: Implications for Alcohol Reward and Seeking. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2011;31(27):9885–94. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1750-11.2011>
10. Radke AK, Gewirtz JC. Increased dopamine receptor activity in the nucleus accumbens shell ameliorates anxiety during drug withdrawal. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2012;37(11):2405–15. Available from: <http://www.nature.com/articles/npp201297>
11. Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, Salgado H, Torres-Ramirez O, Uhrig S, et al. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(11):3024–9.
12. Samaha A-N, Khoo SY-S, Ferrario CR, Robinson TE. Dopamine ‘ups and downs’ in addiction revisited. *Trends in Neurosciences* [Internet]. 2021 Jul;44(7):516–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223621000588>
13. Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson’s disease. *Molecular Psychiatry* [Internet]. 2014 Mar 12;19(3):358–67. Available from: <http://www.nature.com/articles/mp20133>
14. Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, Krack P, David O, Savasta M, et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson’s disease? *Translational psychiatry* [Internet]. 2016;6(3):e753. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2016.17>
15. Everitt BJ, Robbins TW. Drug addiction: Updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual Review of Psychology*. 2016;67:23–50.

16. Lüscher C, Janak PH. Consolidating the Circuit Model for Addiction. *Annual Review of Neuroscience*. 2021;44(1):173–95.
17. Vollstädt-Klein S, Wichert S, Rabinstein J, Bühler M, Klein O, Ende G, et al. Initial, habitual and compulsive alcohol use is characterized by a shift of cue processing from ventral to dorsal striatum. *Addiction*. 2010;105(10):1741–9.
18. Giuliano C, Belin D, Everitt BJ. Compulsive alcohol seeking results from a failure to disengage dorsolateral striatal control over behavior. *Journal of Neuroscience*. 2019;39(9):1744–54.
19. Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S. Dreads: The power of the lock, the weakness of the key. favoring the pursuit of specific conditions rather than specific ligands. *eNeuro*. 2019;6(5):1–5.
20. Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S. Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. *PLoS ONE*. 2020;15(9 September):1–11.
21. Krashes MJ, Koda S, Ye CP, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(4):1424–8.
22. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. Elsevier Academic Press. 2007;
23. Favier M, Duran T, Carcenac C, Drui G, Savasta M, Carnicella S. Pramipexole reverses Parkinson's disease-related motivational deficits in rats. *Movement Disorders [Internet]*. 2014;29(7):912–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25837>
24. Carnicella S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol [Internet]*. 2014 May;48(3):243–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741832914000494>

25. Carnicella S, Kharazia V, Jeanblanc J, Janak PH, Ron D. GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2008;105(23):8114–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0711755105>
26. Seif T, Chang SJ, Simms JA, Gibb SL, Dadgar J, Chen BT, et al. Cortical activation of accumbens hyperpolarization-active NMDARs mediates aversion-resistant alcohol intake. *Nature Neuroscience* [Internet]. 2013;16(8):1094–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3445>
27. Giuliano C, Peña-Oliver Y, Goodlett CR, Cardinal RN, Robbins TW, Bullmore ET, et al. Evidence for a Long-Lasting Compulsive Alcohol Seeking Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2018;43(4):728–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.105>
28. Sabti M, Sasaki K, Gadhi C, Isoda H. Elucidation of the Molecular Mechanism Underlying *Lippia citriodora*(Lim.)-Induced Relaxation and Anti-Depression. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 Jul 20;20(14):3556. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3556>
29. Robson MJ, Seminerio MJ, McCurdy CR, Coop A, Matsumoto RR. σ Receptor antagonist attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity is correlated to body temperature modulation. *Pharmacological Reports*. 2013;65(2):343–9.
30. Domi E, Xu L, Toivainen S, Nordeman A, Gobbo F, Venniro M, et al. A neural substrate of compulsive alcohol use. *Science Advances*. 2021;7(34):1–13.
31. Marchant NJ, Campbell EJ, Kaganovsky K. Punishment of alcohol-reinforced responding in alcohol preferring P rats reveals a bimodal population: Implications for models of compulsive drug seeking. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Dec 20;87:68–77.

32. Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 2004;305(5686):1014–7.
33. Chen X, Choo H, Huang XP, Yang X, Stone O, Roth BL, et al. The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chemical Neuroscience*. 2015;6(3):476–84.
34. Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, Evans KE, Beier KT, Zalocusky KA, et al. Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell*. 2015;162(3):635–47.
35. Heilig M, Egli M, Crabbe JC, Becker HC. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addiction Biology* [Internet]. 2010 Apr;15(2):169–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1369-1600.2009.00194.x>
36. Koob GF, le Moal M. Plasticity of reward neurocircuitry and the “dark side” of drug addiction. *Nature Neuroscience*. 2005;8(11):1442–4.
37. Ferreira JGP, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience*. 2008;153(1):196–213.
38. Belin D, Belin-Rauscent A, Murray JE, Everitt BJ. Addiction: Failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology* [Internet]. 2013;23(4):564–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.025>
39. Willuhn I, Burgeno LM, Everitt BJ, Phillips PEM. Hierarchical recruitment of phasic dopamine signaling in the striatum during the progression of cocaine use. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(50):20703–8.

40. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences*. 2007;30(5):220–7.
41. Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* [Internet]. 2000 Aug 10;95(8):119–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1080/09652140050111690>
42. Keiflin R, Janak PH. Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron* [Internet]. 2015;88(2):247–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.037>
43. Berridge KC, Robinson TE. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *American Psychologist* [Internet]. 2016 Nov;71(8):670–9. Available from: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/amp0000059>
44. Vezina P, Leyton M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* [Internet]. 2009;56(SUPPL. 1):160–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.070>
45. Budygin EA, Bass CE, Grinevich VP, Deal AL, Bonin KD, Weiner JL. Opposite Consequences of Tonic and Phasic Increases in Accumbal Dopamine on Alcohol-Seeking Behavior. *iScience* [Internet]. 2020;23(3):100877. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100877>
46. Bass CE, Grinevich VP, Gioia D, Day-Brown JD, Bonin KD, Stuber GD, et al. Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2013;7(NOV):1–10.

47. Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ. Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: Relevance for the understanding of addiction. *Behavioural Brain Research*. 2009;199(1):89–102.
48. Fouyssac M, Peña-Oliver Y, Puaud M, Lim N, Giuliano C, Everitt BJ, et al. Negative urgency exacerbates relapse to cocaine seeking after abstinence. *Biological Psychiatry*. 2021 Oct;
49. Steensland P, Fredriksson I, Holst S, Feltmann K, Franck J, Schilström B, et al. The monoamine stabilizer (-)-OSU6162 attenuates voluntary ethanol intake and ethanol-induced dopamine output in nucleus accumbens. *Biological Psychiatry*. 2012;72(10):823–31.
50. Feltmann K, Fredriksson I, Wirf M, Schilström B, Steensland P. The monoamine stabilizer (-)-OSU6162 counteracts downregulated dopamine output in the nucleus accumbens of long-term drinking Wistar rats. *Addiction Biology*. 2016;21(2):438–49.
51. Ahmed SH, Lenoir M, Guillem K. Neurobiology of addiction versus drug use driven by lack of choice. *Current Opinion in Neurobiology* [Internet]. 2013;23(4):581–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.028>
52. Koob GF, Arends MA, McCracken M, le Moal M. What is addiction? In: *Introduction to Addiction* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 1–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128168639000017>
53. Yücel M, Oldenhof E, Ahmed SH, Belin D, Billieux J, Bowden-Jones H, et al. A transdiagnostic dimensional approach towards a neuropsychological assessment for addiction: an international Delphi consensus study. *Addiction*. 2019;114(6):1095–109.

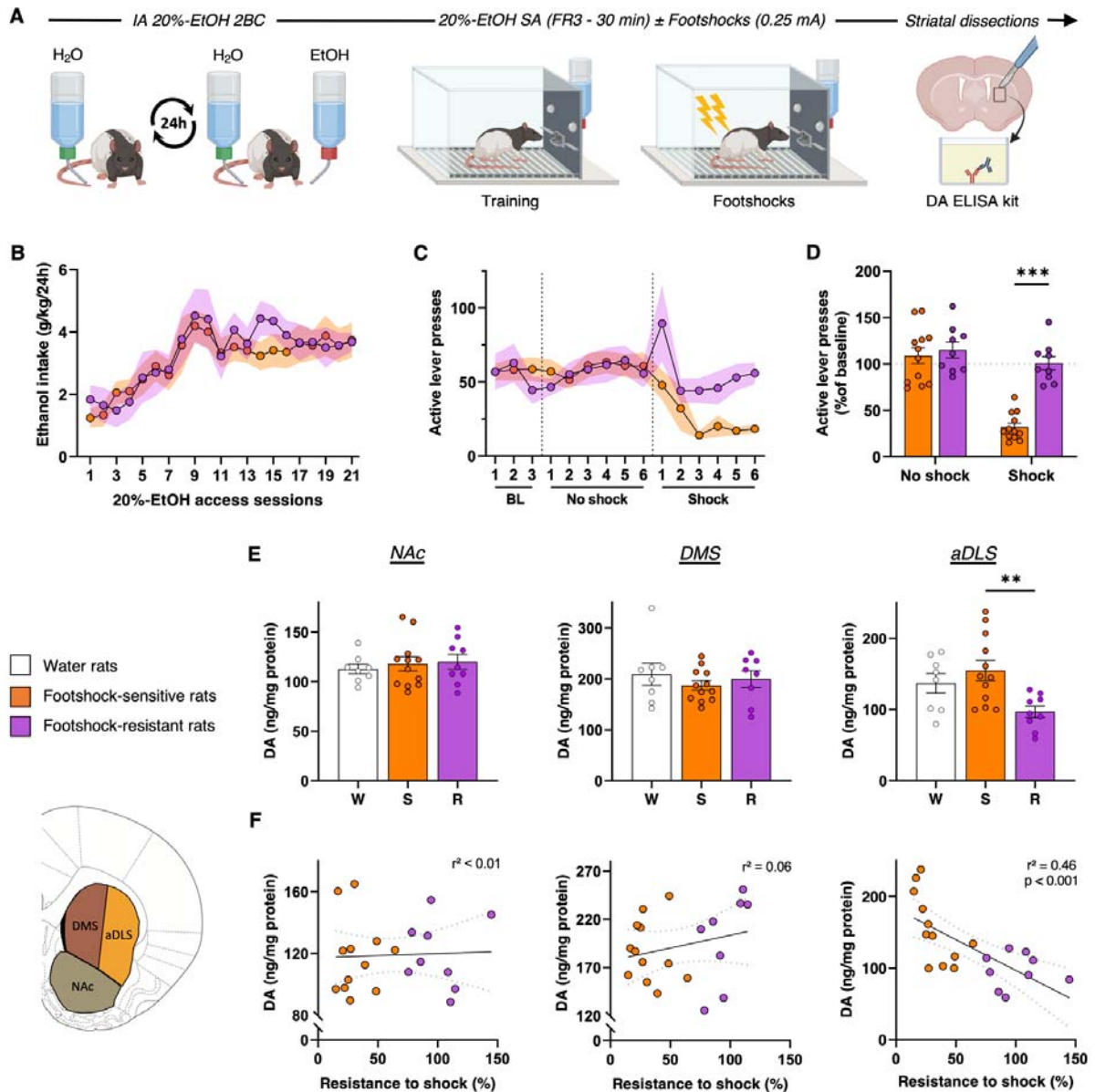


Fig. 1: Compulsive alcohol use is specifically associated with a decrease in DA levels in the aDLS. (A) Experiment timeline. (B) Ethanol intake during intermittent-access 20%-ethanol two-bottle-choice (IA 20%-EtOH 2BC). RM two-way ANOVA showed a significant effect of session [F(6, 109)=7.82, P<0.001, partial η^2 =0.29] but neither effect of group, nor session x group interaction [F_s<0.47, P>0.5, partial η^2 <0.02]. (C) Number of active lever presses in 30-min self-administration sessions (SA) of 20% EtOH (FR3), during baseline, “no-shock” and “shock” sessions (see supplementary material for details) in *footshock-sensitive* (FS, orange,

$n=12$) and *footshock-resistant* (FR, purple, $n=9$) rats. RM two-way ANOVA showed a significant group x session interaction [$F_{(14, 266)}=2.86$, $P<0.001$, partial $\eta^2=0.13$]. **(D)** Mean active lever presses during the three last “no-shock” sessions and the three last “shock” sessions normalized to baseline. RM two-way ANOVA showed a significant shock condition x group interaction [$F_{(1, 19)}=20.89$, $P<0.001$, partial $\eta^2=0.52$] **(E)** NAc, DMS and aDLS DA levels for *FR*, *FS* and *Water* rats (white, $n=8$). One-way ANOVA showed a main effect of group in the aDLS [$F_{(2,26)}=5.56$, $P<0.01$, partial $\eta^2=0.3$], but not in the NAc and DMS [$F_s<0.55$, $P>0.5$, partial $\eta^2<0.04$]. **(F)** Linear regression between resistance to footshocks and DA level in NAc, DMS or aDLS. A significant correlation was found in the aDLS [$F_{(1,19)}=16.18$, $P<0.001$], but not in the NAc or DMS [$F_s<1.14$, $P>0.3$]. Data are expressed in mean \pm SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$. BL: baseline, DMS: dorsomedial striatum, aDLS: anterior dorsolateral striatum, FR: fixed ratio, NAc: nucleus accumbens.

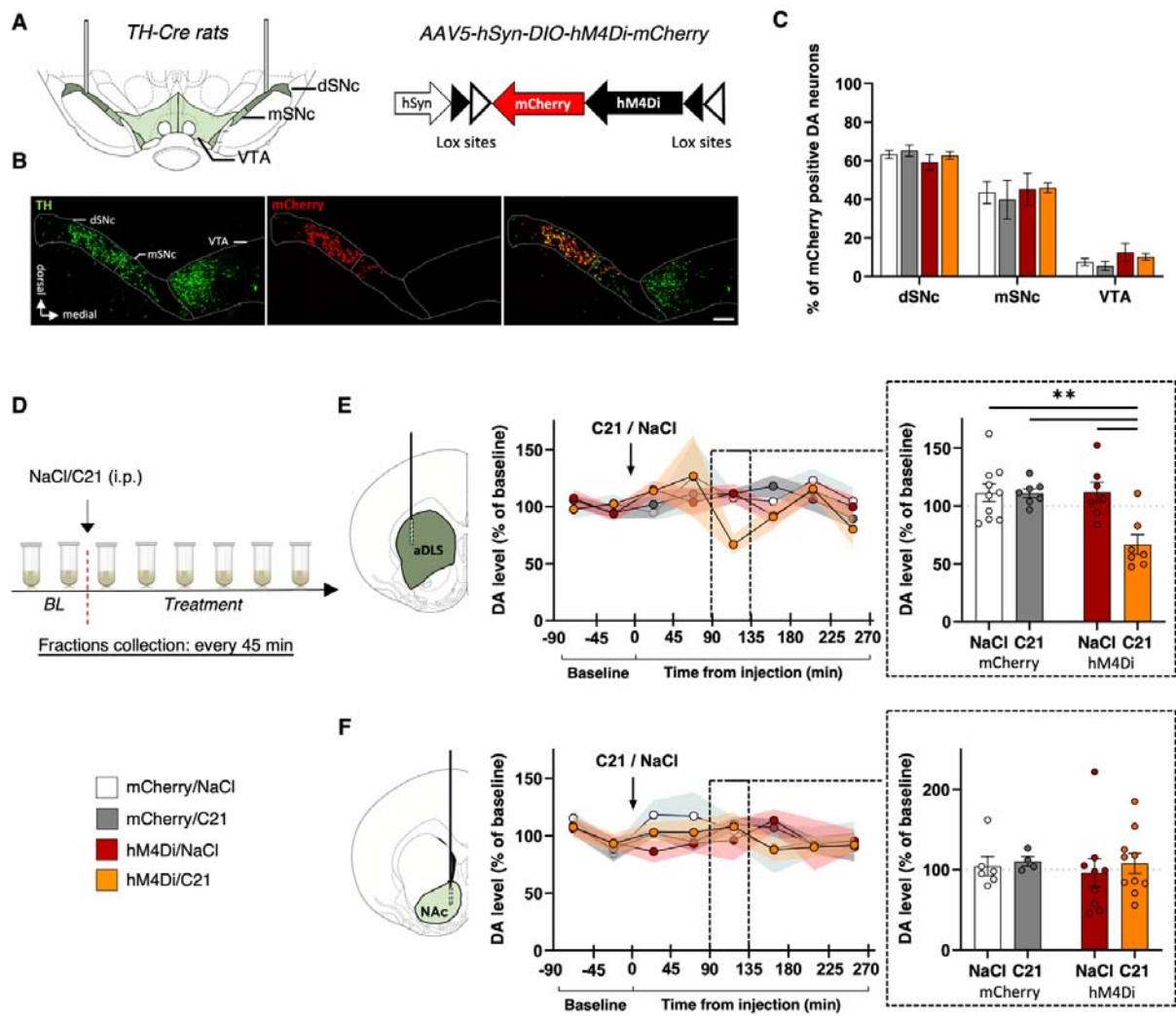


Fig. 2: Chemogenetic inhibition of the SNc DA neurons induces selective nigrostriatal hypodopaminergia. (A-C) hM4Di-mCherry and mCherry expression in SNc DA neurons. **(A)** *TH::Cre* rats received bilateral injection of Cre-dependent hM4Di-mCherry or Cre-dependent mCherry virus in the SNc. **(B)** Representative images of TH immunostaining and hM4Di-mCherry expression. Scale bar: 250 μ m. **(C)** Quantification of transgene expression in distal (dSNc), medial SNc (mSNc) and VTA. Three-way ANOVA showed a significant effect of the area [$F_{(2,129)}=158, P<0.001, \eta^2=0.71$], but no effect of transgene, treatment or any interaction between these factors [$F_s<1.04, P>0.36, \text{partial } \eta^2<0.02$]. **(D-G)** Extracellular DA concentrations in aDLS and NAc throughout eight 45 min-fractions collected by microdialysis. Data are normalized to baseline. **(D)** Design of the microdialysis experiment. **(E)** Time course of extracellular DA concentrations in the aDLS of *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=7$)

or NaCl (red, $n=7$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=7$) or NaCl (white, $n=10$). **(F)** Time course of extracellular DA concentrations in the NAc of *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=10$) or NaCl (red, $n=9$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=4$) or NaCl (white, $n=6$). In the fraction collected between 90 and 135 minutes after injection (dotted squares), two-way ANOVA found a treatment x transgene interaction in the aDLS [$F_{(1,27)}=8.63$, $P<0.01$, partial $\eta^2=0.24$], but not in the NAc [$F_{(1,25)}=0.03$, $P=0.87$, partial $\eta^2=0.001$]. Data are expressed in mean \pm SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: **, $P<0.01$. C21: compound 21, SNc: substantia nigra pars compacta, TH: tyrosine hydroxylase, VTA: ventral tegmental area.

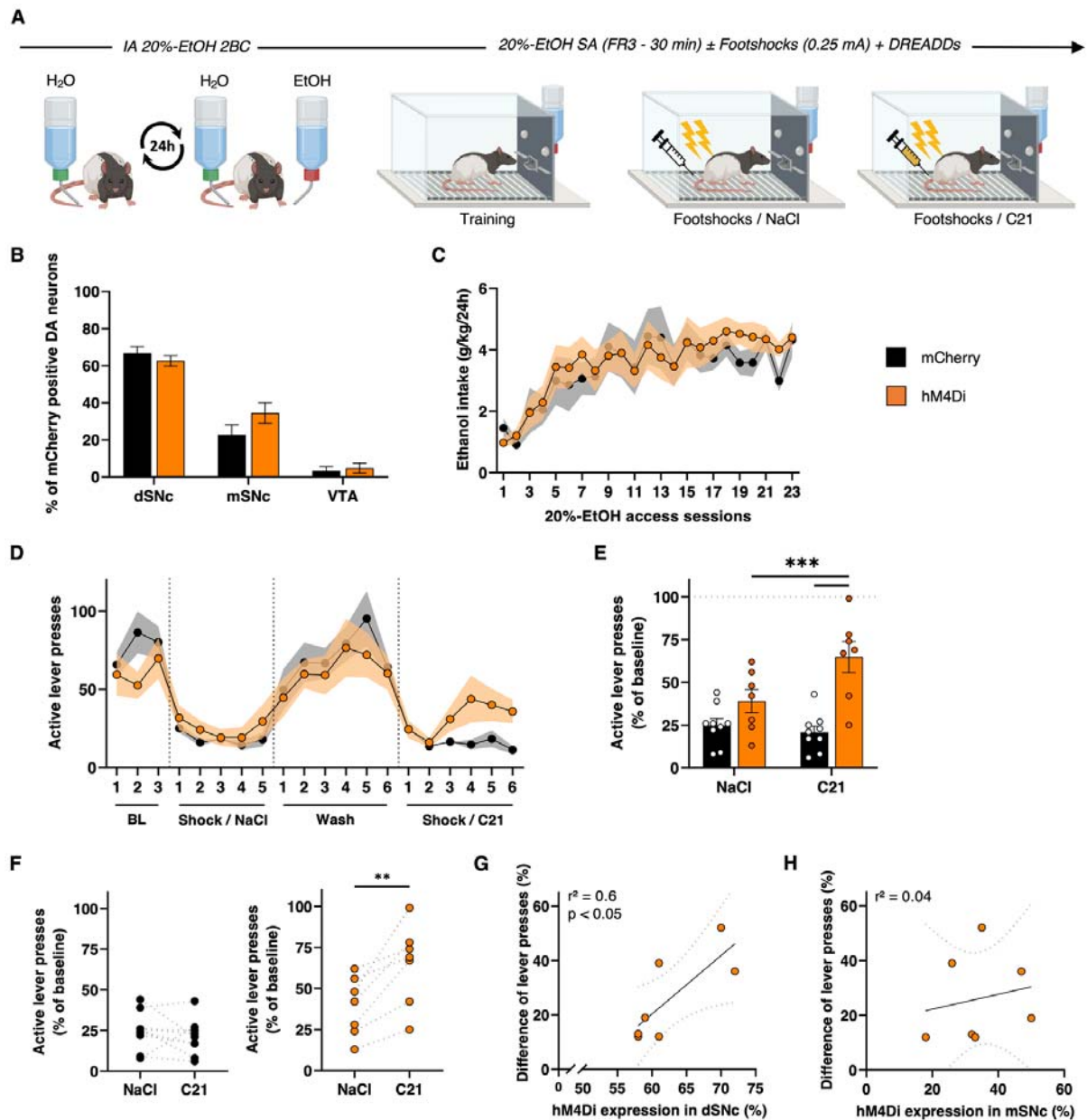


Fig. 3: Chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia induces compulsive alcohol use. (A) Experiment timeline. **(B)** Quantification of hM4Di-mCherry and mCherry expression in distal (dSNc), medial SNc (mSNc) and VTA. Two-way ANOVA showed significant effect of the area [$F_{(2,90)}=116.4$, $P<0.001$, $\eta^2=0.72$], but no effect of transgene, treatment or any interaction between these factors [$F_s<1.99$, $P>0.14$, partial $\eta^2<0.04$]. **(C)** Ethanol intake during intermittent-access 20%-ethanol two-bottle-choice (IA2BC 20%-EtOH) in *hM4Di* rats (orange, $n=7$) and *mCherry* rats (black, $n=10$). RM two-way ANOVA showed a significant effect of session [$F_{(4, 59)}=10.56$, $P<0.001$, partial $\eta^2=0.43$], but neither effect of

transgene, nor session x transgene interaction [$F_s < 0.57$, $P > 0.5$, partial $\eta^2 < 0.04$]. **(D)** Number of active lever presses in 30-min self-administration sessions of 20%-EtOH (FR3), during baseline, “Shock/NaCl”, “Wash” and “Shock/C21” sessions. RM two-way ANOVA showed a significant session x transgene interaction [$F_{(19,266)} = 2.18$, $P < 0.01$, partial $\eta^2 = 0.13$]. **(E - F)** Mean active lever presses during the three last “Shock/NaCl” and “Shock/C21” sessions normalized to baseline **(E)** and individual trajectories during these two periods **(F)**. RM two-way ANOVA reported a significant session x transgene interaction [$F_{(1,14)} = 18.41$, $P < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.57$], while paired t-test reported a significant effect of C21 in *hM4Di* [$t = 4.3$, $P < 0.01$] but not in *mCherry* rats [$t = 1.02$, $P = 0.34$]. **(G - H)** Correlation between the difference of active lever presses during “Shock/C21” and “Shock/NaCl” sessions and the percent of hM4Di expression within dSNc **(G)** or mSNc **(H)**. A significant correlation was found for dSNc [$F_{(1,5)} = 7.64$, $P < 0.05$], but not for mSNc [$F_{(1,5)} = 0.18$, $P = 0.69$]. Data are expressed in mean \pm SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

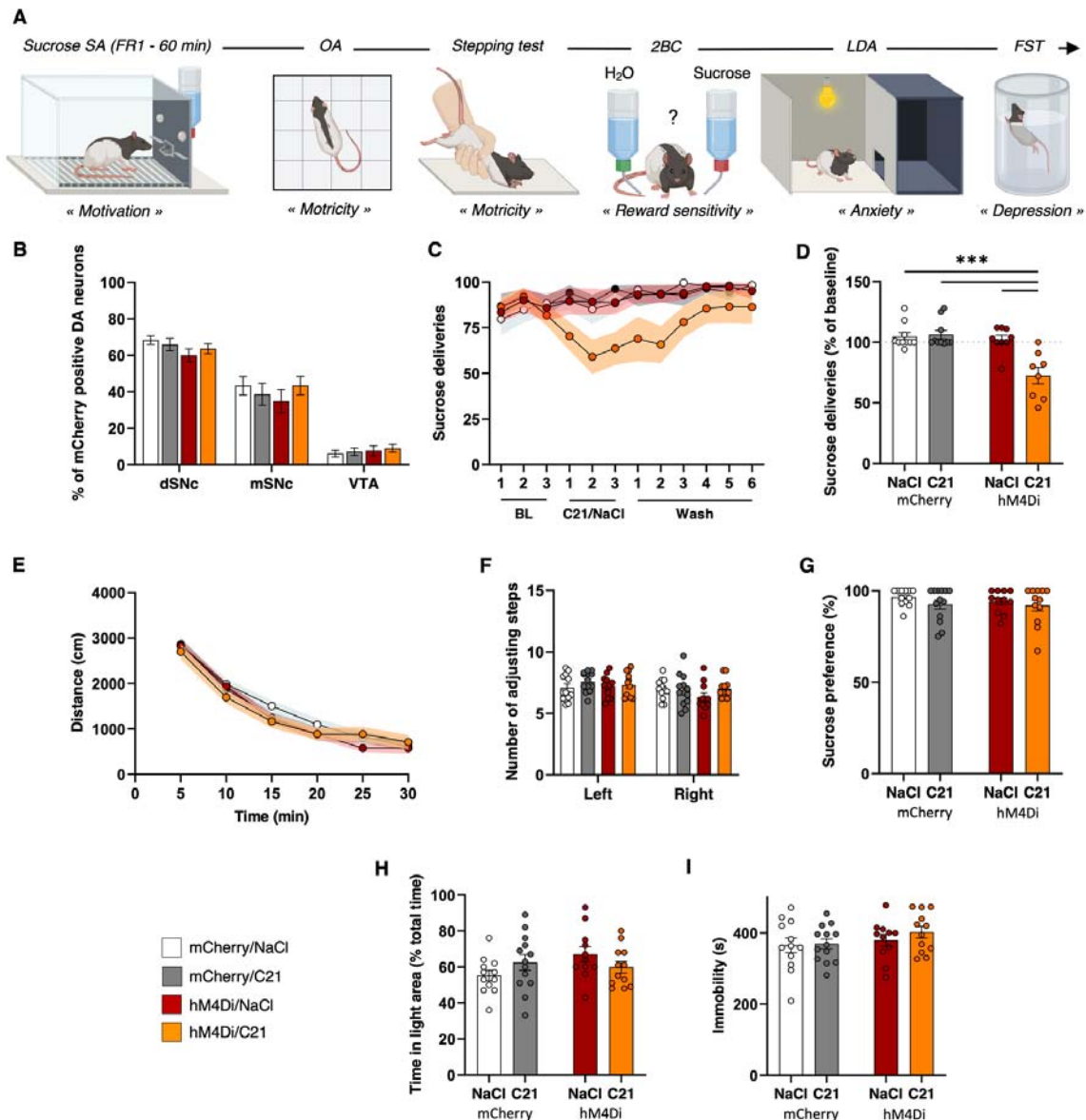


Fig. 4: Chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia leads to a prolonged negative motivational, but not affective, state. (A) Behavioral screening timeline. **(B)** Quantification of *hM4Di*-*mCherry* and *mCherry* expression in distal (dSNc), medial SNc (mSNc) and VTA. Three-way ANOVA showed significant effect of the area [F_(2, 140)=346.7, P<0.01, η²=0.83], but no effect of transgene, treatment or any interaction between these factors [F_s<1.31, P>0.27, partial η²<0.02]. **(C)** Number of 2.5%-sucrose deliveries obtained in 60-min self-administration (SA) sessions under continuous reinforcement (FR1), during baseline, “C21/NaCl” and “Wash” sessions, in *hM4Di* rats treated with C21 (orange, n=8) or NaCl (red, n=9) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, n=10) or NaCl (white, n=10). RM three-way

ANOVA showed a significant session x transgene x treatment interaction [$F_{(11, 363)}=2.67$, $P<0.01$, partial $\eta^2=0.07$]. **(D)** Mean sucrose deliveries obtained during “C21/NaCl” sessions normalized to baseline. Two-way ANOVA showed a significant transgene x treatment interaction [$F_{(1, 33)}=13.38$, $P<0.001$, partial $\eta^2=0.29$]. **(E - I)** Distance traveled over the course of a 30-min session in an open area (OA) **(E)**, number of adjusting left and right forepaws in a stepping test **(F)**, sucrose preference measured over a 60-min 2.5%-sucrose two-bottle-choice (2BC) drinking session **(G)**, percentage of time spent in the light area in a light/dark avoidance test (LDA) **(H)** and time spent immobile in a forced swim test (FST) **(I)** in *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=12$) or NaCl (red, $n=11$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=13$) or NaCl (white, $n=12$). Two- or three-way ANOVA found no interaction implicating the transgene and the treatment [$F_s<1.3$, $P>0.26$, partial $\eta^2<0.03$] in these different tests, except a marginal side x transgene x treatment interaction in stepping test [$F_{(1, 44)}=3.55$, $P=0.07$, partial $\eta^2=0.07$] and a transgene x treatment interaction in LDA [$F_{(1, 44)}=3.68$, $P=0.06$, partial $\eta^2=0.08$], mainly driven by small size effects related to the transgene condition and not to a C21 effect on *hM4Di* rats. Data are expressed in mean \pm SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: ***, $P<0.001$.

SUPPLEMENT 1

Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway drives compulsive alcohol use

Raphaël Goutaudier¹, David Mallet¹, Magali Bartolomucci², Denis Guicherd³, Carole Carcenac¹, Frédérique Vossier¹, Thibault Dufourd¹, Sabrina Boulet¹, Colin Deransart², Benoit Chovelon^{3,4}, Sebastien Carnicella^{1*}

¹Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

²Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

³Service de Biochimie, Biologie Moleculaire, Toxicologie Environnementale, CHU de Grenoble-Alpes Site Nord – Institut de Biologie et de Pathologie, F-38041 Grenoble, France.

⁴Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000, Grenoble, France

***Correspondence:**

Sebastien Carnicella, Ph.D.
Grenoble Institute of Neurosciences
31 Chemin Fortuné Ferrini
38700 La Tronche
France

E-mail: sebastien.carnicella@inserm.fr
Tel.: +33-(0)4-56-52-06-67/(0)6-23-88-26-65

Supplement 1 contains:

(Named and ordered according to their first mention in the main text)

- - Supplemental Methods
- - Suppl. Fig. S1 to S4
- - Suppl. Table S1

SUPPLEMENTAL METHODS

Animals

All animals used in this study were bred at the Plateforme Haute Technologie Animal or at the Grenoble Institut Neurosciences, La Tronche, France). All experimental protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the new French directive 2010/63, and were approved by the French national ethics committee no. 004.

hM4Di-DREADDs expression

Chemogenetic manipulation of SNc DA neurons was achieved through stereotaxic bilateral infusion of a AAV5-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (10^{12} particles/mL, plasmid #44362, Addgene, Watertown, MA, USA) or AAV5-hSyn-DIO-mCherry (10^{12} particles/mL, plasmid #50459, Addgene) in the SNc of *TH-Cre* rats (1,2). Animals were anesthetized with a mixed intraperitoneal injection of ketamine (Chlorkétam, 60 mg/kg, Merial SAS, Lyon, France) and xylazine (Rompun, 10 mg/kg, Bayer Santé, Puteaux, France). Then local anesthesia was provided by a subcutaneous injection of lidocaïne (Lurocaïne, 8 mg/kg, Vetoquinol S.A., Lure, France) on the skull surface and animal were secured in a Kopf stereotaxic frame (Phymep, Paris, France) under a microbiological safety post (PSM). Coordinates for SNc injections were determined according to (3), adjusted to the body weight, and set at, relative to bregma: -4.3 mm (AP), ± 2.4 mm (ML), -7.9 mm (DV). On each hemisphere, 1 μ L was infused at a rate of 0.2 μ L/min using microinjection cannula (33-gauge, Plastic One, USA) connected to a 10 μ L Hamilton syringe and a microinjection pump (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). After each injection, the cannula was left in position for 5 min to allow the injected solution to be absorbed into the parenchyma and minimize the spread of the virus along the cannula tract. The skin was sutured, disinfected, and the animal placed in a heated wake-up cage, before being replaced in its home-cage after complete awakening and monitored for several days.

With these parameters, we always observed mCherry staining in TH-positive neurons. This selective expression of the transgene was confirmed in a pilot experiment in which no mCherry staining was detected after the total destruction of SNc DA neurons with the neurotoxin 6-hydroxydopamine (data not shown).

***In vivo* microdialysis experiment**

Rats were anesthetized by inhalation of isoflurane (Isoflurin, Axience SAS, Pantin, France) and secured in a Kopf stereotaxic frame (Phymep, Paris, France). The dorsal skull was exposed, and holes were drilled to facilitate the bilateral implantation of microdialysis probes. Homemade microdialysis probes were prepared and the length of the dialysis membrane was adapted to the brain regions studied (1.8 mm for the anterior dorsolateral striatum (aDLS) and 1 mm for the nucleus accumbens (NAc)). During each experiment, one probe was lowered in the aDLS on one side and one probe was lowered in the NAc on the other side. The stereotaxic coordinates were determined according to (3), adjusted to the body weight, and set at, relative to bregma: +2.2 mm (AP); \pm 3.2 mm (ML) and -6.5 mm (DV) for the aDLS; +2.6 mm (AP); \pm 1.2 mm (ML) and -8 mm (DV) for the NAc. The aDLS was exclusively targeted here (see Supplementary Fig. S2), as well as in the striatal tissues DA quantification experiment, because compulsive alcohol seeking in rats has been recently associated with this territory specifically (4). After implantation, probes were equilibrated for 1 h with artificial cerebrospinal fluid (NaCl 149 mM, KCl 2.8 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 1.2 mM, and glucose 5.4 mM, pH 7.3) at a flow rate of 1 μ l/min. Then, dialysis fractions were collected with a refrigerated autosampler (820 Microsampler, Univentor, Zejton, Malta) every 45 min, over a 6-h period divided in a 1h30 period without treatment and a 4h30 period following the injections. At the end of the experiment, the skin was stitched, disinfected, and the rat placed in a heated wake-up cage, before being replaced in its home-cage after complete awakening. At least one week after the experiment, microdialysis was performed a second time by reversing the dialyzed

structures on each hemisphere. After histological validation, DA contents of dialysis fractions were determined using high-performance liquid chromatography (1200 series, AGILENT Technologies, USA), with electrochemical detection (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, Illkirch, France) and an Aquasil C18 reverse-phase microcolumn (RP-18, 100 x 2.1 mm, 3 μ particle size, Thermo Scientific, Illkirch, France) maintained at 24°C. The mobile phase (NaH₂PO₄ 50 mM, EDTA 0.1 mM, sodium octyl sulfate 1.7 mM, KCl 4.5mM and 5% acetonitrile (vol/vol), adjusted to pH 3.1) was run at a flow rate of 0.4 ml/min. The working electrode potential was +550 mV and the detector sensitivity 2 nM for DA. The running time for each determination was 12 minutes. Chromatograms were collected and treated with integration software (Chromeleon 7 CDS Software, Thermo Scientific). DA concentrations were determined by comparing DA peaks with external standards and were expressed in nanomolar.

Behavioral procedures

Intermittent access to 20% alcohol two-bottle choice drinking procedure: Concurrent access was given on Sunday, Tuesday, and Thursday. The placement (left or right) of each solution was alternated between each session to control for side preference, and a bottle of water was placed in a cage without rats to evaluate the spillage that was always ≤ 1 mL ($< 3.5\%$ of the total fluid intake). Level of alcohol and water consumption (g/kg/time) were measured after the first 30 min, allowing investigation of binge-related drinking behavior (18), and at the end of the 24h-session.

2.5% Sucrose two-bottle choice drinking procedure: Rats were given 1 h concurrent access to one bottle of water and one bottle of 2.5% (v/v) sucrose. At the end of the session, the volumes of sucrose solution and water consumed were measured to determine sucrose, water and total

fluid intake (mL/kg), and preference for sucrose over water (sucrose intake/total intake, expressed as a percentage).

Open arena test: Rats were placed in an opaque open arena apparatus (50 x 50 x 40 cm). Over a 30-min period, horizontal distance traveled (cm) was recorded and analyzed with a video-tracking system.

Stepping test: Rats, maintained by the posterior third of their body, were moved over a length of 90 cm by a rectilinear and regular movement from left to right and inversely along a smooth-surfaced table (5). The test was carried out in triplicates and the number of adjustments of right and left paws during displacements was counted by two observers blind to the experimental conditions.

Light / Dark avoidance test: The apparatus was composed of a light (50 x 40 x 40 cm) and a dark chamber (24 x 40 x 40 cm) separated by an opaque wall with a small aperture (14,5 x 7 cm), to allow rats to move freely between the chambers. The light chamber was opened at the top and lit with a white incandescent light (> 400 lux) located 70 cm above the floor of the chamber. By contrast, the dark chamber was closed at the top and was unlit (< 5 lux). Rats were placed in the center of the light chamber and the total time spent in the light and the dark chambers, over a 5-min period, were recorded with a video-tracking system and analyzed by an observer blind to the experimental conditions.

Elevated plus-maze test: The elevated plus-maze was composed of two opposing open arms (50 x 10 cm) and two opposing arms enclosed by high opaque walls (50 x 10 x 40 cm) suspended 55 cm above the floor. Rats were placed in the center of the elevated plus-maze and times spent in the open and closed arms, over a 5-min period, were recorded and analyzed with a video-tracking system.

Forced swim test: Rats were placed in a transparent cylinder of 40 cm high and 20 cm in diameter, filled with water (24 ± 1 °C) to a depth of 30 cm, for 10 minutes (5). Animal activity was recorded and analyzed with a video-tracking system.

Histological analysis

Brain tissue preparation and processing: For striatal tissues DA quantification, rats were deeply anesthetized by isoflurane saturation and sacrificed by decapitation. Brains were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. For the other experiments, rats were deeply anesthetized by isoflurane saturation or by injection of exagon (Axience SAS, Pantin, France) and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). They were then cryoprotected in 20% sucrose/PB for 24 h and frozen in isopentane cooled to -50°C on dry ice. Coronal sections of striatum and mesencephalon were cut using a cryostat (HM525, Microm, Francheville, France). For striatal tissues DA quantification, aDLS, DMS NAc were dissected from multiple thick sections of striatum (100 µm, 2.2 to 0.7 mm anterior to bregma) and stored at -80 °C before being homogenized. To verify the placement of the microinjection cannula and microdialysis probes, brains were cut at a thickness of 30 µm. Sections were then stained using Cresyl violet staining and visualized under a light microscope (Nikon Eclipse 80i, TRIBVN, Châtillon, France) coupled to the ICS FrameWork computerized image analysis system (Calopix 2.9.2 software, TRIBVN, Châtillon, France). Finally, to quantified transgenes expression, floating coronal sections (30 µm) of three levels of the mesencephalon were selected according to (1).

Quantification of transgenes expression: Free-floating coronal sections were washed with TBS and incubated for 1 h in 0.3% Triton X-100 in TBS (TBST) and 3% normal goat serum (NGS).

They were then incubated with primary monoclonal mouse anti-TH antibody (1:2500, Millipore catalogue no. MAB5280, RRID:AB_2201526) diluted in TBST containing 1% NGS overnight (4°C). Then, slices were incubated with a green fluorescent conjugated goat anti-mouse Alexa 488 antibody (1:500, Invitrogen catalogue no. A-11029, RRID:AB_138404) for 1h30 at room temperature. They were finally mounted on superfrost glass slides (Thermo Scientific, Illkirch, France), with Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc., Hirschberg an der Bergstraße, Germany). Fluorescent acquisitions of TH labelling and mCherry expression were taken with an objective x20 / NA 0.8 on a slide scanner (Axioscan Z1, Zeiss, Göttingen, Germany), and analyzed with ImageJ. Fluorescent illustrations were taken with an objective x20 / NA 0.8 on a spinning-disk confocal microscope (CSU-W1 confocal scanner unit Yokogawa (Gataca Systems, Massy, France), Prime 95B sCMOS Camera (Teledyne Photometrics, Birmingham, UK) and microscope Axio-observer Z1(Zeiss)). Z-stacks of digital images were captured using ZEN software (Zeiss).

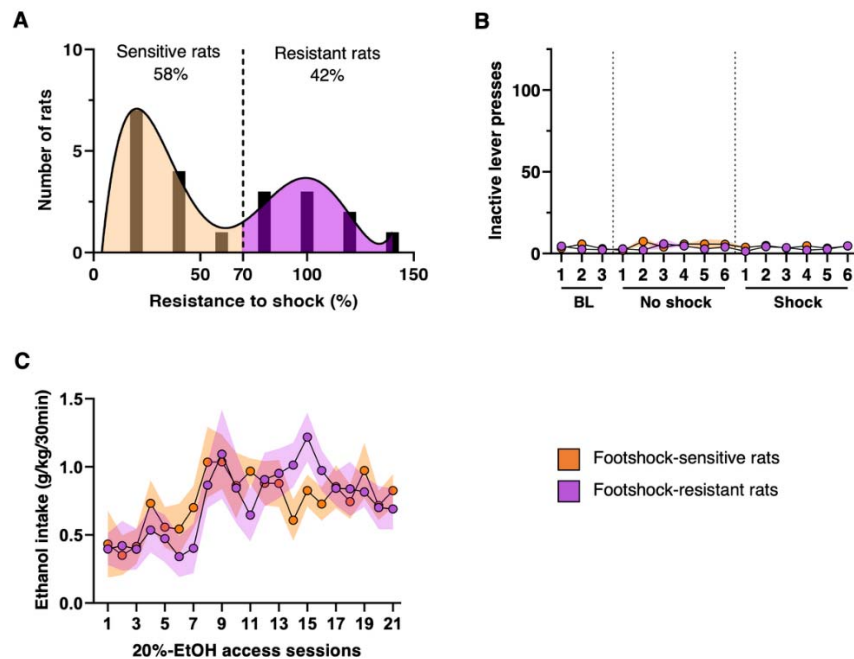
Statistical analyses

Parametric analyses were performed with assumptions of normality (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests). For sphericity, tests were corrected using the Greenhouse-Geisser correction (6). Data were analyzed by unpaired t-test, paired t-test, simple linear regression, one-way ANOVA, two-way ANOVAs and RM two-way ANOVAs, three-way ANOVAs, RM three-way ANOVAs depending on the experimental design, using Prism 8 (GraphPad Prism). Due to technical reasons, such as leakage or artefacts obtained in HPLC, some values were missing in the microdialysis experiment (< 2% of the value obtained in this experiment). In this case, data were analyzed by fitting a mixed model proposed by the statistical software. This mixed model uses a compound symmetry covariance matrix and is fit using Restricted Maximum Likelihood (REML). When indicated, *post hoc* analyses were carried out with the Bonferroni's correction procedure. Significance for p values was set at $\alpha = 0.05$. Effect sizes

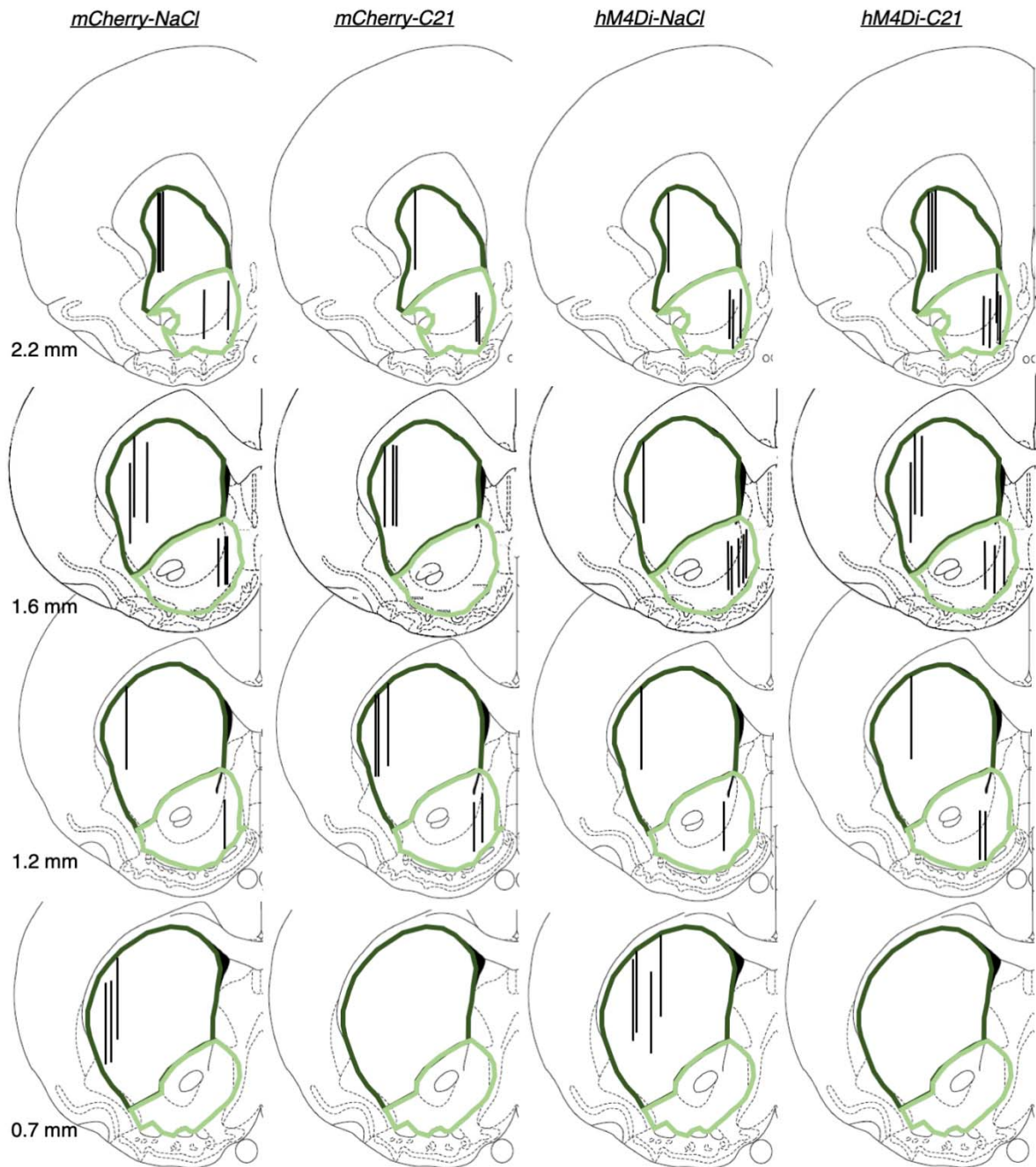
for the ANOVAs were also reported using partial η^2 values (1,7). Determining these values from the mixed-model analysis was however not accessible.

1. Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S. Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. *PLoS ONE*. 2020;15(9 September):1–11.
2. Krashes MJ, Koda S, Ye CP, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(4):1424–8.
3. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. Elsevier Academic Press. 2007;
4. Giuliano C, Belin D, Everitt BJ. Compulsive alcohol seeking results from a failure to disengage dorsolateral striatal control over behavior. *Journal of Neuroscience*. 2019;39(9):1744–54.
5. Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry* [Internet]. 2014 Mar 12;19(3):358–67. Available from: <http://www.nature.com/articles/mp20133>
6. Abdi H. Greenhouse–Geisser Correction. In: Salkind N, editor. *Encyclopedia of Research Design* [Internet]. 2455 Teller Road, Thousand Oaks California 91320 United States : SAGE Publications, Inc.; Available from: <http://methods.sagepub.com/reference/encyc-of-research-design/n168.xml>
7. Levine TR. Eta Squared, Partial Eta Squared, and Misreporting of Effect Size in Communication Research. *Human Communication Research* [Internet]. 2002 Oct 1;28(4):612–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1093/hcr/28.4.612>

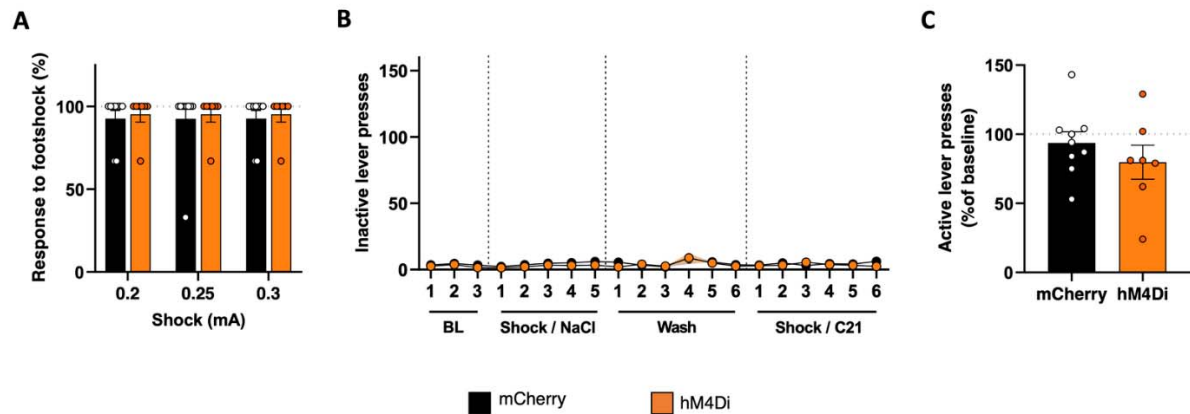
SUPPLEMENTAL FIGURES



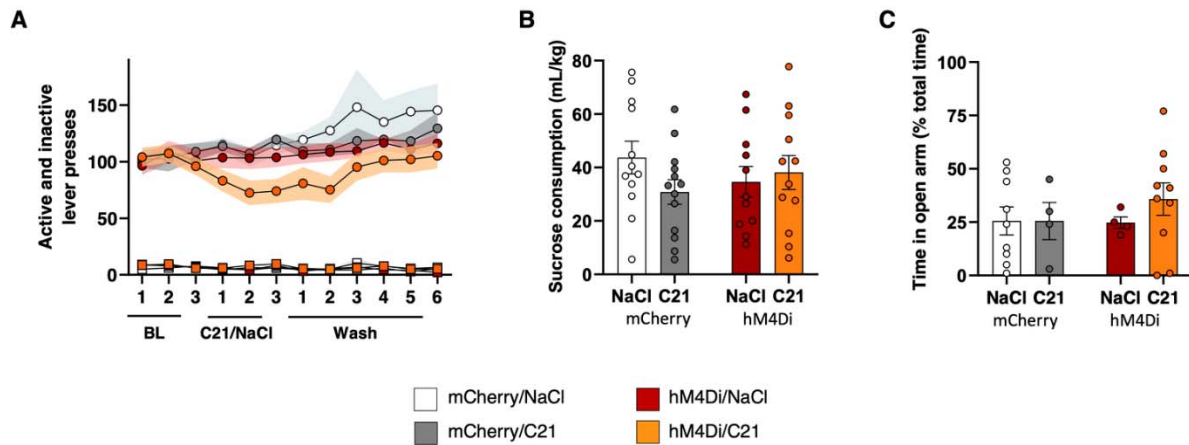
Supplementary Fig. S1. Behavioral characterization of footshock-sensitive and footshock-resistant rats. (A) Bimodal distribution of the population of rats self-administering alcohol under footshock-punishment sessions. 42% of rats were *footshock-resistant* ($n=9$) and 58% were *footshock-sensitive* ($n=12$). (B) Number of inactive lever presses in 30-min self-administration sessions of 20% EtOH (FR3), during baseline, “no-shock” and “shock” sessions. RM two-way ANOVAs found no effect of treatment, transgene or treatment x transgene interaction [$F_s < 1.06$, $P > 0.39$, partial $\eta^2 < 0.05$]. (C) Ethanol intake during the first 30 minutes of intermittent-access 20%-ethanol two-bottle-choice sessions (*IA 20%-EtOH 2BC*). RM two-way ANOVAs showed a significant effect of session [$F_{(8, 158)} = 3.41$, $P < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.15$] but neither effect of group nor session x group interaction [$F_s < 0.72$, $P > 0.5$, partial $\eta^2 < 0.04$]. Data are expressed in mean \pm SEM.



Supplementary Fig. S2. Schematic representation of the microdialysis probe placement across groups. The location of the dialysis membrane in each individual is represented by vertical bars. The dorsal striatum and the nucleus accumbens are delineated in dark and light green respectively. The numbers indicate the distance anterior to bregma (mm). Coronal sections were taken from (3).



Supplementary Fig. S3. Chemogenetically-induced nigrostriatal hypodopaminergia does not decrease sensitivity to footshocks and does not increase inactive lever presses or operant ethanol self-administration. (A) In order to ensure that chemogenetic did not decrease sensitivity to footshock, we evaluate the effect of C21 on the percentage of response to footshocks in absence of alcohol, at intensity used during self-administration of 20%-EtOH (0.25 mA) and at two surrounding intensities (0.2 and 0.3 mA) in *hM4Di* rats (orange, $n=7$) and *mCherry* rats (black, $n=10$). RM two-way ANOVAs found no effect of the group, intensity or group intensity interaction [$F_s < 0.41$, $P > 0.5$, partial $\eta^2 < 0.01$]. (B) Number of inactive lever presses in 30-min self-administration sessions of 20%-EtOH (FR3), during baseline, “Shock/NaCl”, “Wash” and “Shock/C21” sessions. RM two-way ANOVA showed no effect of session, transgene or session x transgene interaction [$F_s < 1.95$, $P > 0.1$, partial $\eta^2 < 0.12$]. (C) Effect of C21 on the percentage of lever presses over the course of a 30-min self-administration session of 20%-EtOH (FR3) without shock normalized to baseline. Unpaired t-test showed no difference of performances between the two groups [$t=0.98$, $P=0.34$]. Data are expressed in mean \pm SEM.



Supplementary Fig. S4. Nigrostriatal hypodopaminergia does not alter reward sensitivity or induce anxiety-related behavior. (A) Number of active (circle) and inactive (square) lever presses to obtain 2.5%-sucrose deliveries in 60-min self-administration sessions under continuous reinforcement (FR1), during baseline, “C21/NaCl” and “Wash” sessions, in *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=8$) or NaCl (red, $n=9$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=10$) or NaCl (white, $n=10$). On active lever presses, RM three-way ANOVAs found a significant effect of session and transgene [$F_s > 4.01$; $P < 0.05$; partial $\eta^2 > 0.11$] but no effect of treatment or any interaction between these factors [$F_s < 2.42$; $P > 0.1$; partial $\eta^2 < 0.06$]. On inactive lever presses, RM three-way ANOVAs revealed a significant effect of session [$F_{(7, 218)} = 2.65$; $P < 0.05$; partial $\eta^2 < 0.07$] but no effect of treatment, transgene, or any interaction between these factors [$F_s < 1.14$; $P > 0.33$; partial $\eta^2 < 0.33$]. (B) Sucrose consumption during a 60-min 2.5%-sucrose two-bottle-choice drinking session by *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=12$) or NaCl (red, $n=11$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=13$) or NaCl (white, $n=12$). (C) Percentage of time spent in open arms of an elevated-plus maze by *hM4Di* rats treated with C21 (orange, $n=10$) or NaCl (red, $n=4$) and *mCherry* rats treated with C21 (grey, $n=4$) or NaCl (white, $n=9$). Two-way ANOVAs showed no effect of treatment, transgene or treatment \times transgene interaction in these two tests [$F_s < 2.04$, $P > 0.16$, partial $\eta^2 < 0.04$]. Data are expressed in mean \pm SEM.

Table S1. Summary of statistical analyses

Figures	Questions ?	Answ.	Tests	Normality	Results	a	partial η^2	Post-hoc	Location	
Fig. 1B	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	No	F(6, 109) = 7.82	<0.001	0.29			
	Is there an effect of group?	No			F(1, 19) = 0.13		0.72			
	Is there a session x group interaction?	No			F(20, 380) = 0.47		0.02			
Fig. 1C	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	No	F(4, 81) = 5.345	<0.001	0.22	Bonferonni	Shock session 6 **	
	Is there an effect of group?	No			F(1, 19) = 1.63		0.22			
	Is there a session x group interaction?	Yes			F(14, 266) = 2.86		<0.001			0.13
Fig. 1D	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	Yes	F(1, 19) = 44.67	<0.001	0.61	Bonferonni	Shock ***	
	Is there an effect of group?	Yes			F(1, 19) = 25.25		<0.001			0.70
	Is there a session x group interaction?	Yes			F(1, 19) = 20.89		<0.001			0.52
Fig. 1E DLS	Is there an effect of group?	Yes	One-way ANOVA	Yes	F(2, 26) = 5.56	<0.01	0.30	Bonferonni	S vs R **	
Fig. 1E DMS	Is there an effect of group?	No	One-way ANOVA	Yes	F(2, 25) = 0.55	0.58	0.04			
Fig. 1E NAC	Is there an effect of group?	No	One-way ANOVA	Yes	F(2, 26) = 0.26	0.77	0.02			
Fig. 1F DLS	Is there a correlation between the resistance to footshock and the DA level of the DLS?	Yes	Simple linear regression		F(1, 19) = 16.18	<0.001				
Fig. 1F DMS	Is there a correlation between the resistance to footshock and the DA level of the DMS?	No	Simple linear regression		F(1, 18) = 1.14	0.3				
Fig. 1F NAC	Is there a correlation between the resistance to footshock and the DA level of the NAC?	No	Simple linear regression		F(1, 19) = 0.04	0.85				
Fig. 2C	Is there a difference in the viral expression depending of area?	Yes	Three-way ANOVA	Yes	F(2, 129) = 158	<0.001	0.71			
	Is there a difference in the viral expression depending of transgene?	No			F(1, 129) = 0.54	0.46	0.004			
	Is there a area x transgene interaction?	No			F(1, 129) = 0.01	0.91	0.0001			
	Is there a area x treatment interaction?	No			F(2, 129) = 1.04	0.36	0.02			
	Is there a transgene x treatment interaction?	No			F(2, 129) = 0.37	0.69	0.006			
	Is there a area x transgene x treatment interaction?	No			F(1, 129) = 0.15	0.7	0.001			
		No			F(2, 129) = 0.08	0.93	0.001			
Fig. 2E	Is there an effect of treatment?	No	Mixed-effects model (REML)	No	F(1, 27) = 0.59	0.45	n.a.			
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 27) = 0.54	0.47	n.a.			
	Is there an effect of time?	No			F(2, 65) = 1.76	0.17	n.a.			
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			F(1, 27) = 0.04	0.85	n.a.			
	Is there a treatment x time interaction?	No			F(7, 185) = 0.73	0.65	n.a.			
	Is there a transgene x time interaction?	No			F(7, 185) = 0.96	0.46	n.a.			
	Is there a treatment x transgene x time interaction?	No			F(7, 185) = 1.237	0.28	n.a.			
Fig. 2F	Is there an effect of treatment?	No	Mixed-effects model (REML)	No	F(1, 25) = 0.04	0.85	n.a.			
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 25) = 0.15	0.70	n.a.			
	Is there an effect of time?	No			F(4, 103) = 1.3	0.27	n.a.			
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			F(1, 25) = 0.08	0.79	n.a.			
	Is there a treatment x time interaction?	No			F(7, 171) = 0.18	0.99	n.a.			
	Is there a transgene x time interaction?	No			F(7, 171) = 0.35	0.93	n.a.			
	Is there a treatment x transgene x time interaction?	No			F(7, 171) = 1.02	0.42	n.a.			
Fig. 2G	Is there an effect of treatment?	Yes	Two-way ANOVA	Yes	F(1, 27) = 8.71	<0.01	0.24	Bonferonni	hm4Di-C21 vs all : **	
	Is there an effect of transgene?	Yes			F(1, 27) = 8.26	<0.01	0.23			
	Is there a treatment x transgene interaction?	Yes			F(1, 27) = 8.63	<0.01	0.24			

Fig. 2H	Is there an effect of treatment?	No	Two-way ANOVA	No	F(1, 25) = 0.29	0.59	0.01		
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 25) = 0.11	0.74	0.001		
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			F(1, 25) = 0.03	0.87	0.001		
Fig. 3B	Is there a difference in the viral expression depending of area?	Yes	Two-way ANOVA	No	F(2, 90) = 116.4	<0.001	0.72		
	Is there a difference in the viral expression depending of transgene?	No			F(1, 90) = 0.87	0.35	0.01		
	Is there a area x transgene interaction?	No			F(2, 90) = 1.99	0.14	0.04		
Fig. 3C	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	No	F(4, 59) = 10.56	<0.001	0.43	Bonferroni	
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 14) = 0.1	0.76	0.01		
	Is there a session x transgene interaction?	No			F(23, 308) = 0.57	0.94	0.04		
Fig. 3D	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	No	F(4, 59) = 21.55	<0.001	0.61		
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 14) = 0.02	0.9	0.001		
	Is there a session x transgene interaction?	Yes			F(19, 266) = 2.18	<0.01	0.13		
Fig. 3E	Is there an effect of session?	Yes	RM Two-way ANOVA	Yes	F(1, 14) = 9.69	<0.01	0.41	Bonferroni	
	Is there an effect of transgene?	Yes			F(1, 14) = 15	<0.01	0.83		
	Is there a session x transgene interaction?	Yes			F(1, 14) = 18.41	<0.001	0.57		
Fig. 3F	Is there a difference between Shock/NaCl an Shock/C21 periods in hm4Di-expressing rats?	Yes	Paired t-test	Yes	t = 4.3, df = 6	<0.01			
	Is there a difference between Shock/NaCl an Shock/C21 periods in mCherry-expressing rats?	No			Paired t-test	Yes	t = 1.02, df = 8		0.34
Fig. 3G	Is there a correlation between difference of lever presses during Shock/C21 and Shock/NaCl periods and hm4Di expression in the dsNc?	Yes	Simple linear regression		F(1, 5) = 7.64	<0.05			
Fig. 3H	Is there a correlation between difference of lever presses during Shock/C21 and Shock/NaCl periods and hm4Di expression in the msNc?	No	Simple linear regression		F(1, 5) = 0.18	0.69			
Fig. 4B	Is there a difference in the viral expression depending of area?	Yes	Three-way ANOVA	Yes	F(2, 140) = 346.7	<0.01	0.83		
	Is there a difference in the viral expression depending of transgene?	No			F(1, 70) = 0.35	0.55	0.01		
	Is there a area x transgene interaction?	No			F(1, 70) = 0.16	0.69	0.003		
	Is there a area x treatment interaction?	No			F(2, 140) = 1.31	0.27	0.02		
	Is there a transgene x treatment interaction?	No			F(2, 140) = 0.05	0.95	<0.001		
	Is there a area x transgene x treatment interaction?	No			F(1, 70) = 1.13	0.29	0.02		
Fig. 4C	Is there an effect of treatment?	No	RM-Three-way ANOVA	No	F(1, 33) = 1.84	0.18	0.10	Bonferroni	
	Is there an effect of transgene?	No			F(1, 33) = 2.76	0.11	0.15		
	Is there an effect of session?	Yes			F(4, 145) = 6.71	<0.001	0.17		
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			F(1, 33) = 2.69	0.11	0.14		
	Is there a treatment x session interaction?	Yes			F(11, 363) = 3.41	<0.001	0.09		
	Is there a treatment x transgene x session interaction?	Yes			F(11, 363) = 2.96	<0.001	0.1		
Fig. 4D	Is there an effect of treatment?	Yes	Two-way ANOVA	Yes	F(1, 33) = 10.79	<0.01	0.25	Bonferroni	
	Is there an effect of transgene?	Yes			F(1, 33) = 17.95	<0.001	0.35		
	Is there a treatment x transgene interaction?	Yes			F(1, 33) = 13.38	<0.001	0.29		

mCherry vs hm4Di during C21 and NaCl vs C21 in hm4Di = ***

HM4Di-C21 vs all (***)

fig. S4A - Inactive lever Presses	Is there an effect of treatment?	No	RM- Three-way ANOVA	No	$F(1, 33) = 0.02$	0.88	0.001	
	Is there an effect of transgene?	No			$F(1, 33) = 0.03$	0.86	0.001	
	Is there an effect of session?	Yes			$F(7, 218) = 2.65$	< 0.05	0.07	
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			$F(1, 33) = 0.58$	0.45	0.013	
	Is there a treatment x session interaction?	No			$F(11, 363) = 1.14$	0.33	0.033	
	Is there a transgene x session interaction?	No			$F(11, 363) = 0.81$	0.63	0.024	
	Is there a treatment x transgene x session interaction?	No			$F(11, 363) = 0.76$	0.68	0.023	
fig. S4B	Is there an effect of treatment?	No	Two-way ANOVA	Yes	$F(1, 44) = 0.66$	0.42	0.01	
	Is there an effect of transgene?	No			$F(1, 44) = 0.02$	0.88	< 0.001	
	Is there a treatment x transgene interaction ?	No			$F(1, 44) = 2.04$	0.16	0.04	
fig. S4C	Is there an effect of treatment?	No	Two-way ANOVA	No	$F(1, 23) = 0.42$	0.52	0.02	
	Is there an effect of transgene?	No			$F(1, 23) = 0.31$	0.58	0.01	
	Is there a treatment x transgene interaction?	No			$F(1, 23) = 0.43$	0.52	0.02	

DISCUSSION

I. Synthèse des résultats

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat a permis de mettre en avant l'implication de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés et l'alcoolodépendance. Tout d'abord, nous avons démontré que l'expression d'un comportement compulsif pour l'alcool était associée à une diminution des niveaux de DA spécifiquement au sein du DLS. Cette observation suggérait fortement qu'un état allostatique, caractérisé par une chute du tonus DA, apparaissait au sein de la voie DA nigrostriée chez les animaux compulsifs uniquement. La voie DA mésolimbique, quant à elle, ne semblait pas altérée. Afin d'établir le lien causal entre l'apparition d'un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée et l'émergence du comportement compulsif, nous avons développé une approche de chémogénétique permettant d'induire, de façon sélective et réversible, une baisse du tonus DA. L'induction de cet état a permis de faire apparaître un comportement compulsif chez des animaux qui n'exprimaient pas initialement ce comportement. Enfin, nous avons évalué les conséquences de cet état sur les comportements motivés et affectifs. Nous avons constaté que la chute du tonus DA de la voie nigrostriée induisait un comportement de type apathique, mais n'avait aucun effet sur les comportements liés à l'anxiété et à la dépression.

II. Limites des approches expérimentales utilisées

Avant de discuter plus en détails les résultats obtenus au cours de nos expériences, il est important de prendre du recul sur les expériences que nous avons réalisées, afin de reconnaître les forces, mais également les limites, des approches expérimentales utilisées.

A. *Limites du modèle utilisé*

L'alcoolodépendance est une pathologie complexe, multifactorielle et multidimensionnelle qu'il est impossible de modéliser dans son intégralité (Vanderschuren et al., 2017; Yücel et al., 2019). Pour pallier cette limite, de nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier les différentes facettes de la pathologie, présentant chacun des avantages et des inconvénients (Belin-Rauscent et al., 2016; Kuhn et al., 2019; Lovinger and Alvarez, 2017; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006; Vanderschuren and Ahmed, 2021). Ce travail doctoral s'est inscrit dans l'étude d'une des caractéristiques fondamentales de

l'alcoolodépendance, l'usage compulsif de l'alcool, afin de déterminer un des mécanismes sous-jacents à l'émergence de ce comportement.

Dans notre étude, nous avons d'abord mis en place une procédure d'accès intermittent à l'alcool afin de modéliser le développement de la consommation excessive de la drogue (« escalade »), un des marqueurs importants de la transition vers l'addiction (Carnicella et al., 2014b; Vanderschuren and Ahmed, 2021). Cette expérience comportementale, reconnue notamment pour sa forte validité apparente et prédictive, a nécessité l'isolement de nos animaux durant l'intégralité de la procédure (Carnicella et al., 2014b; Jeanblanc et al., 2019). Or, les rongeurs étant des animaux grégaires, de nombreuses études ont démontré que l'isolement de ces animaux pouvait conduire à l'émergence de comportements de type anxieux (Cuenya et al., 2012; Morgan and Tromborg, 2007), dépressifs (Ieraci et al., 2016), et induire des altérations cognitives (Douglas et al., 2003; Zorzo et al., 2019). Si ces mécanismes sont peut-être à l'origine du développement de la consommation excessive et permettent de reproduire certains facteurs initiant la prise abusive de drogue chez l'Homme (Vanderschuren and Ahmed, 2021), il est important de garder à l'esprit que les conditions expérimentales sont susceptibles d'influencer les comportements que l'on observe. Au cours de cette procédure, nous avons justement constaté que nos animaux atteignaient des niveaux de consommation d'alcool inférieurs aux consommations décrites dans la littérature (4 g/kg/24h contre 5 - 6 g/kg/24h) (Barak et al., 2011; Carnicella et al., 2014b, 2011, 2009b, 2008; Simms et al., 2008). Nous avons également noté que la moitié seulement des animaux débutant la procédure d'accès intermittent développait une consommation excessive d'alcool, contrastant avec la forte proportion d'animaux (> 75% de la population) classiquement rapportée avec la souche de rats utilisée (Carnicella et al., 2014b). Si les raisons à l'origine de ces différences ne sont pas connues, ces résultats ont aussi bien été observés sur l'ensemble de nos animaux dérivant de nos croisements TH-Cre, qu'ils soient sauvages ou transgéniques, et pourraient donc être expliqués par la différence de lignage des rats Long-Evans utilisée. Néanmoins, ces différences n'ont pas entravé la poursuite de nos expériences. En effet, même si le nombre d'animaux sélectionnés a été plus faible et les niveaux de consommation moins importants, le niveau d'exposition à l'alcool a été suffisant pour conduire une partie des animaux à développer de la compulsivité pour la drogue. Enfin, aucune relation n'a été observée entre les quantités d'alcools consommées au cours de l'accès intermittent et l'expression du comportement

compulsif pour la substance d'abus. Cette absence de relation entre consommation excessive et consommation compulsive, déjà démontrée pour la cocaïne et l'alcool (Deroche-Gamonet et al., 2004; Giuliano et al., 2021, 2018), semble indiquer que la consommation excessive d'alcool favorise la transition de l'usage abusif à l'usage compulsif, mais n'explique pas, à elle seule, l'apparition de ce comportement.

À la suite de l'accès intermittent, une procédure opérante a été réalisée dans laquelle l'animal devait fournir un effort modéré pour obtenir l'alcool en appuyant plusieurs fois sur un levier. Des chocs électriques ont ensuite été couplés avec la réponse sur le levier renforcé afin de mimer l'apparition d'une conséquence négative suite au comportement réalisé, une approche comportementale largement utilisée dans le cadre de l'étude de la compulsivité aux drogues (Deroche-Gamonet et al., 2004; Everitt et al., 2018; Lüscher et al., 2020; Vanderschuren et al., 2017; Vanderschuren and Ahmed, 2021), et notamment de l'alcool (Domi et al., 2019, 2021; Giuliano et al., 2019; Seif et al., 2013). En effet, cette procédure est extrêmement intéressante pour étudier la réponse comportementale d'un animal face à une conséquence négative et permet d'établir un conflit, observable chez l'homme, entre le risque associé au comportement réalisé et le bénéfice immédiat que la drogue procure (Vanderschuren et al., 2017). Bien que les chocs électriques puissent apparaître comme des conséquences négatives assez éloignées de celles observées chez l'homme, une étude clinique a récemment renforcé la validité translationnelle de cette approche pour étudier la compulsivité, en démontrant que les individus souffrant d'addiction à la cocaïne étaient plus résistants à la punition par le choc que les individus sains (Ersche et al., 2016). Il faut noter, cependant, que l'utilisation de l'expérience d'auto-administration associée aux chocs électriques pour étudier la compulsivité reste débattue par certains spécialistes du domaine (e.g., (Durand et al., 2021). En effet, la réponse comportementale des animaux est directement liée à l'intensité, à la fréquence et à l'historique associés aux chocs délivrés (Jean-Richard-Dit-Bressel et al., 2018; Vanderschuren et al., 2017; Vanderschuren and Ahmed, 2021). Ainsi, une intensité ou une fréquence trop importante conduira l'ensemble des animaux à supprimer leurs réponses en présence de la punition, et tous les animaux seront considérés comme « non-compulsifs » (Cooper et al., 2007; Durand et al., 2021; Marchant et al., 2013). Inversement, l'utilisation d'un choc trop faible conduira l'ensemble des animaux à poursuivre leurs comportements, indépendamment de la conséquence associée. Entre ces

deux extrêmes, certains individus interrompent leurs comportements à des intensités de choc plus élevées, alors que d'autres interrompent rapidement leurs comportements (Marchant et al., 2013). Dès lors, le concept de compulsivité approché par l'intermédiaire de la résistance aux chocs, semble relatif aux conditions expérimentales utilisées. Si ces conditions peuvent mener à certaines disparités dans les résultats obtenus (notamment en termes de proportion) et les interprétations qui en découlent, cette relativité apporte une certaine validité apparente avec le comportement retrouvé chez l'homme. En effet, nous pouvons facilement envisager que la poursuite du comportement de recherche et de consommation de drogue en dépit des conséquences négatives soit également relative et dépende fortement de la gravité des conséquences associées aux comportements, ainsi que de la perception individuelle de ces conséquences. Enfin, bien que nous ayons utilisé le choc comme un élément aversif pour modéliser une conséquence négative, ce dernier pourrait également devenir un stimulus conditionné à l'usage de la drogue. En effet, lorsqu'il est délivré de manière contingente à la drogue, il pourrait du fait de son association, acquérir une valence appétitive et devenir par conséquent moins efficace en tant que « punition » (Dickinson and Pearce, 1976; Jean-Richard-Dit-Bressel et al., 2018; Pelloux et al., 2007).

Au cours de notre étude, nous n'avons cependant observé aucune baisse de la réponse aux chocs au cours des sessions successives dans nos conditions contrôles, et ce, même lorsque cette phase de test était répétée de façon longitudinale (voir article II, Figure 4D). Les paramètres d'intensité et de fréquence d'exposition aux chocs que nous avons choisis, en accord avec la littérature (Seif et al., 2013), ont permis de dissocier de façon distincte deux populations d'animaux : les animaux qui continuaient à appuyer, et les animaux qui interrompaient leurs comportements lors de l'ajout de la conséquence négative. L'expérience évaluant la sensibilité aux chocs a également démontré que les animaux compulsifs possédaient la même sensibilité aux chocs que les animaux non-compulsifs. Nous apportons, de plus, une autre validation empirique de cette approche, puisque l'étude neurobiologique de ces deux populations a mis en évidence des différences notables au sein de la voie DA nigrostriée, mais également au niveau métabolique dans une étude ancillaire incluse en Annexe I. Finalement, l'utilisation d'une variable continue, plutôt que la dissociation stricte en deux populations, a renforcé nos résultats en démontrant au niveau individuel, que la

poursuite de l'usage d'alcool en face du choc électrique était inversement proportionnelle aux niveaux de DA mesurés au sein du DLS.

Mon travail doctoral s'est focalisé sur l'aspect compulsif de l'alcoolodépendance afin d'isoler et d'étudier le rôle de la voie nigrostriée dans ce type de comportement. Il faut, cependant, garder à l'esprit que la compulsivité n'est qu'une des dimensions de l'addiction. Afin d'élargir le champ d'étude de l'implication de la voie DA nigrostriée dans l'alcoolodépendance, le modèle des « trois critères de l'addiction », développé au sein du laboratoire de V. Piazza, pourrait être utilisé (Deroche-Gamonet et al., 2004). Ce modèle, proposé pour l'addiction à la cocaïne puis étendu à l'alcoolodépendance (Domi et al., 2019; Radke et al., 2017), consiste en une combinaison de tests comportementaux permettant d'évaluer la motivation des animaux pour obtenir la drogue, leur capacité à refréner le comportement lorsque la drogue n'est plus disponible, et finalement lorsqu'une conséquence négative est ajoutée à l'usage de la drogue. L'étude de ces trois critères, complétée par un test de préférence entre la drogue et une autre récompense comme décrit dans la dernière partie de l'état de l'art (sucrose/interaction sociale) (Ahmed et al., 2013), permettrait une approche multidimensionnelle de la pathologie, en reproduisant une grande partie des critères diagnostiques définis dans le DSM-5 ou la CIM (American Psychiatric Association, 2013; Belin-Rauscent et al., 2016; WHO, 1993). Enfin, notre approche expérimentale, n'avait pas pour objectif de dissocier les comportements de recherche et de consommation de drogue. Or, il a récemment été montré que les comportements de recherche et de consommation compulsifs d'alcool reposaient sur des mécanismes neurobiologiques distincts (Belin-Rauscent et al., 2016; Everitt et al., 2018; Giuliano et al., 2021). À titre d'exemple, l'infusion au sein du DLS d' α -flupenthixol, antagoniste des récepteurs dopaminergiques, inhibe le comportement de recherche compulsif d'alcool, mais ne modifie pas celui de consommation (Giuliano et al., 2019). La dissociation de ces deux composantes au cours d'expériences futures, permettrait de déterminer si l'hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée est spécifiquement impliquée dans ces aspects de recherche ou de consommation, ou alors dans l'ensemble de ces comportements.

B. Limites de l'approche de chémogénétique

1. Une hypodopaminergie sélective et transitoire

L'approche de chémogénétique développée au sein du laboratoire a permis d'induire une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée, en inhibant l'activité des neurones DA de la SNc. Un délai important semble, toutefois, nécessaire à l'apparition de l'état hypodopaminergique. En effet, dans notre étude électrophysiologique, l'inhibition des neurones de la SNc débute 60 minutes post-injection du ligand C21, pour devenir maximale à 90 minutes, au moment où la baisse de DA au niveau du striatum dorsal apparaît en microdialyse. Cette observation contraste avec le délai de 30 minutes classiquement observé dans les études comportementales exploitant l'approche des DREADDs avec le C21 ou le CNO (Boekhoudt et al., 2017, 2016b, 2016a; Mahler et al., 2019, 2014; Parkes et al., 2018; Puaud et al., 2021; Thompson et al., 2018), en accord avec la pharmacocinétique de ces molécules (Jendryka et al., 2019). Pour le moment, il n'y a pas d'élément identifié dans la littérature pour expliquer ces différences de cinétique. Cependant la cohérence de nos données électrophysiologiques et neurochimiques, ainsi que l'absence d'effet au niveau de nos différents groupes contrôles, ont confirmé que le DREADD permettait bien une inhibition sélective de la voie DA nigrostriée.

Si l'apparition de la baisse du tonus DA au niveau striatal apparaît concordante avec l'inhibition des neurones de la SNc, elle est cependant très transitoire et ne semble durer que 45 minutes, alors que l'inhibition neuronale perdure environ 2 heures (en accord avec la pharmacocinétique du C21 (Jendryka et al., 2019)). Cette différence temporelle entre l'inhibition des neurones DA de la SNc et la baisse de DA au sein du DLS pourrait notamment s'expliquer par la présence de nombreux systèmes de régulation, homo-synaptiques et hétéro-synaptiques, permettant de rétablir des niveaux stables de DA au sein du striatum, malgré l'altération de l'activité neuronale induite au niveau du mésencéphale (Cachope and Cheer, 2014; Kosillo et al., 2016; Nolan et al., 2020; Roberts et al., 2020; Sulzer et al., 2016). De nombreuses études ont, par exemple, démontré l'importance des autorécepteurs DA, des transporteurs de recapture, et du pool de vésicules DA disponibles à la membrane présynaptique dans la régulation homo-synaptique du tonus DA (pour revues, voir (Nolan et al., 2020; Sulzer et al., 2016)). Il est donc possible que la baisse de DA induite par notre

approche au niveau du striatum soit contrebalancée par une hausse de relargage, une baisse de la dégradation ou de la recapture de la DA au sein de la fente synaptique. Les mécanismes de régulations hétéro-synaptiques, impliquant divers systèmes de neurotransmission tels que le système glutamatergique (Zhang and Sulzer, 2003), GABA (Roberts et al., 2020) ou cholinergique (Kosillo et al., 2016), ont également été mis en avant dans la régulation des niveaux de DA au sein du striatum, et pourraient compléter les mécanismes susmentionnés. De plus, lors de nos analyses en immunofluorescence, nous avons observé une expression beaucoup plus importante du récepteur inhibiteur hM4Di au sein des corps cellulaires des neurones DA de la SNc par rapport à son expression au sein des terminaisons axonales du striatum. Cette différence dans l'expression pourrait également favoriser l'apparition d'un effet plus robuste dans le mésencéphale.

Finalement, les mécanismes sous-jacents à l'hypodopaminergie induite par l'approche de chémogénétique nécessitent de plus amples investigations pour déterminer avec précision les principaux facteurs responsables de la cinétique observée. Cependant nos études électrophysiologique et neurochimique ont permis de valider en amont notre approche, en déterminant les conditions expérimentales optimales pour réaliser nos études comportementales.

2. Sélectivité et spécificité

L'approche DREADDs a initialement été décrite comme un système de « clé – serrure » hautement spécifique, qui repose sur la combinaison entre un récepteur perdant son affinité pour son ligand endogène et un ligand inerte (Armbruster et al., 2007; Roth, 2016). Néanmoins, nous avons observé que le ligand synthétique C21 pouvait induire des effets aspécifiques suivant la dose utilisée et le sexe de l'animal. Ce résultat complète les observations précédemment effectuées avec les composés de première génération, tels que le CNO (Baerentzen et al., 2019; Juan L. Gomez et al., 2017; MaLaren et al., 2016) ou la clozapine (Ilg et al., 2018), et renforce l'idée selon laquelle l'obtention d'un composé dénué de toute activité pharmacologique endogène reste utopique (Goutaudier et al., 2019). En effet, puisque la chémogénétique combine la génétique à la pharmacologie, les limites propres aux approches pharmacologiques classiques demeurent, et il paraît peu probable d'obtenir un jour un ligand ayant une forte spécificité pour les DREADDs sans aucune affinité

pour les nombreux récepteurs présents dans le cerveau, et dont certains ont de plus été utilisés pour créer les DREADDs (Armbruster et al., 2007). La spécificité de cette approche restera donc relative et dépendra toujours de la dose, de l'espèce, de la souche et du sexe de l'animal utilisé. Dès lors, la validation de cette approche, dans les conditions expérimentales précises du modèle dans lequel elle sera utilisée, semble cruciale avant d'entamer une étude comportementale. En suivant cette philosophie, les expériences d'électrophysiologie extracellulaire et de microdialyse ont permis de déterminer la dose de C21 adéquate pour activer le récepteur hM4Di et induire une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée. L'utilisation de groupes contrôles permettant d'isoler l'effet du récepteur, du ligand, et l'effet de la combinaison entre le récepteur et le ligand, est également fondamentale, même si plusieurs études ont commencé à s'affranchir de certaines de ces conditions (e.g., (Atasoy et al., 2012; Beloate et al., 2016; Stachniak et al., 2014; Xia et al., 2017)). Ainsi, même s'il n'a pas été possible d'étudier l'impact du C21 ou du DREADD sur d'autres systèmes de neurotransmission avant d'entamer les expériences de comportement, l'utilisation des différentes conditions contrôles a permis de vérifier la spécificité des effets observés.

De mon point de vue, la force de cette approche repose, comme pour l'optogénétique, dans l'utilisation de la « génétique » qui permet d'induire des modulations toniques spécifiques à une sous-population cellulaire. Ici par exemple, l'utilisation d'une souche de rats transgéniques et d'un vecteur viral permettant l'expression conditionnelle du récepteur hM4Di dans les neurones DA, a permis de cibler cette population de neurones avec une grande sélectivité. Il faut reconnaître, cependant, qu'en plus des effets aspécifiques des ligands DREADDs, des études de chémozogénétique ont également mis en lumière la possible expression non-conditionnelle du DREADDs (Mahler et al., 2014 ; Morceau et al., 2019). Afin de nous assurer que le récepteur hM4Di ne s'exprimait pas en absence de neurone DA, nous avons tout d'abord combiné l'approche de chémozogénétique à une approche lésionnelle. Dans cette expérience, les neurones DA des rats TH-Cre d'un hémisphère ont été détruits par infusion 6-OHDA unilatéral, puis le vecteur viral codant pour le récepteur hM4Di a été infusé dans les deux hémisphères. À la suite de cette procédure expérimentale, le récepteur hM4Di était exprimé dans l'hémisphère contenant les neurones DA alors qu'aucune expression n'a été observée du côté lésé ce qui a confirmé que l'expression du DREADDs n'était possible qu'en présence des neurones DA exprimant l'enzyme de recombinaison. En addition de cette

validation, les expériences d'immunofluorescence et de microscopie confocale réalisées à la suite des expériences d'électrophysiologie, de microdialyse ou de comportement ont démontré que l'expression du récepteur hM4Di été toujours restreinte aux neurones DA. Il n'a pas été possible, cependant, de limiter parfaitement l'expression du DREADD à la SNc, et une très faible proportion de neurones DA ont systématiquement été transduits au sein de l'ATV. Les résultats obtenus en microdialyse ont confirmé que cette petite population de neurones infectés n'était pas suffisante pour altérer le fonctionnement global de la voie DA mésolimbique.

Enfin, nous avons choisi d'inhiber l'activité de la voie DA nigrostriée en infusant le DREADDs directement dans la SNc et d'administrer le ligand par voie intrapéritonéale. Si cette approche a été choisie pour sa grande praticité, il est important de garder à l'esprit que les neurones DA de la SNc, projettent majoritairement au striatum dorsal, mais qu'il existe également d'autres territoires mineurs de projections (État de l'art – Partie 2, I, C – p.48). Ainsi l'utilisation de stratégies rétrovirales, permettant d'infuser le virus codant pour le DREADD au niveau du DLS et de l'exprimer uniquement dans les neurones DA de la SNc projetant vers cette structure (Cerpa et al., 2020; Morceau et al., 2019; Smith et al., 2016), ou l'administration intra-crâniale du ligand directement au niveau du DLS (Cope et al., 2019; Mahler et al., 2014; Stachniak et al., 2014) serait particulièrement pertinente pour confirmer l'implication de cette structure au sein de cette voie.

III. Une progression de l'hypodopaminergie de la voie mésolimbique à la voie nigrostriée ?

A. *Origine de l'hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée*

Afin d'analyser les niveaux de DA dans le NAc, le DMS et le DLS en fonction de l'expression, ou non, du comportement compulsif associé à l'alcool, nous avons initialement planifié une expérience de microdialyse. Cette expérience devait permettre une analyse quantitative des niveaux de DA présents dans le milieu extracellulaire chez l'animal anesthésié et, par conséquent, donner une vue précise de la neurotransmission DA au sein des différents territoires du striatum (Rusheen et al., 2020). Des difficultés techniques nous ont, cependant, contraints à abandonner cette expérience. Les animaux ayant été sacrifiés à la fin de l'expérience de microdialyse, nous avons choisi d'évaluer les quantités tissulaires de DA

(intracellulaire et extracellulaire) par une technique ELISA que j'ai mis en place et validé au laboratoire (Sabti et al., 2019; Seminerio et al., 2013). Si l'analyse des quantités de DA tissulaire n'a pas permis de distinguer les effets présents au niveau extracellulaire et les effets présents au niveau intracellulaire, les résultats obtenus suggèrent une modification profonde de la fonction DA. En effet, la baisse de DA mesurée dans notre approche ne peut être imputée uniquement à une baisse de la libération extracellulaire de DA puisque la quantité totale de DA diminue, mais semble plutôt indiquer une diminution de la synthèse et/ou une augmentation de la dégradation de la DA. Dans cette optique, différentes études ont montré que l'exposition chronique à l'alcool (Kashem et al., 2012; Pohorecky and Newman, 1977; Siciliano et al., 2017), ou à d'autres drogues d'abus (Imperato et al., 1996; Trulson and Ullissey, 1987), induisait au cours du sevrage une diminution la synthèse de DA. Au niveau protéique, cette baisse de synthèse de DA était notamment associée à une baisse de l'expression de la TH et d'un coenzyme de synthèse de la DA (Kashem et al., 2012; Rothblat et al., 2001). Des travaux ont également démontré que l'exposition répétée à l'alcool pouvait conduire à une hausse de l'expression de la MAO, une enzyme importante dans la dégradation de la dopamine, au niveau préfrontal (Matthews et al., 2018). Cette hausse d'activité n'a cependant pas été retrouvée au niveau du striatum dans cette étude. Afin de compléter notre étude, nous avons également planifié des expériences de western blot visant à évaluer le niveau d'expression de protéines importantes dans la fonction DA dans nos différents groupes d'animaux. Nous souhaitons ainsi mesurer le niveau d'expression de la TH, du transporteur de recapture de la DA (DAT), de la catéchol-O-méthyltransférase qui permet la dégradation de la DA, et enfin de VMAT2, une protéine permettant l'entrée de DA dans les vésicules présynaptiques. Cependant, le dosage préalablement réalisé par la technique ELISA a nécessité une préparation particulière avec nos échantillons, et les résultats obtenus dans les expériences de western blot n'ont pas été exploitables. Finalement, nous pouvons également nous interroger sur l'origine de l'hypodopaminergie mise en évidence au niveau de la voie DA nigrostriée. En effet, l'altération DA pourrait être induite directement par les intoxications répétées à l'alcool. L'alcool induisant un effet beaucoup moins important sur les neurones DA de la SNc, l'altération pourrait mettre plus longtemps à apparaître (Rothblat et al., 2001). L'altération pourrait également se développer au niveau des neurones DA de la VTA et se propager de proche en proche aux neurones DA de la SNc par l'intermédiaire des connexions spiralées avec le striatum (Belin and Everitt, 2008; Haber, 2008; Haber et al., 2000).

B. Implication de la voie DA nigrostriée dans les processus motivationnels et émotionnels

Les résultats obtenus au cours des expériences s'intéressant à l'implication de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés et affectifs apportent également un éclairage nouveau sur le rôle de cette voie, et permettent d'affiner les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire (Carnicella et al., 2014a; Drui et al., 2014; Favier et al., 2017, 2014; Magnard et al., 2016).

L'induction d'une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée a, tout d'abord, mené à l'apparition de déficits motivationnels. Ce résultat, en adéquation avec les observations réalisées dans notre équipe, renforce l'hypothèse de l'existence de plusieurs motivations, dont celle de l'action, qui impliquerait la voie DA nigrostriée et le DLS, et qui serait fondamentale pour énergiser le comportement (État de l'art – Partie 2, III, D – p.59). Ce phénomène peut également être replacé dans le cadre des mécanismes allostatiques proposés pour expliquer le développement des addictions (Koob and Le Moal, 2005). En effet, nous avons observé qu'un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée apparaissait au cours du sevrage, chez les animaux exprimant un comportement compulsif associé à l'alcool. En lien avec l'implication de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés, l'émergence de cet état pourrait directement contribuer aux déficits motivationnels observés au cours du sevrage. Il est cependant nécessaire de rester prudent dans l'interprétation de ce résultat, car nous n'avons pas étudié l'état motivationnel des animaux au cours du sevrage à l'alcool. Nous ne pouvons donc confirmer que l'hypodopaminergie de la voie nigrostriée révélée chez ces animaux ait conduit à l'apparition d'un état motivationnel altéré.

Si notre étude a permis de vérifier l'importance de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés, nous n'avons pu confirmer l'implication de cette voie dans les comportements affectifs. En effet, l'hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée n'a pas conduit à l'expression des comportements de type anxieux ou dépressif précédemment observés par notre laboratoire, à la suite d'une lésion bilatérale des neurones DA de la SNc (Carnicella et al., 2014a; Drui et al., 2014). Afin d'expliquer la divergence de ces résultats, deux

possibilités peuvent être envisagées en comparant les approches expérimentales utilisées. L'hypodopaminergie induite par notre approche de chémogénétique pourrait, premièrement, ne pas être assez importante pour induire un état émotionnel négatif chez les animaux. En effet, notre approche a conduit à la réduction de 30% des niveaux de DA au sein du DLS, et ce de façon transitoire, alors que l'approche expérimentale utilisée précédemment par notre équipe induisait une diminution permanente de l'ordre de 70% des niveaux de DA dans cette structure (Druil et al., 2014; Favier et al., 2014). L'existence d'un seuil à partir duquel ces altérations apparaissent expliquerait pourquoi nous n'avons pas réussi à les observer dans le cadre de notre étude. Une explication alternative pourrait être l'absence d'implication directe de cette voie dans les comportements de type anxieux et dépressif. À ce titre, il est possible que la perte irréversible des neurones DA, induite avec la neurotoxine 6-OHDA, ait abouti à l'apparition de mécanismes de compensation ou de dérégulation d'autres systèmes de neurotransmission cruciaux dans le maintien de l'état émotionnel de l'individu, tels que les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques (Baldwin and Rudge, 1995; Blier and Mansari, 2007; Carhart-Harris and Nutt, 2017; Magnard et al., 2016; McCall et al., 2015; Nutt, 2002). Au cours de notre étude, la manipulation sélective et transitoire de la voie DA nigrostriée par chémogénétique a permis de mieux isoler le rôle de cette voie et a fortement limité le risque d'altérer ces systèmes. L'utilisation d'une approche permettant une inhibition réversible mais plus importante de la voie DA nigrostriée, permettrait de conclure quant à l'implication directe, ou non, de cette voie dans les fonctions affectives.

C. Implication de la voie DA nigrostriée dans l'usage compulsif d'alcool.

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral démontrent, pour la première fois, l'implication causale de l'état hypodopaminergique de la voie DA nigrostriée dans l'usage compulsif d'alcool, l'hypothèse de l'allostasie ayant été finalement extrêmement peu considérée au sein de ce système. Nos travaux renforcent également l'implication des mécanismes allostatiques du système dopaminergique dans les phases les plus sévères de la pathologie (Koob, 2021). En effet, si l'hypodopaminergie de la voie DA mésolimbique avait déjà été causalement impliquée dans les phénomènes de consommation excessive d'alcool (Barak et al., 2011), l'implication causale d'un état hypodopaminergique dans la compulsivité, dimension fondamentale de l'addiction (Yücel et al., 2019), restait à démontrer.

En adéquation avec une vision intégrative de l'addiction proposée dans cette thèse (État de l'art – Partie 3, IV – p.93), nos résultats rappellent l'importance de considérer l'état DA tonique et le signal DA phasique comme un ensemble fonctionnel permettant la régulation des comportements motivés (Floresco et al., 2003; Grace, 2000). Dans les phases précoces de la pathologie, l'état hypodopaminergique de la voie DA mésolimbique conduirait à l'émergence des signaux DA extrêmement saillants dans le NAc, responsables des mécanismes favorisant le développement de la consommation excessive d'alcool, comme un RPE aberrant et la sensibilisation incitative (Berridge and Robinson, 2016; Keiflin and Janak, 2015). Les études d'optogénétique modulant les activités DA tonique et phasique ont, par ailleurs, déjà renforcé cette hypothèse en démontrant que l'augmentation du ratio tonique/phasique promouvait la consommation excessive d'alcool, alors que la réduction de ce ratio l'inhibait (Bass et al., 2013; Budygin et al., 2020). Dans les phases les plus sévères de la pathologie, l'état hypodopaminergique tonique de la voie DA nigrostriée conduirait directement à l'émergence de signaux DA extrêmement saillants dans le DLS, et favoriserait la formation des « habitudes incitatives » (Belin et al., 2013; Floresco et al., 2003). L'émergence de ces signaux pourrait également expliquer pourquoi les rats qui recherchent l'alcool de manière compulsive sont incapables de « désengager » le DLS malgré l'apparition d'une conséquence négative, et pourquoi ce comportement de recherche reste sous la dépendance de la DA dans cette structure (Giuliano et al., 2019). En effet, la baisse du tonus basal pourrait conduire à l'émergence de signaux phasiques tellement saillants, qu'il serait alors impossible de ne pas les intégrer (Floresco et al., 2003; Grace, 2016; McCutcheon et al., 2019; Salinas et al., 2021). A cet égard, l'utilisation d'un antagoniste aux récepteurs DA, annihilant les signaux DA phasiques, permet de diminuer le comportement de recherche compulsif d'alcool (Giuliano et al., 2019).

Nos résultats permettent également de mieux appréhender le rôle des voies DA mésolimbique et nigrostriée dans le contexte du modèle « acteur – critique » étendu aux addictions. Dans ce modèle, le découplage entre le NAc, système « critique », et le DLS, système « acteur », est depuis longtemps proposé pour expliquer l'émergence des comportements addictifs (Keiflin and Janak, 2015; Keramati and Gutkin, 2013; Mollick and Kober, 2020; Takahashi et al., 2009). A ce titre, le système « critique » a reçu une grande

attention, et de nombreuses études ont démontré l'implication de la voie DA mésolimbique et du NAc dans les phases précoces de l'alcoolodépendance (Barak et al., 2011; Takahashi et al., 2007; Willuhn et al., 2012). Le système « acteur » a, quant à lui, longtemps été considéré comme un simple effecteur comportemental, dysfonctionnant du fait des altérations présentes au sein du système « critique » (Takahashi et al., 2009). Nos résultats, renforcés par d'autres études comportementales, ont cependant mis en évidence l'implication directe de la voie DA nigrostriée et du DLS dans l'usage compulsif d'alcool (Giuliano et al., 2021, 2019; Vollstädt-Klein et al., 2010). Dès lors, dans les phases tardives de l'addiction, deux possibilités peuvent être envisagées par l'intermédiaire du modèle « acteur – critique ». Il est premièrement envisageable que l'altération du système « critique » se soit propagée au niveau du système « acteur », et que ces deux systèmes dysfonctionnent de concert. Une seconde explication pourrait être que l'altération du système « critique » soit réversible dans le temps, mais que le système « acteur » continue à dysfonctionner en court-circuitant le système « critique », et en n'intégrant plus les évaluations des comportements réalisés même si ces dernières sont présentes.

D. L'hypodopaminergie de la voie mésolimbique est-elle réversible ?

Au cours de notre étude, nous n'avons observé aucune différence dans les niveaux de DA mesurés au niveau du NAc et du DMS entre nos différents groupes. Nous n'avons pas, non plus, observé de corrélation entre les quantités d'alcool consommées au cours des différentes procédures expérimentales et les niveaux de DA dans ces deux structures. La similitude des niveaux de DA, entre les animaux exposés à l'alcool et les animaux non-exposés, peut paraître surprenante à la lumière des travaux démontrant l'apparition d'un état hypodopaminergique au sein de la voie DA mésolimbique, au cours du sevrage aigu, suite à la consommation répétée de forte quantités d'alcool (Barak et al., 2011; Weiss et al., 1996). Afin d'expliquer cette différence, il est important de reconsidérer la technique utilisée et le décours temporel de notre expérience. Premièrement, en comparaison des travaux susmentionnés qui ont analysé les quantités de DA extracellulaire, nous avons étudié les quantités de DA tissulaire, révélant seulement les neuro-adaptations les plus profondes du système DA (voir ci-dessus). Deuxièmement, dans notre étude, les niveaux de DA n'ont pas été mesurés à la suite de l'escalade de la consommation d'alcool, mais une semaine après la dernière session d'auto-

administration. Au cours de ces sessions, les quantités d'alcools consommées étaient moins importantes que lors de la procédure d'accès intermittent à l'alcool, car la durée d'exposition était réduite (respectivement 0,8 g/kg pendant 30 minutes contre 4 g/kg pendant les 24h d'accès aux bouteilles). Il est donc possible que l'état d'hypodopaminergie décrit dans la littérature, ait été présent à la fin de la période de forte consommation d'alcool, mais que la baisse de la consommation au cours des mois d'auto-administration et la semaine de sevrage ait permis de rétablir des niveaux normaux de DA. Cela soutiendrait l'hypothèse selon laquelle l'hypodopaminergie de la voie DA mésolimbique est réversible au cours du temps et que cet état allostatique n'est pas à l'origine des altérations motivationnelles et émotionnelles observées au cours d'une abstinence prolongée (Hansson et al., 2019; Hirth et al., 2016; Samaha et al., 2021; Solinas et al., 2019). En effet, si le système DA a la possibilité de dévier d'un état homéostatique vers un état allostatique, il est également concevable que ce système puisse évoluer dans le sens opposé après une période plus ou moins longue d'abstinence. Cette hypothèse restant à approfondir, il serait particulièrement intéressant de mesurer l'état du tonus DA de la voie mésolimbique, mais également de la voie nigrostriée, à la fin de chaque procédure expérimentale afin de mieux caractériser les dynamiques propres à ces deux systèmes.

IV. Perspectives

A. Perspectives mécanistiques

Au cours de nos expériences, le DREADD inhibiteur hM4Di a été utilisé afin de mimer l'altération DA du DLS observée chez les animaux exprimant un comportement compulsif associé à l'alcool. Cette approche nous a permis d'observer les conséquences potentielles de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée au niveau motivationnel et émotionnel, mais également d'établir un lien causal entre cet état et le développement d'un comportement compulsif pour la drogue. Sur la base de ces résultats, il serait intéressant de vérifier que la suppression de l'état allostatique observé au niveau de la voie DA nigrostriée chez les animaux présentant un comportement compulsif associé à l'alcool, permet de supprimer ce comportement. Pour ce faire, après sélection des animaux compulsifs, nous pourrions utiliser le DREADDs excitateur hM3Dq afin d'augmenter l'activité des neurones DA de la SNc et normaliser le tonus DA (Armbruster et al., 2007; Boekhoudt et al., 2016b, 2016a).

Nous avons largement mis en avant l'importance de la balance tonique/phasique dans le développement de l'addiction. En s'inspirant des travaux réalisés par le laboratoire de Weiner, une perspective fondamentale serait d'étudier l'influence des signaux DA toniques et phasiques de la voie nigrostriée sur les comportements compulsifs associés à l'alcool (Bass et al., 2013; Budygin et al., 2020). Nos résultats apportent une première réponse concernant l'importance du tonus DA, mais la conséquence de cet état hypodopaminergique tonique sur les signaux DA phasiques reste à déterminer. Dans cette optique, des études utilisant la voltamétrie cyclique rapide permettraient de vérifier que l'état hypodopaminergique décrit au niveau de la voie nigrostriée conduit bien à l'augmentation des signaux DA phasique générés dans le DLS en réponse à la drogue ou des stimuli associés (Covey et al., 2014). Enfin, l'utilisation d'approches d'optogénétique au niveau de cette voie permettrait également d'isoler l'influence du signal DA phasique sur l'usage compulsif d'alcool. À ce titre, il serait intéressant d'observer l'effet d'une augmentation de l'activité DA phasique chez des animaux non-compulsifs, ou d'une inhibition chez les animaux compulsifs, afin de caractériser avec une plus grande précision l'importance des signaux DA phasiques dans l'expression de la compulsivité.

B. Perspectives thérapeutiques

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ouvrent de nouvelles pistes d'études pour lutter contre l'usage compulsif d'alcool chez les individus souffrant d'alcoolodépendance. En effet, l'implication causale de l'hypodopaminergie de la voie nigrostriée dans l'expression des comportements compulsifs pour l'alcool suggère que l'utilisation d'une approche thérapeutique normalisant le tonus DA permettrait de supprimer, ou de limiter, l'apparition de ce comportement pathologique.

Cette hypothèse reste à confirmer, mais des études précliniques ont déjà démontré que la normalisation du tonus DA de la voie mésolimbique par infusion intra-ATV de GDNF, permettait de diminuer la motivation pour obtenir de l'alcool, la valeur appétitive associée à la drogue, le risque de rechute, et les épisodes de consommation excessive (Barak et al., 2011; Carnicella et al., 2009a, 2008a). Un autre composé, l'OSU-6162, qui permet de normaliser le

tonus DA, a également été utilisé dans le cadre de l'alcoolodépendance (Feltmann et al., 2016; Steensland et al., 2012). Si les mécanismes exacts sous-tendant l'effet de ce composé sur le système DA restent à élucider²², des études précliniques ont démontré que l'injection sous-cutanée d'OSU-6162 permettait d'obtenir des effets comportementaux similaires au GDNF et également de limiter le développement des comportements de type-anxieux durant le sevrage aigu (Feltmann et al., 2016; Fredriksson et al., 2019; Melas et al., 2021; Steensland et al., 2012). Des études préliminaires réalisées avec des patients alcoolodépendants semblent également indiquer que l'OSU-6162 réduit l'envie et le plaisir associés à la consommation d'alcool, et améliore les fonctions cognitives (Khemiri et al., 2020, 2015).

Il faut noter, cependant, que l'efficacité de ce composé n'a jamais été évaluée sur des symptômes ou des comportements se rapportant aux phases les plus sévères de l'alcoolodépendance. Notre laboratoire a donc débuté une expérience comportementale visant à déterminer l'efficacité de ce composé sur l'usage compulsif d'alcool. Cela permettra de déterminer si la normalisation du tonus DA de la voie nigrostriée, par l'OSU-6162, permet de supprimer le comportement compulsif associé à l'alcool chez nos animaux, et de déterminer si ce composé peut être adapté aux phases les plus sévères de la pathologie.

²² L'OSU-6162, décrit comme un stabilisateur monoaminergique, pourrait agir comme un antagoniste ou un agoniste partiel des récepteurs D2, D3 et 5-HTA (Burstein et al., 2011; Carlsson et al., 2011). Ce composé permet la normalisation du tonus DA à partir d'un état hyperdopaminergique ou d'un état hypodopaminergique (Feltmann et al., 2016; Steensland et al., 2012).

CONCLUSION

Après plus de 40 ans de recherche sur le rôle de la DA dans l'addiction, ce neurotransmetteur est sans doute l'un des plus largement décrits dans le domaine. Pourtant, la DA est également l'un des neurotransmetteurs dont la contribution exacte reste encore la moins comprise. Symbole de ce manque de compréhension, aucun traitement efficace consacré à la DA n'a encore été développé à ce jour en addictologie. Une pièce importante au puzzle complexe de l'addiction semblait manquer, la voie DA nigrostriée. En effet, la majorité des études s'intéressant au rôle de la DA dans les addictions s'était focalisée sur la voie DA mésolimbique en raison de son rôle évident dans les processus motivationnels, en négligeant la voie nigrostriée, plus étudiée alors dans les processus moteurs. Il a fallu attendre ces deux dernières décennies pour que l'attention commence à se porter sur ce système et que l'on commence à comprendre comment il pouvait jouer un rôle pivot dans les addictions.

Les travaux réalisés dans le cadre de mon doctorat avaient donc pour objectif de mieux comprendre le rôle de la voie DA nigrostriée dans les comportements motivés et l'alcoolodépendance. Nos études comportementales, réalisées sous le prisme de la compulsivité, dimension fondamentale des addictions, ont permis de mettre en évidence l'apparition d'un **état allostatique de la voie DA nigrostriée, caractérisé par une diminution profonde du tonus DA, chez les animaux exprimant un comportement compulsif pour l'alcool**. Afin d'étudier les conséquences psychobiologiques de cet état hypodopaminergique, nous avons expérimentalement réduit le tonus DA de la voie DA nigrostriée. Chez des animaux non-exposés à l'alcool, **l'hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée a induit des déficits motivationnels** similaire au symptôme d'apathie observé pendant le sevrage chez l'individu alcoolodépendant. Enfin, chez des animaux exposés à l'alcool, **l'hypodopaminergie de la voie DA nigrostriée a conduit à l'émergence de comportements compulsifs chez des animaux n'ayant pas initialement développé ce comportement**.

Finalement, ce travail doctoral aura permis, avec l'ensemble des forces et des faiblesses qui lui sont associés, de mettre en évidence **l'implication majeure de l'état hypodopaminergique de la voie DA nigrostriée dans l'usage compulsif d'alcool et sa potentielle implication dans les déficits motivationnels observés lors du sevrage**. Bien que la route soit encore longue et sinueuse en vue de développer un traitement dédié à la normalisation de la fonction DA en addictologie, ce travail doctoral apporte de nouvelles

perspectives qui permettront de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'origine de l'usage compulsif de drogue.

ANNEXE

Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.

Au cours de mon doctorat, j'ai également réalisé une étude satellite en collaboration avec David Mallet, également doctorant dans l'équipe et possédant des compétences avancées dans les approches métabolomiques. Ces approches consistent à étudier de manière globale et sans *a priori* les dérégulations du métabolisme et sont de plus en plus utilisées en vue de développer des biomarqueurs diagnostique ou pronostique de différentes pathologies (Q. Yang et al., 2019; Z. Yang et al., 2019).

Nous avons tiré profit de l'approche expérimentale réalisée sur les rats sauvages exposés à l'alcool (Approches expérimentales principales – p.101), afin de déterminer s'il était possible de déterminer un biomarqueur sanguin permettant de détecter les animaux susceptibles de développer un comportement compulsif associé à l'usage d'alcool. Des prises de sang ont ainsi été réalisées à la suite de la procédure d'accès intermittent à l'alcool, puis après une semaine de sevrage et, finalement, à la fin de l'expérience d'auto-administration couplée aux chocs électriques. Ces échantillons sanguins ont ensuite été préparés afin d'isoler le sérum et les échantillons sériques ont été analysés en utilisant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (Beckonert et al., 2007).

Ces analyses ont permis de mettre en évidence des dérégulations spécifiques conduisant à la construction d'un biomarqueur composite sur la base de 5 métabolites (créatine, glycine, acétoacétate, tyrosine, arginine). De façon intéressante, ce biomarqueur permet la détection, dès la phase de sevrage, des animaux susceptibles de développer un comportement compulsif parmi des « consommateurs excessifs ». Le manuscrit étant en début de préparation, je ne présenterai que l'abstract et les figures légendées.

Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.

Authors: R. Goutaudier*, D. Mallet*, M. Bartolomucci, S. Boulet, S. Carnicella

Affiliations:

¹Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

*Corresponding author. Email: raphael.goutaudier@univ-grenoble-alpes.fr and david.mallet@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract:

Background: Alcohol use disorder (AUD) is a chronic relapsing disorder characterized by compulsive seeking and drinking of high amount of alcohol, despite negative consequences. While most individuals seek and take alcohol in a recreational way, a small proportion of individuals develop AUD. These individuals remain extremely difficult to identify prior the appearance of severe negative consequences. Therefore, a better detection of these patients, early during withdrawal, would allow a faster care, with a greater efficiency and with a much higher chance of success. In this preclinical study, we have investigated potential metabolomic changes during withdrawal associated with compulsive alcohol-related behavior.

Methods: Rats were train to consume high level of alcohol in an intermittent-access two-bottle-choice drinking paradigm. They were then submitted to a withdrawal period of one week. Thereafter, rats were train to seek and take alcohol in an operant ethanol self-administration task. At the end of the training, lever presses were coupled to intermittent footshocks to identify rats that compulsively use alcohol despite negative consequences. At the end of each phase, we investigated serum samples using NMR-based metabolomics and data were submitted to advanced multivariate statistics.

Results: Comparison of metabolic profile of compulsive, non-compulsive and animals that were not exposed to alcohol during withdrawal highlighted significant serum metabolic differences between each population. Importantly, based on these data, we were able to build a composite biomarker with a combination of 5 metabolites (Creatine, Glycine, Acetoacetate, Tyrosine, Arginine), which allowed to detect rats that will develop compulsivity from others with an accuracy higher than 87%.

Conclusion: From this preclinical study, we propose a promising composite biomarker to identify, early in withdrawal, individuals at risk to develop compulsive alcohol-related behavior.

Results

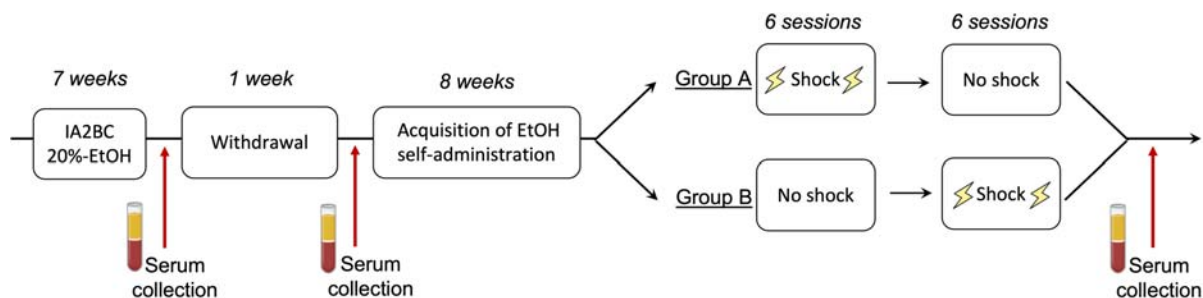


Figure 1: Experimental timeline and design.

After 7 weeks of intermittent-access 20%-Ethanol two-bottle-choice drinking (*IA2BC 20%-EtOH*), 21 *Long-Evans* rats underwent 1 week of withdrawal. Rats were then trained for 8 weeks in an operant ethanol self-administration task under a fixed ratio (FR3 – 30 minutes). At the end of the training, identification of rats expressing compulsive alcohol-related behavior was achieved by coupling lever presses with intermittent footshocks (1 footshock/8 presses, 0,25 mA). At this stage, rats were divided into two groups (A and B) to ensure that any decrease in performance was the result of shock and not the effect of time. Rats of the group A were therefore shocked during the first six days (*Shock*) followed by 6 days without shock (*No Shock*). For the group B, tests were carried out in opposite orders. A control group, composed of 8 *Long-Evans* rats, was also constituted. These animals were kept under the same conditions but were never exposed to alcohol. Serum samples were collected after the end of the *IA2BC 20%-EtOH*, after a week of withdrawal and after the last session of punishment. To avoid possible residual pharmacological effect of alcohol or effect of the punishment, samples were collected 24h post-sessions.

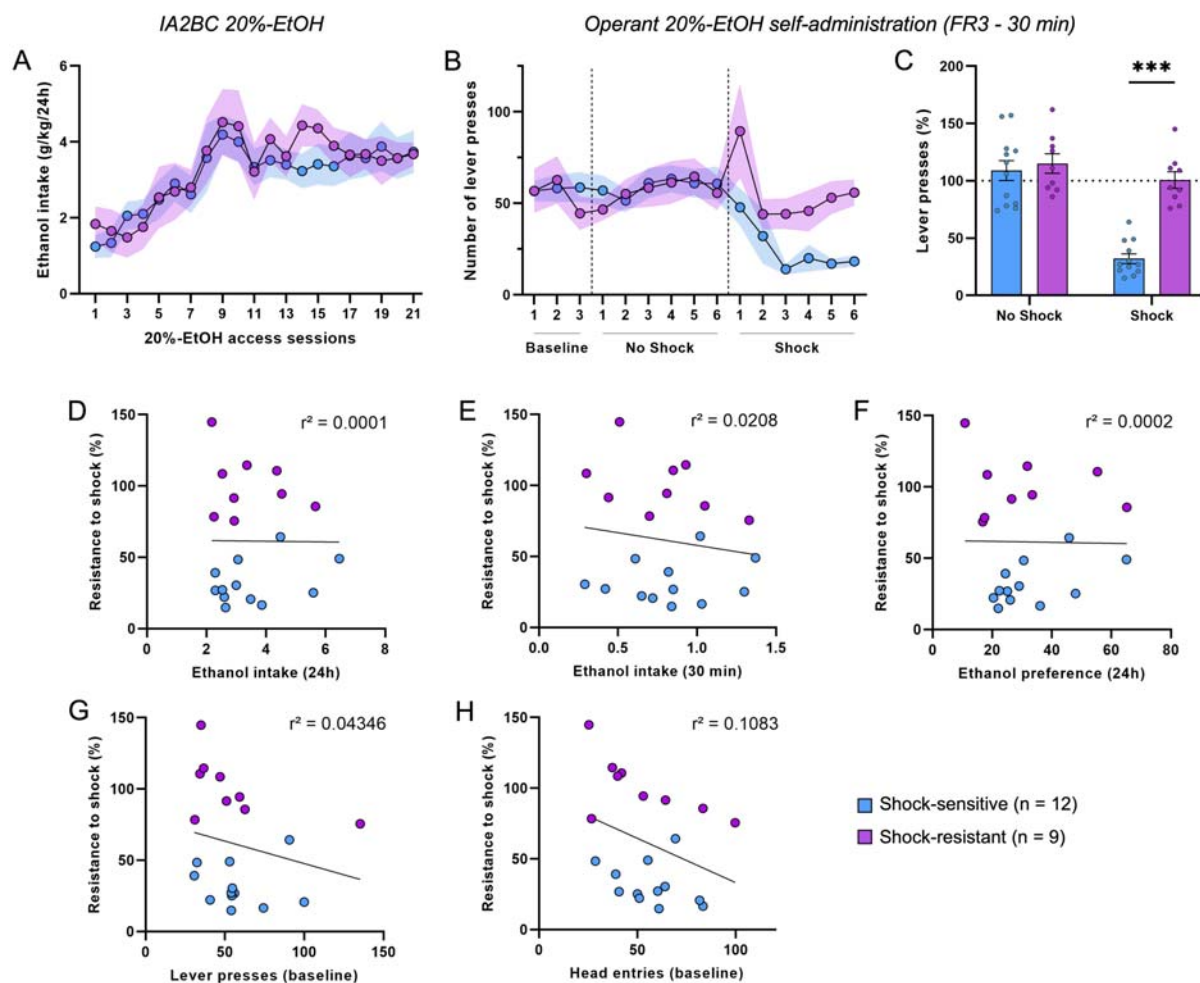


Figure 2: Determination of shock-sensitive and shock-resistant animals and relation to their respective alcohol-related behaviors.

(A) Ethanol intake during the *IA2BC 20%-EtOH*. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [$F_{(20, 380)} = 7.82, P < 0.001$] but no differences between shock-sensitive and shock-resistant animals [$F_{(1,19)} = 0.13, P = 0.72$] nor interaction between both factors [$F_{(20, 380)} = 0.47, P = 0.98$]. **(B)** Number of lever presses in 30 minutes for a 20% ethanol solution during 3 days of baseline, during the 6 “no-shock” sessions and during the 6 “shock” sessions. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [$F_{(14, 266)} = 5.35, P < 0.001$], no differences between sensitive and resistant animals [$F_{(1, 19)} = 1.63, P = 0.22$], but an interaction between both factors [$F_{(14, 266)} = 2.86, P < 0.001$]. **(C)** Mean lever presses during the 3 last “No-Shock” sessions and the 3 last “Shock” sessions normalized to the last 3 days of baseline. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [$F_{(1, 19)} = 44.67, P < 0.001$], a significant difference between shock-sensitive and shock-resistant animals [$F_{(1, 19)} = 22.25, P < 0.001$], and

an interaction between both factors [$F_{(1, 19)} = 20.89, P < 0.001$]. **(D-F)** Correlation between ethanol intake in the first 30 minutes **(D)**, ethanol intake in 24 hours **(E)** or the ethanol preference in 24 hours **(F)** over the 3 last drinking session in *IA2BC EtOH 20%* and the resistance to shock (expressed as percentage of lever presses change during the 3 last “Shock” sessions compared to baseline) ($r^2s < 0.0208, Ps > 0.53$). **(G-H)** Correlation between the number of lever presses **(G)** or head entries **(H)** during the baseline and the resistance to shock ($r^2s < 0.1083, Ps > 0.15$). Shock-sensitive (blue, $n = 12$) and shock resistant-rats (purple, $n = 9$) were discriminated based on their resistance to shock. The cut-off point to be considered as shock-resistant was set at 70%. Data are expressed in mean \pm SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: ***, $P < 0.001$.

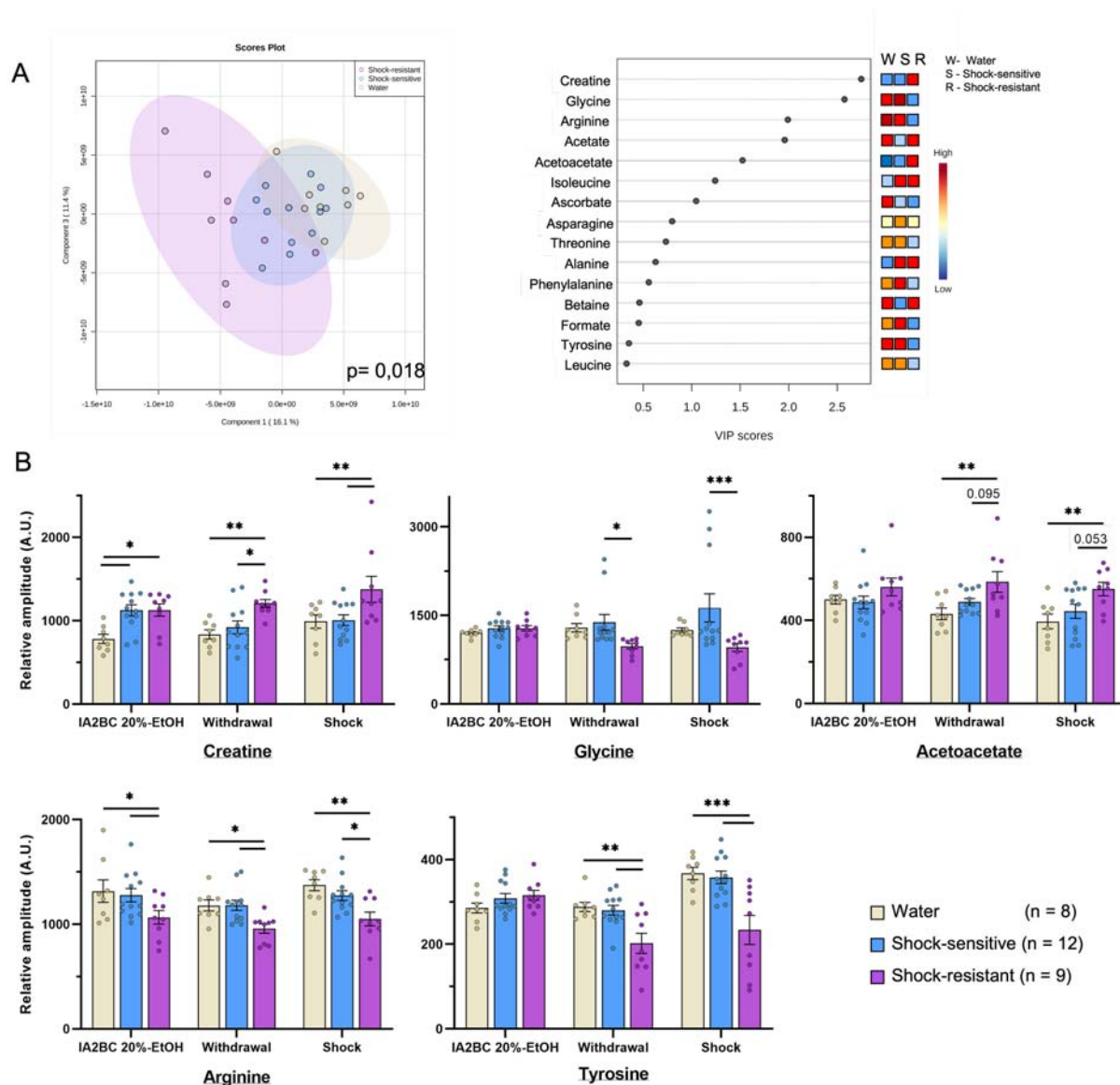
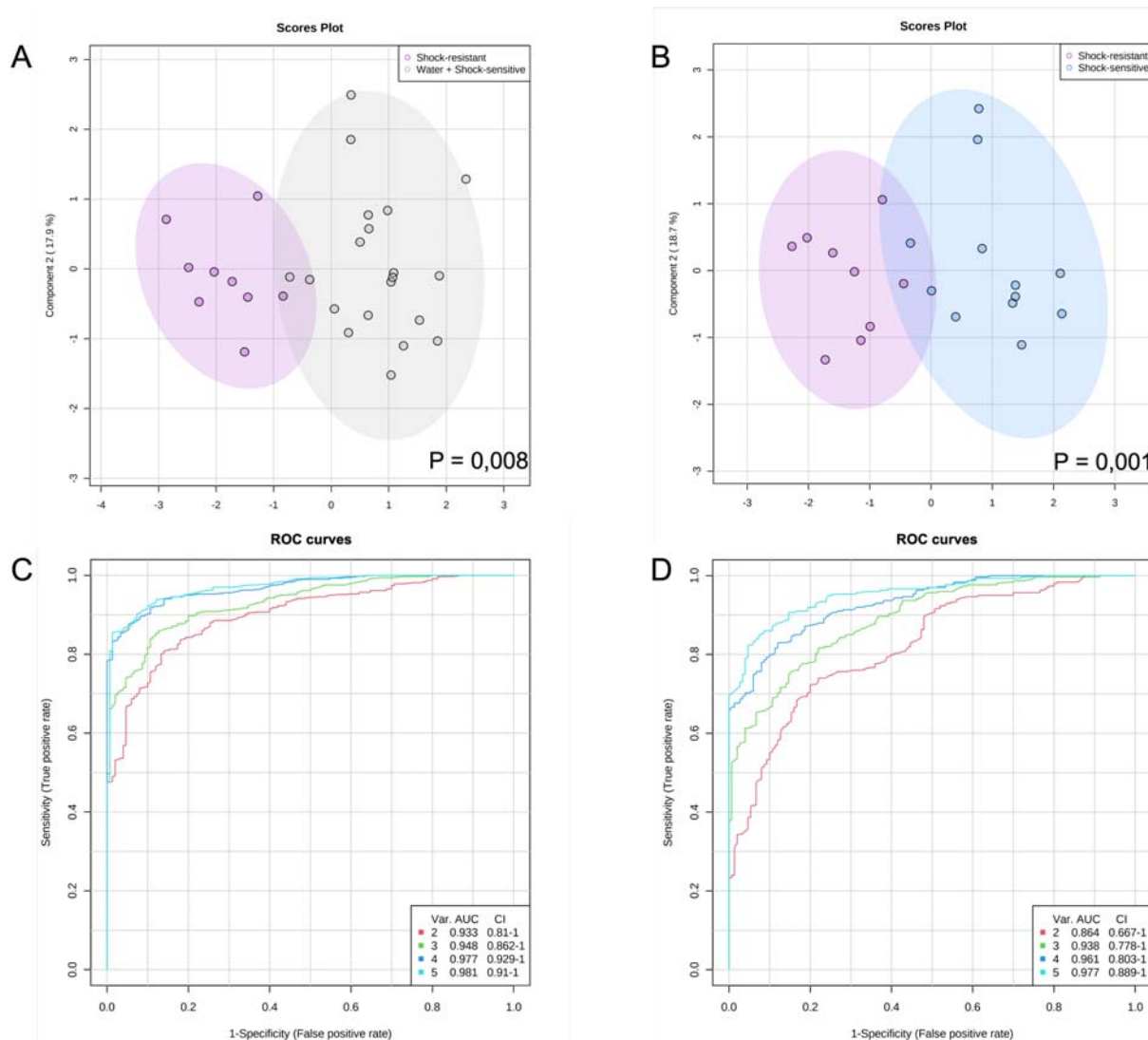


Figure 3: Longitudinal serum ^1H -RMN analysis highlighted withdrawal metabolic dysregulation associated with shock-resistant animals

(A) The Scores plot (left) and its respective VIP plot (right) highlighting the TOP-15 metabolites responsible for the separation. A separation was observed between the three groups especially for shock-resistant (purple, $n = 9$) compared to shock-sensitive (blue, $n = 12$), and water (gray, $n = 8$) rats. Following permutation testing (2000 repeats), the PLS-DA model produced a p -value = 0.018, indicating that the observed separation is significant and not due to overfitting. Additionally, following a 10-fold cross validation of the model, factors assessing the goodness of the fit, $R^2Y = 0.87$, and the predictability of the model, $Q^2 = 0.46$, were determined. **(B)** Longitudinal relative amplitude of serum metabolites illustrating the best predictive metabolites (Creatine, Glycine, Acetoacetate and Arginine) and a metabolite

presented an attractive dysregulation (Tyrosine) in order to detect shock-resistant animals compared to others during withdrawal. Creatine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [$F_{(2, 26)} = 14.64, P < 0.001$], but no effect of time nor interaction [$F_s < 2.32, P_s > 0.11$]. Glycine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [$F_{(2, 26)} = 7.17, P < 0.01$], but no effect of time nor interaction [$F_s < 2.25, P_s > 0.08$]. Acetoacetate: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [$F_{(2, 26)} = 11.69, P < 0.001$], but no effect of time nor interaction [$F_s < 1.86, P_s > 0.16$]. Arginine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [$F_{(2, 26)} = 12.47, P < 0.001$], of the time [$F_{(2, 52)} = 4.14, P < 0.05$] but no interaction [$F_{(4, 52)} = 0.23, P = 0.92$]. Tyrosine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group, of the time and an interaction between both factors [$F_s > 6.26, P_s < 0.001$]. Serum samples were collected 24h-after the end of the *IA2BC 20%-EtOH*, after a week of withdrawal and 24h-after the last session of punishment Serum samples were analyzed by untargeted metabolomics using $^1\text{H-NMR}$. Prior to multivariate analyses, all data were normalized to the sum and mean centered. Data were analyzed using principal components analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). Data are expressed in mean \pm SEM. Tuckey multiples comparison post-hoc analysis: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ ***, $P < 0.001$.



Carlo cross validation (MCCV) using balanced subsampling. In each MCCV, 2/3 of samples were used to evaluate feature importance, and the remaining 1/3 was used to validate the models created at the first step. To calculate performance and confidence intervals of each model MCCV was repeated several times. Five biomarker models were created using a linear support vector machine (SVM) with different numbers of metabolites. ROC curves were generated using the predicted class probabilities from repeated cross validation for each model. Metabolite numbers, area under the curve (AUC) and the 95% confidence interval of the four models are indicated in the panel (*bottom right*). In general, an AUC of 0.5 suggests no diagnostic ability, 0.7 to 0.8 is considered acceptable, 0.8 to 0.9 is considered excellent, and more than 0.9 is considered outstanding (Hosmer and Lemeshow, 2000; Mandrekar, 2010).

References

Hosmer DW, Lemeshow S (2000) Applied Logistic Regression. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Mandrekar JN (2010) Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology* 5:1315–1316.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aberman JE, Salamone J (1999) Interference With Accumbens Dopamine Transmission Makes Rats More Sensitive To Work Requirements But Does Not Impair Primary Food Reinforcement. *Behavioural Pharmacology* 10:579.
- Abraham KP, Salinas AG, Lovinger DM (2017) Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 96:1223–1238.
- Aguiar L, Peoples R, Yeh H, Yevenes G (2005) GABA-A Receptors as Molecular Sites of Ethanol Action. Direct or Indirect Actions? *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2:869–885.
- Ahmed SH (2004) Addiction as compulsive reward prediction. *Science* 306:1901–1902.
- Ahmed SH, Lenoir M, Guillem K (2013) Neurobiology of addiction versus drug use driven by lack of choice. *Current Opinion in Neurobiology* 23:581–587.
- Alvestad RM, Grosshans DR, Coultrap SJ, Nakazawa T, Yamamoto T, Browning MD (2003) Tyrosine dephosphorylation and ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function. *Journal of Biological Chemistry* 278:11020–11025.
- Amaya KA, Smith KS (2018) Neurobiology of habit formation. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 20:145–152.
- American Psychiatric Association (2013) DSM-5 Diagnostic Classification In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* .
- Andén N -E, Carlsson A, Hillarp N (1964) Inhibition by 5-Hydroxytryptophan of Insulin-Induced Adrenaline Depletion. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 21:183–186.
- Appel SB, Liu Z, McElvain MA, Brodie MS (2003) Ethanol excitation of dopaminergic ventral tegmental area neurons is blocked by quinidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306:437–446.
- Aragona BJ, Day JJ, Roitman MF, Cleaveland NA, Mark Wightman R, Carelli RM (2009) Regional specificity in the real-time development of phasic dopamine transmission patterns during acquisition of a cue-cocaine association in rats. *European Journal of Neuroscience* 30:1889–1899.
- Ariwodola OJ, Weiner JL (2004) Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: Role of presynaptic GABAB receptors. *Journal of Neuroscience* 24:10679–10686.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:5163–8.
- Arroyo M, Markou A, Robbins TW, Everitt BJ (1998) Acquisition, maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration under a second-order schedule of reinforcement in rats: Effects of conditioned cues and continuous access to cocaine. *Psychopharmacology* 140:331–344.
- Ashby CR, Wang RY (1996) Pharmacological actions of the atypical antipsychotic drug clozapine: A review. *Synapse* 24:349–394.
- Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488:172–177.
- Auriacombe M, Serre F, Fatseas M (2016) Le craving : marqueur diagnostique et pronostique des addictions? *Traité d'addictologie* 78–83.

B

- Baerentzen S, Casado-Sainz A, Lange D, Shalgunov V, Tejada IM, Xiong M, L'Estrade ET, Edgar FG, Lee H, Herth MM, Palner M (2019) The chemogenetic receptor ligand Clozapine N-oxide induces in vivo neuroreceptor occupancy and reduces striatal glutamate levels. *Frontiers in Neuroscience* 13:187.
- Bailey CP, O'Callaghan MJ, Croft AP, Manley SJ, Little HJ (2001) Alterations in mesolimbic dopamine function during the abstinence period following chronic ethanol consumption. *Neuropharmacology* 41:989–999.
- Baldwin D, Rudge S (1995) The role of serotonin in depression and anxiety. *International Clinical Psychopharmacology* 9:41–46.
- Baliño P, Ledesma JC, Aragon CMG (2014) Role of CA2+/calmodulin on ethanol neurobehavioral effects. *Psychopharmacology* 231:4611–4621.
- Balleine BW, O'Doherty JP (2010) Human and rodent homologues in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48–69.
- Barak S, Carnicella S, Yowell Q v., Ron D (2011) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Reverses Alcohol-Induced Allostasis of the Mesolimbic Dopaminergic System: Implications for Alcohol Reward and Seeking. *Journal of Neuroscience* 31:9885–9894.
- Barto AG (1995) Adaptive Critics and the Basal Ganglia In: *Models of Information Processing in the Basal Ganglia*, The MIT Press.
- Bass CE, Grinevich VP, Gioia D, Day-Brown JD, Bonin KD, Stuber GD, Weiner JL, Budygin EA (2013) Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:1–10.
- Bayer HM, Glimcher PW (2005) Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron*.
- Becker HC (2017) Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking. *Neuropharmacology*.
- Becker HC (2014) Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse, Error. ed, *Neurobiology of Alcohol Dependence*. Elsevier Inc.
- Becker HC (2008) Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse In: *Alcohol Research and Health*, pp348–361. Elsevier.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2007) Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2:2692–2703.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJH (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Research* 175:191–217.
- Beier KT, Steinberg EE, Deloach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L (2015) Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 162:622–634.
- Belin D, Belin-Rauscent A, Murray JE, Everitt BJ (2013) Addiction: Failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology* 23:564–572.
- Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Everitt BJ (2011) Habit formation and compulsion. *Neuromethods* 53:337–378.
- Belin D, Everitt BJ (2008) Cocaine Seeking Habits Depend upon Dopamine-Dependent Serial Connectivity Linking the Ventral with the Dorsal Striatum. *Neuron* 57:432–441.

- Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ (2009) Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: Relevance for the understanding of addiction. *Behavioural Brain Research* 199:89–102.
- Belin-Rauscent A, Fouyssac M, Bonci A, Belin D (2016) How preclinical models evolved to resemble the diagnostic criteria of drug addiction. *Biological Psychiatry* 79:39–46.
- Bell RL, Hauser SR, McClintick J, Rahman S, Edenberg HJ, Szumlinski KK, McBride WJ (2016) Ethanol-Associated Changes in Glutamate Reward Neurocircuitry: A Minireview of Clinical and Preclinical Genetic Findings In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* .
- Beloate LN, Omrani A, Adan RA, Webb IC, Coolen LM (2016) Ventral tegmental area dopamine cell activation during male rat sexual behavior regulates neuroplasticity and D-amphetamine cross-sensitization following sex abstinence. *Journal of Neuroscience* 36:9949–9961.
- Beninger RJ (1983) The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Research Reviews* 6:173–196.
- Berke JD (2018) What does dopamine mean? *Nature Neuroscience* 21:787–793.
- Bernard C (1865) *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* par m. Claude Bernard. Baillière.
- Berridge KC (2018) Evolving concepts of emotion and motivation. *Frontiers in Psychology* 9:1–20.
- Berridge KC (2017) Is Addiction a Brain Disease? *Neuroethics* 10:29–33.
- Berridge KC (2012) From prediction error to incentive salience: Mesolimbic computation of reward motivation. *European Journal of Neuroscience*.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191:391–431.
- Berridge KC (2000) Reward learning: Reinforcement, incentives, and expectations. *Psychology of Learning and Motivation - Advances in Research and Theory* 40:223–278.
- Berridge KC, Robinson TE (2016) Liking , Wanting , and the Incentive-Sensitization Theory of Addiction 71:670–679.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* 28:309–369.
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Berridge KC, Valenstein ES (1991) What Psychological Process Mediates Feeding Evoked by Electrical Stimulation of the Lateral Hypothalamus? *Behavioral Neuroscience* 105:3–14.
- Berridge KC, Venier IL, Robinson TE (1989) Taste Reactivity Analysis of 6-Hydroxydopamine-Induced Aphagia: Implications for Arousal and Anhedonia Hypotheses of Dopamine Function. *Behavioral Neuroscience* 103:36–45.
- Bharadwaj B, Kattimani S (2013) Clinical management of alcohol withdrawal: A systematic review. *Industrial Psychiatry Journal*.
- Bickel WK, Mellis AM, Snider SE, Athamneh LN, Stein JS, Pope DA (2018) 21st century neurobehavioral theories of decision making in addiction: Review and evaluation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 164:4–21.
- Bienkowski P, Rogowski A, Korkosz A, Mierzejewski P, Radwanska K, Kaczmarek L, Bogucka-Bonikowska A, Kostowski W (2004) Time-dependent changes in alcohol-seeking behaviour during abstinence. *European Neuropsychopharmacology* 14:355–360.

- Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences* 30:194–202.
- Blier P, Mansari M el (2007) The importance of serotonin and noradrenaline in anxiety. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 11:16–23.
- Blomqvist O, Engel JA, Nissbrandt H, Söderpalm B (1993) The mesolimbic dopamine-activating properties of ethanol are antagonized by mecamylamine. *European Journal of Pharmacology* 249:207–213.
- Blomqvist O, Ericson M, Engel JA, Söderpalm B (1997) Accumbal dopamine overflow after ethanol: Localization of the antagonizing effect of mecamylamine. *European Journal of Pharmacology* 334:149–156.
- Bodhinathan K, Slesinger PA (2013) Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:18309–18314.
- Boekhoudt L, Omrani A, Luijendijk MCM, Wolterink-Donselaar IG, Wijbrans EC, van der Plasse G, Adan RAH (2016a) Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *European Neuropsychopharmacology* 26:1784–1793.
- Boekhoudt L, Roelofs TJM, de Jong JW, de Leeuw AE, Luijendijk MCM, Wolterink-Donselaar IG, van der Plasse G, Adan RAH (2017) Does activation of midbrain dopamine neurons promote or reduce feeding? *International Journal of Obesity* 41:1131–1140.
- Boekhoudt L, Voets ES, Flores-Dourojeanni JP, Luijendijk MC, Vanderschuren LJ, Adan RA (2016b) Chemogenetic Activation of Midbrain Dopamine Neurons Affects Attention, but not Impulsivity, in the Five-Choice Serial Reaction Time-Task in Rats. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 1–11.
- Boender AJ, de Jong JW, Boekhoudt L, Luijendijk MCM, van der Plasse G, Adan RAH (2014) Combined use of the canine adenovirus-2 and DREADD technology to activate specific neural pathways in vivo. *PLoS ONE* 9:1–6.
- Boggio PS, Sultani N, Fecteau S, Merabet L, Mecca T, Pascual-Leone A, Basaglia A, Fregni F (2008) Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: A double-blind, sham-controlled study. *Drug and Alcohol Dependence* 92:55–60.
- Boikov SI, Sibarov DA, Antonov SM (2020) Ethanol inhibition of NMDA receptors in calcium-dependent and -independent modes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 522:1046–1051.
- Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A (2003) Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 49:226–231.
- Boileau I, Dagher A, Leyton M, Gunn RN, Baker GB, Diksic M, Benkelfat C (2006) Modeling Sensitization to Stimulants in Humans. *Archives of General Psychiatry* 63.
- Bonaldi C, Hill C (2019) La mortalité attribuable à l'alcool en France en 2015 / alcohol-attributable mortality in France in 2015. *Beh* 97–108.
- Bonaventura J et al. (2019) High-potency ligands for DREADD imaging and activation in rodents and monkeys. *Nature communications* 10:4627.
- Bottlender M, Soyka M (2004) Impact of craving on alcohol relapse during, and 12 months following, outpatient treatment. *Alcohol and Alcoholism* 39:357–361.

- Bradberry CW (2007) Cocaine sensitization and dopamine mediation of cue effects in rodents, monkeys, and humans: Areas of agreement, disagreement, and implications for addiction. *Psychopharmacology* 191:705–717.
- Brodie MS, Pesold C, Appel SB (1999) Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23:1848–1852.
- Brousse G, Arnaud B, Vorspan F, Richard D, Dissard A, Dubois M, Pic D, Geneste J, Xavier L, Authier N, Sapin V, Llorca PM, De chazeron I, Minet-quinard R, Schmidt J (2012) Alteration of glutamate/GABA balance during acute alcohol withdrawal in emergency department: A prospective analysis. *Alcohol and Alcoholism* 47:501–508.
- Budygin EA, Bass CE, Grinevich VP, Deal AL, Bonin KD, Weiner JL (2020) Opposite Consequences of Tonic and Phasic Increases in Accumbal Dopamine on Alcohol-Seeking Behavior. *iScience* 23:100877.
- Bühler M, Mann K (2011) Alcohol and the human brain: A systematic review of different neuroimaging methods. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35:1771–1793.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4546–4550.
- Burstein ES, Carlsson ML, Owens M, Ma JN, Schiffer HH, Carlsson A, Hacksell U (2011) II. in vitro evidence that (2)-OSU6162 and (+)-OSU6162 produce their behavioral effects through 5-HT_{2A} serotonin and D₂ dopamine receptors. *Journal of Neural Transmission* 118:1523–1533.
- Byrne KA, Otto AR, Pang B, Patrick CJ, Worthy DA (2018) Substance use is associated with reduced devaluation sensitivity. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* 19:40–55.

C

- Cachope R, Cheer JF (2014) Local control of striatal dopamine release. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8.
- Camarini R, Pautassi RM (2016) Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. *Brain Research Bulletin* 125:53–78.
- Canchy L, Girardeau P, Durand A, Vouillac-Mendoza C, Ahmed SH (2020) Pharmacokinetics trumps pharmacodynamics during cocaine choice: a reconciliation with the dopamine hypothesis of addiction. *Neuropsychopharmacology* 46:288–296.
- Cannon CM, Bseikri MR (2004) Is dopamine required for natural reward? *Physiology and Behavior* 81:741–748.
- Cannon CM, Palmiter RD (2003) Reward without Dopamine. *Journal of Neuroscience* 23:10827–10831.
- Cannon W (1934) Physiological Balance in the Body. *Nature* 133:82-.
- Cantin L, Lenoir M, Augier E, Vanhille N, Dubreucq S, Serre F, Vouillac C, Ahmed SH (2010) Cocaine is low on the value ladder of rats: Possible evidence for resilience to addiction. *PLoS ONE* 5:1–14.
- Carhart-Harris RL, Nutt DJ (2017) Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *Journal of Psychopharmacology*.
- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacological reviews*.

- Carlsson ML, Burstein ES, Kloberg A, Hansson S, Schedwin A, Nilsson M, Rung JP, Carlsson A (2011) *In vivo* evidence for partial agonist effects of (2)-OSU6162 and (+)-OSU6162 on 5-HT_{2A} serotonin receptors. *Journal of Neural Transmission* 118:1511–1522.
- Carnicella S, Ahmadiantehrani S, Janak PH, Ron D (2009a) GDNF is an endogenous negative regulator of ethanol-mediated reward and of ethanol consumption after a period of abstinence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33:1012–1024.
- Carnicella S, Amamoto R, Ron D (2009b) Excessive alcohol consumption is blocked by glial cell line–derived neurotrophic factor. *Alcohol* 43:35–43.
- Carnicella S, Drui G, Boulet S, Carcenac C, Favier M, Duran T, Savasta M (2014a) Implication of dopamine D₃ receptor activation in the reversion of Parkinson’s disease-related motivational deficits. *Translational Psychiatry* 4:e401-8.
- Carnicella S, Kharazia V, Jeanblanc J, Janak PH, Ron D (2008) GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:8114–8119.
- Carnicella S, Ron D, Barak S (2014b) Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol* 48:243–252.
- Carnicella S, Yowell Q v., Ron D (2011) Regulation of Operant Oral Ethanol Self-Administration: A Dose-Response Curve Study in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35:116–125.
- Carpenter-Hyland EP, Woodward JJ, Chandler LJ (2004) Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 24:7859–7868.
- Castner SA, Goldman-Rakic PS (1999) Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 20:10–28.
- Cerpa JC, Marchand AR, Salafranke Y, Pape JR, Kremer EJ, Coutureau E (2020) Targeting Catecholaminergic Systems in Transgenic Rats With a CAV-2 Vector Harboring a Cre-Dependent DREADD Cassette. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13.
- Chang CY, Esber GR, Marrero-Garcia Y, Yau HJ, Bonci A, Schoenbaum G (2015) Brief optogenetic inhibition of dopamine neurons mimics endogenous negative reward prediction errors. *Nature Neuroscience* 19:111–116.
- Chang CY, Gardner M, Di Tillio MG, Schoenbaum G (2017) Optogenetic Blockade of Dopamine Transients Prevents Learning Induced by Changes in Reward Features. *Current Biology* 27:3480-3486.e3.
- Charlton AJ, May C, Luikinga SJ, Burrows EL, Hyun Kim J, Lawrence AJ, Perry CJ (2019) Chronic voluntary alcohol consumption causes persistent cognitive deficits and cortical cell loss in a rodent model. *Scientific Reports* 9:1–19.
- Charness ME (1993) Brain Lesions in Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV (2006) Non-motor symptoms of Parkinson’s disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurology*.
- Chaudhuri KR, Schapira AH (2009) Non-motor symptoms of Parkinson’s disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology* 8:464–474.
- Chen X, Choo H, Huang XP, Yang X, Stone O, Roth BL, Jin J (2015) The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chemical Neuroscience* 6:476–484.

- Chiueh CC (1988) Dopamine in the Extrapyrmidal Motor Function A Study Based upon the MPTP-Induced Primate Model of Parkinsonism". *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Cho S Bin, Su J, Kuo SIC, Bucholz KK, Chan G, Edenberg HJ, McCutcheon V V., Schuckit MA, Kramer JR, Dick DM (2019) Positive and negative reinforcement are differentially associated with alcohol consumption as a function of alcohol dependence. *Psychology of Addictive Behaviors*.
- Choi DS, Wei W, Deitchman JK, Kharazia VN, Lesscher HMB, McMahon T, Wang D, Qi ZH, Sieghart W, Zhang C, Shokat KM, Mody I, Messing RO (2008) Protein kinase C δ regulates ethanol intoxication and enhancement of GABA-stimulated tonic current. *Journal of Neuroscience* 28:11890–11899.
- Coddington LT, Dudman JT (2019) Learning from Action: Reconsidering Movement Signaling in Midbrain Dopamine Neuron Activity. *Neuron* 104:63–77.
- Coizet V, Comoli E, Westby GWM, Redgrave P (2003) Phasic activation of substantia nigra and the ventral tegmental area by chemical stimulation of the superior colliculus: An electrophysiological investigation in the rat. *European Journal of Neuroscience* 17:28–40.
- Coizet V, Dommert EJ, Redgrave P, Overton PG (2006) Nociceptive responses of midbrain dopaminergic neurones are modulated by the superior colliculus in the rat. *Neuroscience* 139:1479–1493.
- Cools R, Froböse M, Aarts E, Hofmans L (2019) Dopamine and the motivation of cognitive control☆. *Handbook of Clinical Neurology* 163:123–143.
- Cooper A, Barnea-Ygael N, Levy D, Shaham Y, Zangen A (2007) A conflict rat model of cue-induced relapse to cocaine seeking. *Psychopharmacology* 194:117–125.
- Cooper ML (1994) Motivations for alcohol use among adolescents: Development and validation of a four-factor model. *Psychological Assessment*.
- Cooper ML, Frone MR, Russell M, Mudar P (1995) Drinking to Regulate Positive and Negative Emotions: A Motivational Model of Alcohol Use. *Journal of Personality and Social Psychology* 69:990–1005.
- Cooper ML, Russell M, Skinner JB, Frone MR, Mudar P (1992) Stress and Alcohol Use: Moderating Effects of Gender, Coping, and Alcohol Expectancies. *Journal of Abnormal Psychology* 101:139–152.
- Cope ZA, Vazey EM, Floresco SB, Aston Jones GS (2019) DREADD-mediated modulation of locus coeruleus inputs to mPFC improves strategy set-shifting. *Neurobiology of Learning and Memory* 161:1–11.
- Corbit LH (2018) Understanding the balance between goal-directed and habitual behavioral control. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 20:161–168.
- Corbit LH, Janak PH (2016) Habitual alcohol seeking: Neural bases and possible relations to alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 40:1380–1389.
- Corbit LH, Nie H, Janak PH (2014) Habitual responding for alcohol depends upon both AMPA and D2 receptor signaling in the dorsolateral striatum. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8:1–9.
- Corbit LH, Nie H, Janak PH (2012) Habitual alcohol seeking: Time course and the contribution of subregions of the dorsal striatum. *Biological Psychiatry* 72:389–395.
- Cousins MS, Atherton A, Turner L, Salamone JD (1996) Nucleus accumbens dopamine depletions alter relative response allocation in a T-maze cost/benefit task. *Behavioural Brain Research* 74:189–197.

- Coutureau E, Parkes SL (2018) Cortical determinants of goal-directed behavior In: Goal-Directed Decision Making: Computations and Neural Circuits , pp179–197. Elsevier.
- Covey DP, Roitman MF, Garris PA (2014) Illicit dopamine transients: Reconciling actions of abused drugs. *Trends in Neurosciences* 37:200–210.
- Cox SML, Benkelfat C, Dagher A, Delaney JS, Durand F, McKenzie SA, Kolivakis T, Casey KF, Leyton M (2009) Striatal Dopamine Responses to Intranasal Cocaine Self-Administration in Humans. *Biological Psychiatry* 65:846–850.
- Cryan JF, Hoyer D, Markou A (2003) Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biological Psychiatry* 54:49–58.
- Cuenya L, Fosachecha S, Mustaca A, Kamenetzky G (2012) Effects of isolation in adulthood on frustration and anxiety. *Behavioural Processes* 90:155–160.
- Cuthbert BN (2014) The RDoC framework: facilitating transition from ICD/DSM to dimensional approaches that integrate neuroscience and psychopathology. *World psychiatry* 13:28–35.
- Cuzon Carlson VC, Seabold GK, Helms CM, Garg N, Odagiri M, Rau AR, Daunais J, Alvarez VA, Lovinger DM, Grant KA (2011) Synaptic and morphological neuroadaptations in the putamen associated with long-term, relapsing alcohol drinking in primates. *Neuropsychopharmacology* 36:2513–2528.

D

- Da Silva JA, Tecuapetla F, Paixão V, Costa RM (2018) Dopamine neuron activity before action initiation gates and invigorates future movements. *Nature* 554:244–248.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–399.
- Davies M (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 28:263–274.
- Davis TJ, Fiebre CM De, Ph D (2006) Biological Mechanisms Alcohol ' S Actions on Neuronal 29:179–185.
- Day JJ, Roitman MF, Wightman RM, Carelli RM (2007) Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience* 10:1020–1028.
- De la Monte SM (1988) Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Archives of Neurology*.
- De La Monte SM, Kril JJ (2014) Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathologica* 127:71–90.
- de Russo AL, Fan D, Gupta J, Shelest O, Costa RM, Yin HH (2010) Instrumental uncertainty as a determinant of behavior under interval schedules of reinforcement. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 4:1–8.
- Dematteis M, Pennel L (2018) Alcohol and Neurology. *Presse Medicale*.
- Dematteis M, Pennel L (2016) Théories neurobiologiques de l'addiction In: *Traité d'addictologie* (Reynaud M ed), pp56–71.
- Demazeux S, Pidoux V (2015) Le projet RDoC : La classification psychiatrique de demain? *Medecine/Sciences* 31:792–796.
- Denoble V, Begleiter H (1976) Response Suppression on a Mixed Schedule of Reinforcement During Alcohol Withdrawal 5:227–229.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305:1014–1017.

- di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology* 7:69–76.
- di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5274–5278.
- Diana M, Bolloni C, Antonelli M, Di Giuda D, Cocciolillo F, Fattore L, Addolorato G (2019) Repetitive transcranial magnetic stimulation: Re-wiring the alcoholic human brain. *Alcohol* 74:113–124.
- Diana M, Brodie M, Muntoni A, Puddu MC, Pillolla G, Steffensen S, Spiga S, Little HJ (2003) Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: Basis for alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27:354–361.
- Diana M, Pistis M, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL (1993) Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: Electrophysiological and biochemical evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7966–7969.
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G (1996) Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: Evidence of protracted abstinence. *Neuroscience* 71:411–415.
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Rossetti ZL, Gessa G (1992) Marked decrease of A10 dopamine neuronal firing during ethanol withdrawal syndrome in rats. *European Journal of Pharmacology* 221:403–404.
- Dickinson A, Pearce JM (1976) Preference and response suppression under different correlations between shock and a positive reinforcer in rats. *Learning and Motivation* 7:66–85.
- Dickinson A, Trans P, Lond RS (1985) Actions and habits: the development of behavioural autonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 308:67–78.
- Didone V, Masson S, Quoilin C, Seutin V, Quertemont E (2016) Correlation between ethanol behavioral sensitization and midbrain dopamine neuron reactivity to ethanol. *Addiction Biology* 21:387–396.
- Domi A, Stopponi S, Domi E, Ciccocioppo R, Cannella N (2019) Sub-dimensions of alcohol use disorder in alcohol preferring and non-preferring rats, a comparative study. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13.
- Domi E, Xu L, Toivainen S, Nordeman A, Gobbo F, Venniro M, Shaham Y, Messing RO, Visser E, van den Oever MC, Holm L, Barbier E, Augier E, Heilig M (2021) A neural substrate of compulsive alcohol use. *Science Advances* 7:1–13.
- Dopico A, Bukiya AN, Martin G (2014) Ethanol modulation of mammalian BK channels in excitable tissues: Molecular targets and their possible contribution to alcohol-induced altered behavior. *Frontiers in Physiology* 5:1–13.
- Dopico AM, Bukiya AN, Kuntamallappanavar G, Liu J (2016) Modulation of BK Channels by Ethanol In: *International Review of Neurobiology* .
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2003) Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: Effects of social isolation. *Physiology and Behavior* 80:317–325.
- Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand a, Boulet S, Savasta M (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular psychiatry* 19:358–67.

Durand A, Girardeau P, Freese L, Ahmed SH (2021) Increased responsiveness to punishment of cocaine self-administration after experience with high punishment. *Neuropsychopharmacology*.

E

Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism and Related Disorders*.

Engel JA, Jerlhag E (2014) Alcohol: Mechanisms along the mesolimbic dopamine system, *Progress in Brain Research*.

Ersche KD, Gillan CM, Simon Jones P, Williams GB, Ward LHE, Luijten M, de Wit S, Sahakian BJ, Bullmore ET, Robbins TW (2016) Carrots and sticks fail to change behavior in cocaine addiction. *Science* 352:1468–1471.

Evans AH, Pavese N, Lawrence AD, Tai YF, Appel S, Doder M, Brooks DJ, Lees AJ, Piccini P (2006) Compulsive drug use linked to sensitized ventral striatal dopamine transmission. *Annals of Neurology* 59:852–858.

Everitt BJ, Giuliano C, Belin D (2018) Addictive behaviour in experimental animals: Prospects for translation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373.

Everitt BJ, Robbins TW (2016) Drug addiction: Updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual Review of Psychology* 67:23–50.

Everitt BJ, Robbins TW (2013) From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of their roles in drug addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37:1946–1954.

Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience* 8:1481–1489.

Everitt BJ, Robbins TW (2000) Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: Measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology* 153:17–30.

Evren C, Durkaya M, Evren B, Dalbudak E, Cetin R (2012) Relationship of relapse with impulsivity, novelty seeking and craving in male alcohol-dependent inpatients. *Drug and Alcohol Review* 31:81–90.

F

Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comparative Neurology* 180:545–579.

Faure A, Haberland U, Condé F, El Massioui N (2005) Lesion to the Nigrostriatal Dopamine System Disrupts Stimulus–Response Habit Formation. *Journal of Neuroscience* 25:2771–2780.

Favier M, Carcenac C, Drui G, Vachez Y, Boulet S, Savasta M, Carnicella S (2017) Implication of dorsostriatal D3 receptors in motivational processes: A potential target for neuropsychiatric symptoms in Parkinson’s disease. *Scientific Reports* 7:1–13.

Favier M, Duran T, Carcenac C, Drui G, Savasta M, Carnicella S (2014) Pramipexole reverses Parkinson’s disease-related motivational deficits in rats. *Movement Disorders* 29:912–920.

- Feltmann K, Fredriksson I, Wirf M, Schilström B, Steensland P (2016) The monoamine stabilizer (-)-OSU6162 counteracts downregulated dopamine output in the nucleus accumbens of long-term drinking Wistar rats. *Addiction Biology* 21:438–449.
- Ferrani-Kile K, Randall PK, Leslie SW (2003) Acute ethanol affects phosphorylation state of the NMDA receptor complex: Implication of tyrosine phosphatases and protein kinase A. *Molecular Brain Research* 115:78–86.
- Fiorino DF, Phillips AG (1999a) Facilitation of sexual behavior in male rats following d-amphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology* 142:200–208.
- Fiorino DF, Phillips AG (1999b) Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *Journal of Neuroscience* 19:456–463.
- Fleury MJ, Djouini A, Huynh C, Tremblay J, Ferland F, Ménard JM, Belleville G (2016) Remission from substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. *Drug and Alcohol Dependence* 168:293–306.
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moorel H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience* 6:968–973.
- Fogel S, Albouy G, King BR, Lungu O, Vien C, Bore A, Pinsard B, Benali H, Carrier J, Doyon J (2017) Reactivation or transformation? Motor memory consolidation associated with cerebral activation time-locked to sleep spindles. *PLoS ONE* 12:1–26.
- Forman SA, Zhou Q (1999) Novel modulation of a nicotinic receptor channel mutant reveals that the open state is stabilized by ethanol. *Molecular Pharmacology*.
- Förstera B, Castro PA, Moraga-Cid G, Aguayo LG (2016) Potentiation of gamma aminobutyric acid receptors (GABAAR) by ethanol: How are inhibitory receptors affected? *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10:1–17.
- Förstera B, Muñoz B, Lobo MK, Chandra R, Lovinger DM, Aguayo LG (2017) Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Journal of Physiology* 595:5285–5300.
- Fouyssac M, Belin D (2019) Beyond drug-induced alteration of glutamate homeostasis, astrocytes may contribute to dopamine-dependent intrastriatal functional shifts that underlie the development of drug addiction: A working hypothesis. *European Journal of Neuroscience* 50:3014–3027.
- Fouyssac M, Peña-oliver Y, Puaud M, Lim N (2021) Maladaptive cue-controlled cocaine-seeking habits promote increased relapse severity in rats. *bioRxiv*.
- Fredriksson I, Wirf M, Steensland P (2019) The monoamine stabilizer (-)-OSU6162 prevents the alcohol deprivation effect and improves motor impulsive behavior in rats. *Addiction Biology* 24:471–484.
- Furlong TM, Corbit LH (2018) Drug addiction: Augmented habit learning or failure of goal-directed control?, *Goal-Directed Decision Making: Computations and Neural Circuits*. Elsevier Inc.
- Furlong TM, Corbit LH, Brown RA, Balleine BW (2018) Methamphetamine promotes habitual action and alters the density of striatal glutamate receptor and vesicular proteins in dorsal striatum. *Addiction Biology* 23:857–867.

G

- Gardner JD, Mouton AJ (2015) Alcohol effects on cardiac function. *Comprehensive Physiology* 5:791–802.

- George O, Le Moal M, Koob GF (2012) Allostasis and addiction: Role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. *Physiology and Behavior* 106:58–64.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Research* 348:201–203.
- Gilman JM, Hommer DW (2008) Modulation of brain response to emotional images by alcohol cues in alcohol-dependent patients. *Addiction Biology* 13:423–434.
- Gilman S, Koeppe RA, Adams KM, Junck L, Kluin KJ, Johnson-Greene D, Martorello S, Heumann M, Bandekar R (1998) Decreased striatal monoaminergic terminals in severe chronic alcoholism demonstrated with (+)[11C]dihydrotetrabenazine and positron emission tomography. *Annals of Neurology* 44:326–333.
- Giuliano C, Belin D, Everitt BJ (2019) Compulsive alcohol seeking results from a failure to disengage dorsolateral striatal control over behavior. *Journal of Neuroscience* 39:1744–1754.
- Giuliano C, Goodlett CR, Economidou D, García-Pardo MP, Belin D, Robbins TW, Bullmore ET, Everitt BJ (2015) The novel μ -opioid receptor antagonist GSK1521498 decreases both alcohol seeking and drinking: Evidence from a new preclinical model of alcohol seeking. *Neuropsychopharmacology* 40:2981–2992.
- Giuliano C, Peña-Oliver Y, Goodlett CR, Cardinal RN, Robbins TW, Bullmore ET, Belin D, Everitt BJ (2018) Evidence for a Long-Lasting Compulsive Alcohol Seeking Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology* 43:728–738.
- Giuliano C, Puaud M, Cardinal RN, Belin D, Everitt BJ (2021) Individual differences in the engagement of habitual control over alcohol seeking predict the development of compulsive alcohol seeking and drinking. *Addiction Biology* 1–11.
- Giuliano C, Robbins TW, Wille DR, Bullmore ET, Everitt BJ (2013) Attenuation of cocaine and heroin seeking by μ -opioid receptor antagonism. *Psychopharmacology* 227:137–147.
- Glover EJ, Starr EM, Chao Y, Zhou TC, Chandler LJ (2019) Inhibition of the rostromedial tegmental nucleus reverses alcohol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 44:1896–1905.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: Neuroimaging findings and clinical implications. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Gomez Juan L, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine 507:503–507.
- Gomez Juan L., Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357:503–507.
- González-Marín M del C, Coune F, Naassila M (2020) Vulnerability to ethanol sensitization predicts higher intake and motivation to self-administer ethanol: Proof of the incentive salience sensitization theory? *Addiction Biology* 25.
- Göthert M, Fink K (1989) Inhibition of N-methyl- d-aspartate (NMDA) and l-glutamate-induced noradrenaline and acetylcholine release in the rat brain by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.
- Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S (2020) Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. *PLoS ONE* 15:1–11.

- Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S (2019) Dreads: The power of the lock, the weakness of the key. favoring the pursuit of specific conditions rather than specific ligands. *eNeuro* 6:1–5.
- Grace AA (2016) Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Grace AA (2000) The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* 95.
- Grace AA (1995) The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug and Alcohol Dependence* 37:111–129.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: A hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41:1–24.
- Grace AA, Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Single spike firing. *Journal of Neuroscience*.
- Grace AA, Bunney BS (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Burst firing. *Journal of Neuroscience* 4:2877–2890.
- Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons — 1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences* 30:220–227.
- Graybiel AM (2008) Habits, Rituals, and the Evaluative Brain. *Annual Review of Neuroscience* 31:359–387.
- Gremel CM, Chancey JH, Atwood BK, Luo G, Neve R, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Lovinger DM, Costa RM (2016) Endocannabinoid Modulation of Orbitostriatal Circuits Gates Habit Formation. *Neuron* 90:1312–1324.
- Gremel CM, Costa RM (2013) Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nature Communications*.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001) Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412:141–142.
- Griswold MG et al. (2018) Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* 392:1015–1035.
- Guatteeo E, Cucchiaroni ML, Mercuri BN (2009) Substantia nigra control of basal ganglia nuclei, Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra , *Journal of Neural Transmission, Supplemental*.

H

- Haber S (2008) Parallel and Integrative Processing Through the Basal Ganglia Reward Circuit: Lessons from Addiction. *Biological Psychiatry* 64:173–174.
- Haber SN (2016) Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 18:7–21.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2369–2382.
- Haber SN, Knutson B (2010) The reward circuit: Linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology* 35:4–26.

- Hanchar HJ, Chutsrinopkun P, Meera P, Supavilai P, Sieghart W, Wallner M, Olsen RW (2006) Ethanol potently and competitively inhibits binding of the alcohol antagonist Ro15-4513 to $\alpha 4/6\beta 3\delta$ GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8546–8551.
- Hansson AC, Gründer G, Hirth N, Noori HR, Spanagel R, Sommer WH (2019) Dopamine and opioid systems adaptation in alcoholism revisited: Convergent evidence from positron emission tomography and postmortem studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 106:141–164.
- Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ (2008) Ethanol 's Molecular Targets 1–6.
- Hart AS, Rutledge RB, Glimcher PW, Phillips PEM (2014) Phasic dopamine release in the rat nucleus accumbens symmetrically encodes a reward prediction error term. *Journal of Neuroscience* 34:698–704.
- Heilig M, Egli M, Crabbe JC, Becker HC (2010) Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: Are they linked? *Addiction Biology*.
- Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR (2013) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Frontiers in Psychiatry* 4:1–16.
- Herman MA, Sidhu H, Stouffer DG, Kreifeldt M, Le D, Cates-Gatto C, Munoz MB, Roberts AJ, Parsons LH, Roberto M, Wickman K, Slesinger PA, Contet C (2015) GIRK3 gates activation of the mesolimbic dopaminergic pathway by ethanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:7091–7096.
- Herreros-Villanueva M, Hijona E, Bañales JM, Cosme A, Bujanda L (2013) Alcohol consumption on pancreatic diseases. *World Journal of Gastroenterology* 19:638–647.
- Heymann G, Jo YS, Reichard KL, McFarland N, Chavkin C, Palmiter RD, Soden ME, Zweifel LS (2020) Synergy of Distinct Dopamine Projection Populations in Behavioral Reinforcement. *Neuron* 105:909-920.e5.
- Hintiryan H, Foster NN, Bowman I, Bay M, Song MY, Gou L, Yamashita S, Bienkowski MS, Zingg B, Zhu M, Yang XW, Shih JC, Toga AW, Dong HW (2016) The mouse cortico-striatal projectome. *Nature Neuroscience* 19:1100–1114.
- Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, Salgado H, Torres-Ramirez O, Uhrig S, Broccoli L, Vengeliene V, Roßmanith M, Perreau-Lenz S, Köhr G, Sommer WH, Spanagel R, Hansson AC (2016) Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:3024–3029.
- Hoefer ME, Voskanian SJ, Koob GF, Pulvirenti L (2006) Effects of terguride, ropinirole, and acetyl-l-carnitine on methamphetamine withdrawal in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 83:403–409.
- Hollerman JR, Schultz W (1998) Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neuroscience* 1:304–309.
- Holmes A, Spanagel R, Krystal JH (2013) Glutamatergic targets for new alcohol medications. *Psychopharmacology* 229:539–554.
- Holtz P, Heise R, Lüdtke K (1938) Fermentativer Abbau von l-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*.
- Hoshaw BA, Lewis MJ (2001) Behavioral sensitization to ethanol in rats: Evidence from the Sprague-Dawley strain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 68:685–690.
- Howe MW, Dombeck DA (2016) Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature*.

- Howes O, Bose S, Turkheimer F, Valli I, Egerton A, Stahl D, Valmaggia L, Allen P, Murray R, McGuire P. (2011) Progressive increase in striatal dopamine synthesis capacity as patients develop psychosis : a PET study 16:885–886.
- Howes OD, Williams M, Ibrahim K, Leung G, Egerton A, McGuire PK, Turkheimer F (2013) Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: A post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain* 136:3242–3251.
- Hupalo S, Bryce CA, Bangasser DA, Berridge CW, Valentino RJ, Floresco SB (2019) Corticotropin-Releasing Factor (CRF) circuit modulation of cognition and motivation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 103:50–59.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience* 29:565–598.

I

- Ieraci A, Mallei A, Popoli M (2016) Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity* 2016.
- Ikemoto S (2010) Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:129–150.
- Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S (2014) Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *Journal of Neuroscience* 34:817–822.
- Ilg A-K, Enkel T, Bartsch D, Böhner F (2018) Behavioral Effects of Acute Systemic Low-Dose Clozapine in Wild-Type Rats: Implications for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12.
- Imperato A, Di Chiara G (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 239:219–28.
- Imperato A, Di Chiara G (1985) Ethanol Preferentially Stimulates Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of freely moving rats. *European Journal of Pharmacology* 115:131–132.
- Imperato A, Obinu MC, Carta G, Mascia MS, Casu MA, Gessa GL (1996) Reduction of dopamine release and synthesis by repeated amphetamine treatment: Role in behavioral sensitization, *European Journal of Pharmacology*.
- Insel T, Cuthbert B, Garvey M, Heinssen R, Pine D, Quinn K, Sanislow C, Wang P (2010) Research Domain Criteria (RDoC): Toward a. *American Journal of Psychiatry Online* 748–751.
- Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nature Neuroscience* 7:389–397.

J

- Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP, Naassila M (2019) Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 106:112–121.
- Jean-Richard-Dit-Bressel P, Killcross S, McNally GP (2018) Behavioral and neurobiological mechanisms of punishment: Implications for psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*.

- Jendryka M, Palchoudhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Kätzel D, Nissen W, Pekcec A (2019) Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Scientific Reports* 9:1–14.
- Joel D, Niv Y, Ruppin E (2002) Actor-critic models of the basal ganglia: new anatomical and computational perspectives. *Neural Networks* 15:535–547.
- Johnson RA, Noll EC, Rodney WM (1982) SURVIVAL AFTER A SERUM ETHANOL CONCENTRATION OF 1_{1/2}%. *The Lancet*.
- Jonkman S, Pelloux Y, Everitt BJ (2012a) Differential Roles of the Dorsolateral and Midlateral Striatum in Punished Cocaine Seeking. *Journal of Neuroscience* 32:4645–4650.
- Jonkman S, Pelloux Y, Everitt BJ (2012b) Drug intake is sufficient, but conditioning is not necessary for the emergence of compulsive cocaine seeking after extended self-administration. *Neuropsychopharmacology* 37:1612–1619.

K

- Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5:48–58.
- Kashem MA, Ahmed S, Sarker R, Ahmed EU, Hargreaves GA, McGregor IS (2012) Long-term daily access to alcohol alters dopamine-related synthesis and signaling proteins in the rat striatum. *Neurochemistry International* 61:1280–1288.
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Frankle WG, Gil R, Cooper TB, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Haber SN, Laruelle M (2010) Increased synaptic dopamine function in associative regions of the striatum in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 67:231–239.
- Keiflin R, Janak PH (2015) Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron* 88:247–263.
- Keiflin R, Pribut HJ, Shah NB, Janak PH (2019) Ventral Tegmental Dopamine Neurons Participate in Reward Identity Predictions. *Current Biology* 29:93-103.e3.
- Keramati M, Gutkin B (2013) Imbalanced Decision Hierarchy in Addicts Emerging from Drug-Hijacked Dopamine Spiraling Circuit. *PLoS ONE* 8.
- Khemiri L, Steensland P, Guterstam J, Beck O, Carlsson A, Franck J, Jayaram-Lindström N (2015) The effects of the monoamine stabilizer (-)-OSU6162 on craving in alcohol dependent individuals: A human laboratory study. *European Neuropsychopharmacology* 25:2240–2251.
- Khemiri L, Steensland P, Guterstam J, de Manzano Ö, Franck J, Jayaram-Lindström N (2020) Effects of the monoamine stabilizer (-)-OSU6162 on cognitive function in alcohol dependence. *Psychopharmacology* 237:69–82.
- 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* 41:1502–1509.
- Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG (2019) Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* 39:31–59.
- Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:837–850.
- Kobayashi T, Ikeda K, Kojima H, Niki H, Yano R, Yoshioka T, Kumanishi T (1999) Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nature Neuroscience* 2:1091–1097.

- Kodali S, Kaif M, Tariq R, Singal AK (2018) Alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic cirrhosis-impact on liver graft and patient survival: A meta-analysis. *Alcohol and Alcoholism* 53:166–172.
- Koob GF (2021) Drug addiction: Hyperkatifeia/negative reinforcement as a framework for medications development. *Pharmacological Reviews* 73:163–201.
- Koob GF (2008) A Role for Brain Stress Systems in Addiction. *Neuron* 59:11–34.
- Koob GF (2003) Alcoholism: Allostasis and beyond. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27:232–243.
- Koob GF (1996) Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893–896.
- Koob GF (1992) Neural Mechanisms of Drug Reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences* 654:171–191.
- Koob GF, Arends MA, Le Moal M (2014) Drugs, Addiction, and the Brain, *Drugs, Addiction, and the Brain*.
- Koob GF, Arends MA, McCracken M, Le Moal M (2019) What is addiction? In: *Introduction to Addiction*, pp1–58. Elsevier.
- Koob GF, le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the “dark side” of drug addiction. *Nature Neuroscience* 8:1442–1444.
- Koob GF, le Moal M (2001) Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychobiology* 24:97–129.
- Koob GF, Schulkin J (2019) Addiction and stress: An allostatic view. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 106:245–262.
- Koob GF, Schulkin J (2018) Addiction and stress: An allostatic view. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.
- Koob GF, Volkow ND (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry* 3:760–773.
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217–238.
- Kopp P (2015) Le coût social des drogues en France. *Observatoire français des drogues et des toxicomanies* 75.
- Kosillo P, Zhang YF, Threlfell S, Cragg SJ (2016) Cortical Control of Striatal Dopamine Transmission via Striatal Cholinergic Interneurons. *Cerebral Cortex* 26:4160–4169.
- Koyama S, Brodie MS, Appel SB (2007) Ethanol inhibition of M-current and ethanol-induced direct excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology* 97:1977–1985.
- Kroemer NB, Burrasch C, Hellrung L (2016) *To work or not to work: Neural representation of cost and benefit of instrumental action*, 1st ed, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V.
- Kroener S, Mulholland PJ, New NN, Gass JT, Becker HC, Chandler LJ (2012) Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS ONE* 7.
- Kuhn BN, Kalivas PW, Bobadilla AC (2019) Understanding Addiction Using Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13:1–24.
- Kumar S, Fleming RL, Morrow AL (2004) Ethanol regulation of γ -aminobutyric acidA receptors: Genomic and nongenomic mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics* 101:211–226.
- Kwako LE, Spagnolo PA, Schwandt ML, Thorsell A, George DT, Momenan R, Rio DE, Huestis M, Anizan S, Concheiro M, Sinha R, Heilig M (2015) The Corticotropin Releasing Hormone-1

(CRH1) Receptor Antagonist Pexacerfont in Alcohol Dependence: A Randomized Controlled Experimental Medicine Study. *Neuropsychopharmacology* 40:1053–1063.

L

- Legastelois R, Botia B, Coune F, Jeanblanc J, Naassila M (2014) Deciphering the relationship between vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol consumption in outbred mice. *Addiction Biology* 19:210–224.
- Lenoir M, Serre F, Cantin L, Ahmed SH (2007) Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS ONE* 2.
- Lesscher HMB, Van Kerkhof LWM, Vanderschuren LJM (2010) Inflexible and indifferent alcohol drinking in male mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 34:1219–1225.
- Lewohl JM, Wilson WR, Mayfield RD, Brozowski SJ, Morrisett RA, Harris RA (1999) G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nature Neuroscience* 2:1084–1090.
- Leyton M, Boileau I, Benkelfat C, Diksic M, Baker G, Dagher A (2002) Amphetamine-induced increases in extracellular dopamine, drug wanting, and novelty seeking: A PET/[11C]raclopride study in healthy men. *Neuropsychopharmacology* 27:1027–1035.
- Li P, Wu P, Xin X, Fan YL, Wang G Bin, Wang F, Ma MY, Xue MM, Luo YX, Yang F De, Bao YP, Shi J, Sun HQ, Lu L (2014) Incubation of alcohol craving during abstinence in patients with alcohol dependence. *Addiction Biology* 20:513–522.
- Li X, Venniro M, Shaham Y (2016) Translational research on incubation of cocaine craving. *JAMA Psychiatry*.
- Lima-Landman MTR, Albuquerque EX (1989) Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Letters* 247:61–67.
- Lipton DM, Gonzales BJ, Citri A (2019) Dorsal striatal circuits for habits, compulsions and addictions. *Frontiers in Systems Neuroscience* 13:1–14.
- Littleton J (1998) Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal. *Alcohol health and research world* 22:13–24.
- Lopez MF, Becker HC, Chandler LJ (2014) Repeated episodes of chronic intermittent ethanol promote insensitivity to devaluation of the reinforcing effect of ethanol. *Alcohol* 48:639–645.
- Lovinger DM (1999) 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: An increasingly exciting topic. *Neurochemistry International*.
- Lovinger DM, Alvarez VA (2017) Alcohol and basal ganglia circuitry: Animal models. *Neuropharmacology* 122:46–55.
- Lovinger DM, White G (1991) Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Molecular Pharmacology*.
- Lovinger DM, White G, Weight FF (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243:1721–1724.
- Lu L, Grimm JW, Hope BT, Shaham Y (2004) Incubation of cocaine craving after withdrawal: A review of preclinical data. *Neuropharmacology* 47:214–226.

- Lüscher C, Janak PH (2021) Consolidating the Circuit Model for Addiction. *Annual Review of Neuroscience* 44:173–195.
- Lüscher C, Robbins TW, Everitt BJ (2020) The transition to compulsion in addiction. *Nature Reviews Neuroscience* 21:247–263.

M

- MacLaren DAA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, Espana RA, Clark SD (2016) Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *eNeuro* 3.
- Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, Krack P, David O, Savasta M, Boulet S, Carnicella S (2016) What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Translational psychiatry* 6:e753.
- Mahler S V., Aston-Jones G (2018) CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 43:934–936.
- Mahler S v., Brodnik ZD, Cox BM, Buchta WC, Bentzley BS, Quintanilla J, Cope ZA, Lin EC, Riedy MD, Scofield MD, Messinger J, Ruiz CM, Riegel AC, España RA, Aston-Jones G (2019) Chemogenetic manipulations of ventral tegmental area dopamine neurons reveal multifaceted roles in cocaine abuse. *Journal of Neuroscience* 39:503–518.
- Mahler S v, Vazey EM, Beckley JT, Keistler CR, McGlinchey EM, Kaufling J, Wilson SP, Deisseroth K, Woodward JJ, Aston-Jones G (2014) Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nature neuroscience* 17:577–85.
- Mainerova B, Praskoa J, Latalova K, Axmann K, Cerna M, Horacek R, Bradacova R (2015) Alcohol withdrawal delirium - diagnosis, course and treatment. *Biomedical Papers* 159:44–52.
- Malenka R, Nestler E, Hyman S (2009) *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, Second Edition* In: *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience (2nd Ed.)*. .
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* 285:1870–1874.
- Malvaez M, Wassum KM (2018) ScienceDirect Regulation of habit formation in the dorsal striatum. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 20:67–74.
- Manvich DF, Webster KA, Farrell MS, Porter JH, Foster SL, Ritchie JC, Weinschenker D (2018) The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Scientific Reports* 8:1–10.
- Manzaneque JM, Brain PF, Navarro JF (2002) Effect of low doses of clozapine on behaviour of isolated and group-housed male mice in the elevated plus-maze test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 26:349–355.
- Marchant NJ, Khuc TN, Pickens CL, Bonci A, Shaham Y (2013) Context-induced relapse to alcohol seeking after punishment in a rat model. *Biological Psychiatry* 73:256–262.
- Maricq A V., Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432–437.
- Markou A, Arroyo M, Everitt BJ (1999) Effects of contingent and non-contingent cocaine on drug-seeking behavior measured using a second-order schedule of cocaine reinforcement in rats. *Neuropsychopharmacology* 20:542–555.

- Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M, Abi-Dargham A (2005) Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biological Psychiatry* 58:779–786.
- Martinez D, Greene K, Broft A, Kumar D, Liu F, Narendran R, Slifstein M, Heertum R van, Kleber HD (2009) Lower Level of Endogenous Dopamine in Patients With Cocaine Dependence: Findings From PET Imaging of D. *American journal of Psychiatry* 1170–1177.
- Martinez VK, Saldana-Morales F, Sun JJ, Zhu PJ, Costa-Mattioli M, Ray RS (2019) Off-Target Effects of Clozapine- N-Oxide on the Chemosensory Reflex Are Masked by High Stress Levels 10:1–14.
- Martinotti G, Nicola M Di, Reina D, Andreoli S, Focà F, Cunniff A, Tonioni F, Bria P, Janiri L (2008) Alcohol protracted withdrawal syndrome: The role of anhedonia. *Substance Use and Misuse* 43:271–284.
- Masur J, Boerngen R (1980) The excitatory component of ethanol in mice: A chronic study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 13:777–780.
- Matthews BA, Tong J, Attwells S, Xu X, Le A, Kish SJ, Meyer JH (2018) Elevated monoamine oxidase A activity and protein levels in rodent brain during acute withdrawal after chronic intermittent ethanol vapor exposure. *Drug and Alcohol Dependence* 185:398–405.
- Mazzoni P, Hristova A, Krakauer JW (2007) Why don't we move faster? Parkinson's disease, movement vigor, and implicit motivation. *Journal of Neuroscience* 27:7105–7116.
- McBride WJ, Lovinger DM, Machu T, Thielen RJ, Rodd ZA, Murphy JM, Roache JD, Johnson BA (2004) Serotonin-3 Receptors in the Actions of Alcohol, Alcohol Reinforcement, and Alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28:257–267.
- McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR (2015) CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron* 87:605–620.
- McCutcheon RA, Abi-Dargham A, Howes OD (2019) Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends in Neurosciences* 42:205–220.
- McDaid J, McElvain MA, Brodie MS (2008) Ethanol effects on dopaminergic ventral tegmental area neurons during block of Ih: Involvement of barium-sensitive potassium currents. *Journal of Neurophysiology* 100:1202–1210.
- McGuigan S, Zhou SH, Brosnan MB, Thyagarajan D, Bellgrove MA, Chong TTJ (2019) Dopamine restores cognitive motivation in Parkinson's disease. *Brain* 142:719–732.
- Melas PA, Wirf M, André H, Jayaram-Lindström N, Mathé AA, Steensland P (2021) The monoamine stabilizer OSU6162 has anxiolytic-like properties and reduces voluntary alcohol intake in a genetic rat model of depression. *Scientific Reports* 11.
- Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State. *International Review of Neurobiology* 63:101–154.
- Meltzer HY (1989) Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 99.
- Meltzer HY, Stahl SM (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophrenia Bulletin*.
- Mereu G, Fadda F, Gian Luigi Gessa (1984) Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Research* 292:63–69.
- Mereu G, Gessa GL (1985) Low doses of ethanol inhibit the firing of neurons in the substantia nigra, pars reticulata: a GABAergic effect? *Brain Research* 360:325–330.

- Meyer PJ, Meshul CK, Phillips TJ (2009) Ethanol- and cocaine-induced locomotion are genetically related to increases in accumbal dopamine. *Genes, Brain and Behavior* 8:346–355.
- Mishra BR, Nizamie SH, Das B, Praharaj SK (2010) Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation in alcohol dependence: A sham-controlled study. *Addiction* 105:49–55.
- Miyakawa T, Yagi T, Kitazawa H, Yasuda M, Kawai N, Tsuboi K, Niki H (1997) Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: Relation to NMDA- Receptor function. *Science* 278:698–701.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology* 14:69–97.
- Molander A, Söderpalm B (2005a) Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: An access point for ethanol to the brain reward system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29:27–37.
- Molander A, Söderpalm B (2005b) Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29:17–26.
- Mollick JA, Kober H (2020) Computational models of drug use and addiction: A review. *Journal of Abnormal Psychology* 129:544–555.
- Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431:760–767.
- Monte R, Rabuñal R, Casariego E, López-Agreda H, Mateos A, Pértega S (2010) Analysis of the factors determining survival of alcoholic withdrawal syndrome patients in a general hospital. *Alcohol and Alcoholism* 45:151–158.
- Moore SD, Madamba SG, Siggins GR (1990) Ethanol diminishes a voltage-dependent K⁺ current, the M-current, in CA1 hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Brain Research* 516:222–228.
- Moos RH, Moos BS (2006) Rates and predictors of relapse after natural and treated remission from alcohol use disorders. *Addiction* 101:212–222.
- Morales M, Margolis EB (2017) Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 18:73–85.
- Morgan KN, Tromborg CT (2007) Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102:262–302.
- Morikawa H, Morrisett RA (2010) Ethanol Action on Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. Interaction with Intrinsic Ion Channels and Neurotransmitter Inputs. *International Review of Neurobiology* 91:235–288.
- Morton RA, Fernando Valenzuela C (2016) Further characterization of the effect of ethanol on voltage-gated Ca²⁺ channel function in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research*.
- Müller UJ, Sturm V, Voges J, Heinze HJ, Galazky I, Büntjen L, Heldmann M, Frodl T, Steiner J, Bogerts B (2016) Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation for Alcohol Addiction - Safety and Clinical Long-term Results of a Pilot Trial. *Pharmacopsychiatry* 49:170–173.
- Müller UJ, Sturm V, Voges J, Heinze HJ, Galazky I, Heldmann M, Scheich H, Bogerts B (2009) Successful treatment of chronic resistant alcoholism by deep brain stimulation of nucleus accumbens: First experience with three cases. *Pharmacopsychiatry* 42:288–291.
- Murray JE, Belin D, Everitt BJ (2012) Double dissociation of the dorsomedial and dorsolateral striatal control over the acquisition and performance of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* 37:2456–2466.

Murray JE, Belin-Rauscent A, Simon M, Giuliano C, Benoit-Marand M, Everitt BJ, Belin D (2015) Basolateral and central amygdala differentially recruit and maintain dorsolateral striatum-dependent cocaine-seeking habits. *Nature Communications* 6.

N

- Naassila M (2016) Neurobiologie de l'addiction à l'alcool In: *Traité d'addictologie* (Reynaud M ed), pp448–453.
- Nagai Y et al. (2020) Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nature Neuroscience* 23:1157–1167.
- Nagy J (2008) Alcohol Related Changes in Regulation of NMDA Receptor Functions. *Current Neuropharmacology* 6:39–54.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024–1031.
- Nelson A, Killcross S (2006) Amphetamine exposure enhances habit formation. *Journal of Neuroscience* 26:3805–3812.
- Nestoros JN (1980) Ethanol selectively potentiates GABA-mediated inhibition of single feline cortical neurons. *Life Sciences*.
- Nicola SM (2010) The flexible approach hypothesis: Unification of effort and cue-responding hypotheses for the role of nucleus accumbens dopamine in the activation of reward-seeking behavior. *Journal of Neuroscience* 30:16585–16600.
- Nicola SM (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology* 191:521–550.
- Nicoll RA (2017) A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* 93:281–290.
- Nieoullon A, Coquerel A (2003) Dopamine: a key regulator to adapt action, emotion, motivation and cognition. *Current opinion in neurology* 16 Suppl 2:S3-9.
- Niv Y (2009) Reinforcement learning in the brain. *Journal of Mathematical Psychology*.
- Niv Y, Schoenbaum G (2008) Dialogues on prediction errors. *Trends in Cognitive Sciences* 12:265–272.
- Nolan SO, Zachry JE, Johnson AR, Brady LJ, Siciliano CA, Calipari ES (2020) Direct dopamine terminal regulation by local striatal microcircuitry. *Journal of Neurochemistry*.
- Nona CN, Bermejo MK, Ramsey AJ, Nobrega JN (2015) Changes in dendritic spine density in the nucleus accumbens do not underlie ethanol sensitization. *Synapse* 69:607–610.
- Nona CN, Hendershot CS, Lê AD (2018) Behavioural sensitization to alcohol: Bridging the gap between preclinical research and human models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 173:15–26.
- Nordquist RE, Voorn P, de Mooij-van Malsen JG, Joosten RNJMA, Pennartz CMA, Vanderschuren LJMJ (2007) Augmented reinforcer value and accelerated habit formation after repeated amphetamine treatment. *European Neuropsychopharmacology* 17:532–540.
- Nutt DJ (2002) The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *International Clinical Psychopharmacology* 17:S1–S12.

O

- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Research Reviews* 12:117–165.
- O'Dell LE, Roberts AJ, Smith RT, Koob GF (2004) Enhanced alcohol self-administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28:1676–1682.
- OFDT (2017) *Drogues, Chiffres clés*, 7^e édition. Observatoire français des drogues et des toxicomanies.
- Okamoto T, Harnett MT, Morikawa H (2006) Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. *Journal of Neurophysiology* 95:619–626.
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2002) Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72:213–220.
- Olsen CM (2011) Natural rewards, neuroplasticity, and non-drug addictions. *Neuropharmacology* 61:1109–1122.
- Olsen RW (2018) GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*.
- Olsen RW, Li GD, Wallner M, Trudell JR, Bertaccini EJ, Lindahl E, Miller KW, Alkana RL, Davies DL (2014) Structural models of ligand-gated ion channels: Sites of action for anesthetics and ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 38:595–603.
- Olsen RW, Liang J (2017) Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model Tim Bliss. *Molecular Brain* 10:1–20.
- O'Tousa D, Grahame N (2014) Habit formation: Implications for alcoholism research. *Alcohol* 48:327–335.

P

- Palle C (2020) Les évolutions de la consommation d'alcool en France et ses conséquences. *Observatoire français des drogues et des toxicomanies* 1–18.
- Palmiter RD (2008) Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: Lessons from dopamine-deficient mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1129:35–46.
- Pang TY, Renoir T, Du X, Lawrence AJ, Hannan AJ (2013) Depression-related behaviours displayed by female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption are rescued by wheel-running. *European Journal of Neuroscience* 37:1803–1810.
- Parkes SL, Bradfield LA, Balleine BW (2015) Interaction of insular cortex and ventral striatum mediates the effect of incentive memory on choice between goal-directed actions. *Journal of Neuroscience* 35:6464–6471.
- Parkes SL, Ravassard PM, Cerpa JC, Wolff M, Ferreira G, Coutureau E (2018) Insular and ventrolateral orbitofrontal cortices differentially contribute to goal-directed behavior in rodents. *Cerebral Cortex* 28:2313–2325.
- Pascoli V, Hiver A, Van Zessen R, Loureiro M, Achargui R, Harada M, Flakowski J, Lüscher C (2018) Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* 564:366–371.
- Pascoli V, Terrier J, Hiver A, Lüscher C (2015) Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. *Neuron* 88:1054–1066.
- Paulson PE, Camp DM, Robinson TE (1991) Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine

- concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology* 103:480–492.
- Peciña S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher “wanting” but not “liking” for sweet rewards. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23:9395–402.
- Peirce RS, Frone MR, Russell M, Cooper ML (1994) Relationship of financial strain and psychosocial resources to alcohol use and abuse: the mediating role of negative affect and drinking motives. *Journal of health and social behavior* 35:291–308.
- Pelloux Y, Everitt BJ, Dickinson A (2007) Compulsive drug seeking by rats under punishment: Effects of drug taking history. *Psychopharmacology* 194:127–137.
- Pennartz CMA, Berke JD, Graybiel AM, Ito R, Lansink CS, van der Meer M, Redish AD, Smith KS, Voorn P (2009) Corticostriatal interactions during learning, memory processing, and decision making. *Journal of Neuroscience* 29:12831–12838.
- Perkins DI, Trudell JR, Crawford DK, Alkana RL, Davies DL (2010) Molecular targets and mechanisms for ethanol action in glycine receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 127:53–65.
- Perry CJ, Lawrence AJ (2017) Addiction, cognitive decline and therapy: seeking ways to escape a vicious cycle. *Genes, Brain and Behavior*.
- Phillips PEM, Stuber GD, Heien MLA V., Wightman RM, Carelli RM (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature* 422.
- Phillips PEM, Walton ME, Jhou TC (2007) Calculating utility: Preclinical evidence for cost-benefit analysis by mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology* 191:483–495.
- Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2016) Une théorie générale multi-étape de la transition vers la toxicomanie In: *Traité d’addictologie* (Reynaud Michel ed), pp33–55.
- Pich EM, Lorang M, Yeganeh M, De Fonseca FR, Raber J, Koob GF, Weiss F (1995) Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience* 15:5439–5447.
- Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT, Shaham Y (2011a) Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends in Neurosciences*.
- Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT, Shaham Y (2011b) Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends in Neurosciences* 34:411–420.
- Piña JA, Namba MD, Leyrer-Jackson JM, Cabrera-Brown G, Gipson CD (2018) Social Influences on Nicotine-Related Behaviors In: *International Review of Neurobiology* .
- Piray P, Keramati MM, Dezfouli A, Lucas C, Mokri A (2010) Individual differences in nucleus accumbens dopamine receptors predict development of addiction-like behavior: A computational approach. *Neural Computation* 22:2334–2368.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*.
- Poewe W (2008) Non-motor symptoms in Parkinson’s disease. *European Journal of Neurology* 15:14–20.
- Pohorecky LA, Newman B (1977) Effect of ethanol on dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes, *Drug and Alcohol Dependence*. Elsevier Sequoia S.A.
- Polich JM, Armor DJ, Braiker HB (1980) *The Course of Alcoholism*.
- Post RM, Weiss SRB, Fontana D, Pert A (1992) Conditioned Sensitization to the Psychomotor Stimulant Cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 654:386–399.

Prisciandaro JJ, Joseph JE, Myrick H, Mcrae-Clark AL, Henderson S, Pfeifer J, Brady KT (2014) The relationship between years of cocaine use and brain activation to cocaine and response inhibition cues. *Addiction* 109:2062–2070.

Puaud M, Higuera-Matas A, Brunault P, Everitt BJ, Belin D (2021) The Basolateral Amygdala to Nucleus Accumbens Core Circuit Mediates the Conditioned Reinforcing Effects of Cocaine-Paired Cues on Cocaine Seeking. *Biological Psychiatry* 89:356–365.

R

Radke AK, Gewirtz JC (2012) Increased Dopamine Receptor Activity in the Nucleus Accumbens Shell Ameliorates Anxiety during Drug Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 37:2405–2415.

Radke AK, Jury NJ, Kocharian A, Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Pleil KE, McElligott ZA, McKlveen JM, Kash TL, Holmes A (2017) Chronic EtOH effects on putative measures of compulsive behavior in mice. *Addiction Biology* 22:423–434.

Radke AK, Rothwell PE, Gewirtz JC (2011) An anatomical basis for opponent process mechanisms of opiate withdrawal. *Journal of Neuroscience* 31:7533–7539.

Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, Delong MR, Obeso JA (2010) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*.

Redish AD (2004) Addiction as a computational process gone awry. *Science* 306:1944–1947.

Richard J, Andler R, Cogordon C, Spilka S, Nguyen-Thanh V (2019) La Consommation D'Alcool Chez Les Adultes En France En 2017 // Alcohol Consumption in Adults in France in 2017. *Bull Epidémiol Hebd* 89–97.

Roberto M, Bajo M, Crawford E, Madamba SG, Siggins GR (2006) Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala. *Neuropsychopharmacology* 31:988–996.

Roberto M, Schweitzer P, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR (2004) Acute and Chronic Ethanol Alter Glutamatergic Transmission in Rat Central Amygdala: An In Vitro and In Vivo Analysis. *Journal of Neuroscience* 24:1594–1603.

Roberto M, Varodayan FP (2017) Synaptic targets: Chronic alcohol actions. *Neuropharmacology* 122:85–99.

Roberts AJ, Heyser CJ, Maunj Cole BS, Peter Griffin BS, Koob GF (2000) Excessive ethanol drinking following a history of dependence: Animal model of allostasis. *Neuropsychopharmacology* 22:581–594.

Roberts BM, Doig NM, Brimblecombe KR, Lopes EF, Siddorn RE, Threlfell S, Connor-Robson N, Bengoa-Vergniory N, Pasternack N, Wade-Martins R, Magill PJ, Cragg SJ (2020) GABA uptake transporters support dopamine release in dorsal striatum with maladaptive downregulation in a parkinsonism model. *Nature Communications* 11.

Robinson DL, Howard EC, McConnell S, Gonzales RA, Wightman RM (2009) Disparity between tonic and phasic ethanol-induced dopamine increases in the nucleus accumbens of rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33:1187–1196.

Robinson S, Rainwater AJ, Hnasko TS, Palmiter RD (2007) Viral restoration of dopamine signaling to the dorsal striatum restores instrumental conditioning to dopamine-deficient mice. *Psychopharmacology* 191:567–578.

Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* 18:247–291.

- Robinson TE, Jurson PA, Bennett JA, Bentgen KM (1988) Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Research* 462:211–222.
- Rocco A, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi Zamparelli M, Nardone G (2014) Alcoholic disease: Liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology* 20:14652–14659.
- Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000) Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 149:217–224.
- Roesch MR, Calu DJ, Schoenbaum G (2007) Dopamine neurons encode the better option in rats deciding between differently delayed or sized rewards. *Nature Neuroscience*.
- Roh MS, Cui FJ, Kim HK, Kang UG (2011) Regulation of NMDA receptor subunits after acute ethanol treatment in rat brain. *Alcohol and Alcoholism* 46:672–679.
- Rolland B, Chazeron I de, Carpentier F, Moustafa F, Viallon A, Jacob X, Lesage P, Ragonnet D, Genty A, Geneste J, Poulet E, Dematteis M, Llorca PM, Naassila M, Brousse G (2017) Comparison between the WHO and NIAAA criteria for binge drinking on drinking features and alcohol-related aftermaths: Results from a cross-sectional study among eight emergency wards in France. *Drug and Alcohol Dependence* 175:92–98.
- Roltsch Hellard E, Binette A, Zhuang X, Lu J, Ma T, Jones B, Williams E, Jayavelu S, Wang J (2019) Optogenetic control of alcohol-seeking behavior via the dorsomedial striatal circuit. *Neuropharmacology* 155:89–97.
- Ron D, Barak S (2016) Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Ron D, Wang J (2009) The NMDA receptor and alcohol addiction In: *Biology of the NMDA Receptor*.
- Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Diana M, Gessa GL (1992) Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 16:529–532.
- Rossi MA, Sukharnikova T, Hayrapetyan VY, Yang L, Yin HH (2013) Operant Self-Stimulation of Dopamine Neurons in the Substantia Nigra. *PLoS ONE* 8:1–7.
- Roth BL (2016) DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683–694.
- Rothblat DS, Rubin E, Schneider JS (2001) Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neuroscience Letters* 300:63–66.
- Rusheen AE, Gee TA, Jang DP, Blaha CD, Bennet KE, Lee KH, Heien ML, Oh Y (2020) Evaluation of electrochemical methods for tonic dopamine detection in vivo. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*.
- Russo M, Funk D, Loughlin A, Coen K, Lê AD (2018) Effects of alcohol dependence on discrete choice between alcohol and saccharin. *Neuropsychopharmacology* 43:1859–1866.

S

- Sabti M, Sasaki K, Gadhi C, Isoda H (2019) Elucidation of the molecular mechanism underlying lippia citriodora(Lim.)-Induced relaxation and Anti-Depression. *International Journal of Molecular Sciences* 20.
- Saddoris MP, Cacciapaglia F, Wightman RM, Carelli RM (2015) Differential dopamine release dynamics in the nucleus accumbens core and shell reveal complementary signals for error prediction and incentive motivation. *Journal of Neuroscience* 35:11572–11582.

- Saddoris MP, Wang X, Sugam JA, Carelli RM (2016) Cocaine self-administration experience induces pathological phasic accumbens dopamine signals and abnormal incentive behaviors in drug-abstinent rats. *Journal of Neuroscience* 36:235–250.
- Salamone JD, Correa M (2012) The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron* 76:470–485.
- Salamone JD, Pardo M, Yohn SE, López-Cruz L, Sanmiguel N, Correa M (2016) Mesolimbic dopamine and the regulation of motivated behavior. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*.
- Salinas AG, Mateo Y, Carlson VCC, Stinnett GS, Luo G, Seasholtz AF, Grant KA, Lovinger DM (2021) Long-term alcohol consumption alters dorsal striatal dopamine release and regulation by D2 dopamine receptors in rhesus macaques. *Neuropsychopharmacology* 46:1432–1441.
- Samaha AN, Khoo SYS, Ferrario CR, Robinson TE (2021) Dopamine ‘ups and downs’ in addiction revisited. *Trends in Neurosciences* 1–11.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. *Addiction Biology* 11:2–38.
- Saunders BT, Richard JM, Margolis EB, Janak PH (2018) Dopamine neurons create Pavlovian conditioned stimuli with circuit-defined motivational properties. *Nature Neuroscience* 21:1072–1083.
- Saunders JB (2017) Substance use and addictive disorders in DSM-5 and ICD 10 and the draft ICD 11. *Current Opinion in Psychiatry* 30:227–237.
- Schulteis G, Liu J (2006) Brain reward deficits accompany withdrawal (hangover) from acute ethanol in rats. *Alcohol* 39:21–28.
- Schulteis G, Markou A, Cole M, Koob GF (1995) Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5880–5884.
- Schultz W (2016) Dopamine reward prediction-error signalling: A two-component response. *Nature Reviews Neuroscience* 17:183–195.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology* 80:1–27.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593–1599.
- Schwandt ML, Cortes CR, Kwako LE, George DT, Momenan R, Sinha R, Grigoriadis DE, Pich EM, Leggio L, Heilig M (2016) The CRF1 antagonist verucerfont in anxious alcohol-dependent women: Translation of neuroendocrine, but not of anti-craving effects. *Neuropsychopharmacology* 41:2818–2829.
- Seif T, Chang SJ, Simms JA, Gibb SL, Dadgar J, Chen BT, Harvey BK, Ron D, Messing RO, Bonci A, Hopf FW (2013) Cortical activation of accumbens hyperpolarization-active NMDARs mediates aversion-resistant alcohol intake. *Nature Neuroscience* 16:1094–1100.
- Self DW (2004) Regulation of drug-taking and -seeking behaviors by neuroadaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 47:242–255.
- Seminario MJ, Hansen R, Kaushal N, Zhang HT, McCurdy CR, Matsumoto RR (2013) The evaluation of AZ66, an optimized sigma receptor antagonist, against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and memory impairment in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16:1033–1044.
- Seo D, Jia Z, Lacadie CM, Tsou KA, Bergquist K, Sinha R (2011) Sex differences in neural responses to stress and alcohol context cues. *Human Brain Mapping* 32:1998–2013.

- Seo D, Lacadie CM, Tuit K, Hong KI, Todd Constable R, Sinha R (2013) Disrupted ventromedial prefrontal function, alcohol craving, and subsequent relapse risk. *JAMA Psychiatry* 70:727–739.
- Seo D, Sinha R (2014) *The neurobiology of alcohol craving and relapse*, 1st ed, Handbook of Clinical Neurology. Elsevier B.V.
- Shaham Y, De Wit H (2016) Lost in translation: CRF1 receptor antagonists and addiction treatment. *Neuropsychopharmacology* 41:2795–2797.
- Sheela Rani CS, Ticku MK (2006) Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABAA and NMDA receptor subunits. *Alcohol* 38:89–97.
- Shen RY (2003) Ethanol Withdrawal Reduces the Number of Spontaneously Active Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Conscious Animals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307:566–572.
- Shivani R, Jeffrey Goldsmith R, Anthenelli RM (2002) Alcoholism and psychiatric disorders diagnostic challenges. *Alcohol Research and Health* 26:90–98.
- Shurman J, Koob GF, Gutstein HB (2010) Opioids, Pain, the Brain, and Hyperkatifeia: A Framework for the Rational Use of Opioids for Pain. *Pain Medicine* 11:1092–1098.
- Sibarov DA, Antonov SM (2018) Calcium-Dependent Desensitization of NMDA Receptors. *Biochemistry (Moscow)* 83:1173–1183.
- Siciliano CA, Locke JL, Mathews TA, Lopez MF, Becker HC, Jones SR (2017) Dopamine synthesis in alcohol drinking-prone and -resistant mouse strains. *Alcohol* 58:25–32.
- Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, Bartlett SE (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32:1816–1823.
- Simpson S, Shankar K, Kimbrough A, George O (2020) Role of corticotropin-releasing factor in alcohol and nicotine addiction. *Brain Research* 1740:146850.
- Simpson SA, Wilson MP, Nordstrom K (2016) Psychiatric Emergencies for Clinicians: Emergency Department Management of Alcohol Withdrawal. *Journal of Emergency Medicine* 51:269–273.
- Sjoerds Z, De Wit S, Van Den Brink W, Robbins TW, Beekman ATF, Penninx BWJH, Veltman DJ (2013) Behavioral and neuroimaging evidence for overreliance on habit learning in alcohol-dependent patients. *Translational Psychiatry* 3.
- Smith KS, Berridge KC, Aldridge JW (2011) Disentangling pleasure from incentive salience and learning signals in brain reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.
- Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler S v (2016) DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behavioral neuroscience* 130:137–55.
- Smith RJ, Laiks LS (2018) Behavioral and neural mechanisms underlying habitual and compulsive drug seeking. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 87:11–21.
- Söderpalm B, Löf E, Ericson M (2009) Mechanistic studies of ethanol's interaction with the mesolimbic dopamine reward system. *Pharmacopsychiatry* 42 Suppl 1:87–94.
- Solinas M, Belujon P, Fernagut PO, Jaber M, Thiriet N (2019) Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research, *Journal of Neural Transmission*. Springer Vienna.
- Solomon RL, Corbit JD (1974) An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychological Review* 81:119–145.

- Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2009) Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience* 29:1735–1742.
- Spanagel R (2009) Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews* 89:649–705.
- Spierling SR, Zorrilla EP (2017) Don't stress about CRF: assessing the translational failures of CRF1 antagonists. *Psychopharmacology* 234:1467–1481.
- Stachniak TJ, Ghosh A, Sternson SM (2014) Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a Hypothalamus→Midbrain Pathway for Feeding Behavior. *Neuron* 82:797–808.
- Stavro K, Pelletier J, Potvin S (2013) Widespread and sustained cognitive deficits in alcoholism: A meta-analysis. *Addiction Biology* 18:203–213.
- Steenland P, Fredriksson I, Holst S, Feltmann K, Franck J, Schilström B, Carlsson A (2012) The monoamine stabilizer (-)-OSU6162 attenuates voluntary ethanol intake and ethanol-induced dopamine output in nucleus accumbens. *Biological Psychiatry* 72:823–831.
- Steinberg EE, Keiflin R, Boivin JR, Witten IB, Deisseroth K, Janak PH (2013) A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nature Neuroscience* 16:966–973.
- Sternson SM, Roth BL (2014) Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annual review of neuroscience* 37:387–407.
- Stevenson JR, Schroeder JP, Nixon K, Besheer J, Crews FT, Hodge CW (2009) Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology* 34:1209–1222.
- Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behavioural Pharmacology*.
- Stobbs SH, Ohran AJ, Lassen MB, Allison DW, Brown JE, Steffensen SC (2004) Ethanol suppression of ventral tegmental area GABA neuron electrical transmission involves N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311:282–289.
- Stuber GD, Roitman MF, Phillips PEM, Carelli RM, Wightman RM (2005a) Rapid dopamine signaling in the nucleus accumbens during contingent and noncontingent cocaine administration. *Neuropsychopharmacology* 30:853–863.
- Stuber GD, Wightman RM, Carelli RM (2005b) Extinction of cocaine self-administration reveals functionally and temporally distinct dopaminergic signals in the nucleus accumbens. *Neuron* 46:661–669.
- Sulzer D, Cragg SJ, Rice ME (2016) Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. *Basal Ganglia*.
- Suri RE, Schultz W (1999) A neural network model with dopamine-like reinforcement signal that learns a spatial delayed response task. *Neuroscience* 91:871–890.
- Suzdak PD, Schwartz RD, Skolnick P, Paul SM (1986) Ethanol stimulates γ -aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4071–4075.
- Swift RM (1999) Medications and alcohol craving. *Alcohol Research and Health* 23:207–213.
- Szumliński KK, Ary AW, Lominac KD, Klugmann M, Kippin TE (2008) Accumbens Homer2 overexpression facilitates alcohol-induced neuroplasticity in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology* 33:1365–1378.

Szumliński KK, Lominac KD, Oleson EB, Walker JK, Mason A, Dehoff MH, Klugman M, Cagle S, Welt K, During M, Worley PF, Middaugh LD, Kalivas PW (2005) Homer2 is necessary for EtOH-induced neuroplasticity. *Journal of Neuroscience* 25:7054–7061.

T

Tabakoff B, Cornell N, Hoffman LP (1986) Alcohol tolerance. *Annals of Emergency Medicine* 15:91.

Takahashi Y, Schoenbaum G, Niv Y (2009) Silencing the critics: Understanding the effects of cocaine sensitization on dorsolateral and ventral striatum in the context of an Actor/Critic model. *Frontiers in Neuroscience* 2:86–89.

Tanaka SC, Balleine BW, O'Doherty JP (2008) Calculating consequences: Brain systems that encode the causal effects of actions. *Journal of Neuroscience* 28:6750–6755.

Tepper JM, Lee CR (2007) GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Progress in Brain Research* 160:189–208.

Thompson KJ et al. (2018) DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs in Vitro and in Vivo. *ACS Pharmacology & Translational Science* 1:61–72.

Toyama Y, Kano H, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I (2018) Structural basis for the ethanol action on G-protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115:3858–3863.

Tracy JI (1994) Assessing the relationship between craving and relapse. *Drug and Alcohol Review* 13:71–77.

Trevisan LA, Boutros N, Petrakis IL, Krystal JH (1998) Complications of alcohol withdrawal: pathophysiological insights. *Alcohol health and research world* 22:61–66.

Tricomi E, Balleine BW, O'Doherty JP (2009) A specific role for posterior dorsolateral striatum in human habit learning 29:2225–2232.

Trifilieff P, Ducrocq F, van der Veldt S, Martinez D (2017) Blunted Dopamine Transmission in Addiction: Potential Mechanisms and Implications for Behavior. *Seminars in Nuclear Medicine* 47:64–74.

Trudell JR, Messing RO, Mayfield J, Harris RA (2014) Alcohol dependence: Molecular and behavioral evidence. *Trends in Pharmacological Sciences* 35:317–323.

Trulson ME, Ulissey MJ (1987) Chronic cocaine administration decreases dopamine synthesis rate and increases [3H] spiroperidol binding in rat brain. *Brain Research Bulletin* 19:35–38.

Tupala E, Hall H, Bergström K, Mantere T, Räsänen P, Särkioja T, Tiihonen J (2003) Dopamine D2 receptors and transporters in type 1 and 2 alcoholics measured with human whole hemisphere autoradiography. *Human Brain Mapping* 20:91–102.

Turner KM, Parkes SL (2020) Prefrontal regulation of behavioural control: Evidence from learning theory and translational approaches in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.

U

Ungerstedt U (1968) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology* 5:107–110.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research* 24:485–493.

Ungless MA, Grace AA (2012) Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences*.

V

Valdez GR, Roberts AJ, Chan K, Davis H, Brennan M, Zorrilla EP, Koob GF (2002) Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: Regulation by corticotropin-releasing factor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26:1494–1501.

Valenzuela CF, Jotty K (2015) Mini-review: Effects of ethanol on GABAA receptor-mediated neurotransmission in the cerebellar cortex—recent advances. *Cerebellum* 14:438–446.

Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Aubier B, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2010) Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology* 35:401–415.

Vanderschuren LJ, Minnaard AM, Smeets JA, Lesscher HM (2017) Punishment models of addictive behavior. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 13:77–84.

Vanderschuren LJM, Ahmed SH (2021) Animal Models of the Behavioral Symptoms of Substance Use Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 11:a040287.

Vanderschuren LJM, Di Ciano P, Everitt BJ (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *Journal of Neuroscience* 25:8665–8670.

Vanderschuren LJM, Pierce RC (2009) Sensitization Processes in Drug Addiction In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, pp179–195.

Vanhille N, Belin-Rauscent A, Mar AC, 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* 40:577–589.

Vezina P (2007) Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and humans. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31:1553–1555.

Vezina P, Leyton M (2009) Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* 56:160–168.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM (2004) Dopamine in drug abuse and addiction: Results from imaging studies and treatment implications. *Molecular Psychiatry* 9:557–569.

Volkow ND, Wang GJ, Maynard L, Fowler JS, Jayne B, Telang F, Logan J, Ding YS, Gatley SJ, Hitzemann R, Wong C, Pappas N (2002) Effects of alcohol detoxification on dopamine D2 receptors in alcoholics: A preliminary study. *Psychiatry Research - Neuroimaging* 116:163–172.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C (2007) Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: Possible orbitofrontal involvement. *Journal of Neuroscience* 27:12700–12706.

Volkow ND, Wiers CE, Shokri-Kojori E, Tomasi D, Wang GJ, Baler R (2017) Neurochemical and metabolic effects of acute and chronic alcohol in the human brain: Studies with positron emission tomography. *Neuropharmacology*.

Vollstädt-Klein S, Wichert S, Rabinstein J, Bühler M, Klein O, Ende G, Hermann D, Mann K (2010) Initial, habitual and compulsive alcohol use is characterized by a shift of cue processing from ventral to dorsal striatum. *Addiction* 105:1741–1749.

Voorn P, Vanderschuren LJMJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences* 27:468–474.

W

- Waldvogel HJ, Baer K, Faull RLM (2010) GABA and sleep: Molecular, functional and clinical aspects. *GABA and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects* 1–486.
- Walter HJ, Messing RO (1999) Modulation of neuronal voltage-gated calcium channels by farnesol. *Journal of Biological Chemistry* 95–101.
- Walton ME, Bouret S (2019) What Is the Relationship between Dopamine and Effort? *Trends in Neurosciences* 42:79–91.
- Wang J, Lanfranco MF, Gibb SL, Yowell Q V., Carnicella S, Ron D (2010) Long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum play a crucial role in alcohol consumption and relapse. *Journal of Neuroscience* 30:10187–10198.
- Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytiä P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *Journal of Neuroscience* 16:3474–3485.
- Weiss F, Porrino LJ (2002) Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction: Recent Advances and Challenges. *Journal of Neuroscience* 22:3332–3337.
- Wemm SE, Larkin C, Hermes G, Tennen H, Sinha R (2019) A day-by-day prospective analysis of stress, craving and risk of next day alcohol intake during alcohol use disorder treatment. *Drug and Alcohol Dependence* 204:107569.
- Westbrook A, Braver TS (2016) Dopamine Does Double Duty in Motivating Cognitive Effort. *Neuron* 89:695–710.
- Wetterling T, Junghanns K (2000) Psychopathology of alcoholics during withdrawal and early abstinence. *European Psychiatry* 15:483–488.
- Whitelaw RB, Markou A, Robbins TW, Everitt BJ (1996) Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology* 127:213–224.
- WHO (2018) Global status report on alcohol and health 2018, Global status report on alcohol.
- WHO (1993) The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Diagnostic criteria for research, The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Diagnostic criteria for research.
- Willuhn I, Burgeno LM, Everitt BJ, Phillips PEM (2012) Hierarchical recruitment of phasic dopamine signaling in the striatum during the progression of cocaine use. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:20703–20708.
- Willuhn I, Burgeno LM, Groblewski PA, Phillips PEM (2014) Excessive cocaine use results from decreased phasic dopamine signaling in the striatum. *Nature Neuroscience* 17:704–709.
- Wise RA (2009) Roles for nigrostriatal-not just mesocorticolimbic-dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences* 32:517–524.
- Wise RA (1973) Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia* 29:203–210.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review* 94:469–492.
- Witkiewitz K, Marlatt GA (2004) Relapse prevention for alcohol and drug problems: That was zen, this is tao. *American Psychologist* 59:224–235.

- Witten IB, Steinberg EE, Lee SY, Davidson TJ, Zalocusky KA, Brodsky M, Yizhar O, Cho SL, Gong S, Ramakrishnan C, Stuber GD, Tye KM, Janak PH, Deisseroth K (2011) Recombinase-driver rat lines: Tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 72:721–733.
- Wolf ME (2016) Synaptic mechanisms underlying persistent cocaine craving. *Nature Reviews Neuroscience* 17:351–365.
- Wright JM, Peoples RW, Weight FF (1996) Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Research* 738:249–256.
- Wyvell CL, Berridge KC (2001) Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: Increased cue-triggered “wanting” for sucrose reward. *Journal of Neuroscience* 21:7831–7840.
- Wyvell CL, Berridge KC (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: Enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *Journal of Neuroscience* 20:8122–8130.

X

- Xia F, Richards BA, Tran MM, Josselyn SA, Takehara-Nishiuchi K, Frankland PW (2017) Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *eLife* 6:1–25.
- Xiao C, Zhang J, Krnjević K, Ye JH (2007) Effects of ethanol on midbrain neurons: Role of opioid receptors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31:1106–1113.
- Xu M, Smothers CT, Woodward JJ (2011) Effects of ethanol on phosphorylation site mutants of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol* 45:373–380.
- Xu S, Kang UG (2017) Characteristics of ethanol-induced behavioral sensitization in rats: Molecular mediators and cross-sensitization between ethanol and cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 160:47–54.

Y

- Yaka R, Phamluong K, Ron D (2003) Scaffolding of Fyn kinase to the NMDA receptor determines brain region sensitivity to ethanol. *Journal of Neuroscience* 23:3623–3632.
- Yamaguchi T, Wang HL, Morales M (2013) Glutamate neurons in the substantia nigra compacta and retrorubral field. *European Journal of Neuroscience*.
- Yang H, de Jong JW, Tak YE, Peck J, Bateup HS, Lammel S (2018) Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* 97:434–449.e4.
- Yang Q, Zhang AH, Miao JH, Sun H, Han Y, Yan GL, Wu FF, Wang XJ (2019) Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Advances*.
- Yang Z, Kusumanchi P, Ross RA, Heathers L, Chandler K, Oshodi A, Thoudam T, Li F, Wang L, Liangpunsakul S (2019) Serum Metabolomic Profiling Identifies Key Metabolic Signatures Associated With Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease in Humans. *Hepatology Communications* 3:542.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience* 7:464–476.
- Yin HH, Knowlton BJ (2004) Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learning and Memory* 11:459–463.

- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *European Journal of Neuroscience* 19:181–189.
- Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008) Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: The integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *European Journal of Neuroscience* 28:1437–1448.
- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience* 22:513–523.
- You C, Vandegrift B, Brodie MS (2018) Ethanol actions on the ventral tegmental area: novel potential targets on reward pathway neurons. *Psychopharmacology* 235:1711–1726.
- Yücel M et al. (2019) A transdiagnostic dimensional approach towards a neuropsychological assessment for addiction: an international Delphi consensus study. *Addiction* 114:1095–1109.

Z

- Zahr NM, Pfefferbaum A (2017) Alcohol's Effects on the Brain: Neuroimaging Results in Humans and Animal Models. *Alcohol research : current reviews* 38:183–206.
- Zapata A, Gonzales RA, Shippenberg TS (2006) Repeated ethanol intoxication induces behavioral sensitization in the absence of a sensitized accumbens dopamine response in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Neuropsychopharmacology* 31:396–405.
- Zapata A, Minney VL, Shippenberg TS (2010) Shift from goal-directed to habitual cocaine seeking after prolonged experience in rats. *Journal of Neuroscience* 30:15457–15463.
- Zhang H, Sulzer D (2003) Cellular/Molecular Glutamate Spillover in the Striatum Depresses Dopaminergic Transmission by Activating Group I Metabotropic Glutamate Receptors.
- Zhang Z, Morse AC, Koob GF, Schulteis G (2007) Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31:1811–1819.
- Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF (2014) Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35:234–244.
- Zorrilla EP, Valdez GR, Weiss F (2001) Changes in levels of regional CRF-like-immunoreactivity and plasma corticosterone during protracted drug withdrawal in dependent rats. *Psychopharmacology* 158:374–381.
- Zorzo C, Méndez-López M, Méndez M, Arias JL (2019) Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behavioural Brain Research* 365:170–177.

Résumé :

L'alcoolodépendance est une pathologie chronique qui se caractérise par la recherche et la consommation compulsives d'alcool, la dégradation profonde de l'état émotionnel et motivationnel lors du sevrage et finalement par des phases de rechute régulière. Parmi les différentes théories développées pour expliquer cette pathologie, la théorie de l'allostase dans l'addiction propose que l'état émotionnel et motivationnel négatif et l'usage compulsif d'alcool pourraient résulter de l'altération progressive des systèmes de neurotransmission fondamentaux dans les processus émotionnels et motivationnels. Parmi ces systèmes, la dopamine (DA) est depuis longtemps considérée comme un acteur important de la pathologie. Cependant, son rôle exact reste aujourd'hui mal compris. Des résultats obtenus au sein de notre équipe et d'autres groupes de recherches, suggèrent un rôle important de la voie DA nigrostriée, composée de neurones DA projetant de la substance noire pars compacta (SNc) au striatum dorsal, dans le contrôle des comportements émotionnels et motivés. De plus, différentes études démontrent clairement l'implication du striatum dorsal dans le développement de l'usage compulsif d'alcool.

Basé sur ces observations, l'objectif de ce travail doctoral a été d'étudier l'implication de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée dans les déficits motivationnels et émotionnels associés au sevrage et l'usage compulsif d'alcool.

Pour ce faire, nous avons d'abord mesuré les niveaux de DA de la voie nigrostriée chez des rats exprimant, ou non, un comportement de type compulsif lié à l'alcool. Pour ce faire, des rats ont été entraînés à s'auto-administrer de l'alcool et le caractère compulsif du comportement réalisé a été évalué en couplant l'auto-administration avec la délivrance d'un choc électrique. Cette conséquence négative a permis de discriminer les rats présentant un comportement de type compulsif, qui continuaient à appuyer malgré la conséquence négative, et les rats « non-compulsifs », qui arrêtaient d'appuyer. Des dissections cérébrales ont ensuite été réalisées et les niveaux de DA dans le striatum ont été quantifiés par dosage ELISA. Nous avons observé que les rats « compulsifs » présentaient une diminution des niveaux de DA uniquement au sein du striatum dorso-latéral suggérant alors un état hypodopaminergique de la voie nigrostriée. Nous avons ensuite étudié si l'altération de la voie nigrostriée permettait reproduire l'état émotionnel et motivationnel observés au cours du sevrage. Pour induire expérimentalement cet état, nous avons utilisé l'approche de chémogénétique DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Le récepteur inhibiteur hM4Di a été exprimé sélectivement dans les neurones DA de la SNc en utilisant des rats transgéniques TH-Cre. Pour activer ce récepteur, le composé synthétique C21 a été choisi et des expériences d'électrophysiologie et de microdialyse *in vivo* ont été réalisées pour vérifier que notre approche induisait une hypodopaminergie sélective de la voie nigrostriée. L'effet de cette altération a ensuite été évalué sur les comportements motivés et certains liés à l'anxiété et à la dépression. Nous avons constaté que cet état induisait des déficits motivationnels, mais n'avait aucun effet sur les autres types de comportement. Enfin, nous avons étudié si l'hypodopaminergie de la voie nigrostriée était causalement impliquée dans le développement de la compulsivité associée à l'alcool. Des rats ont été entraînés à s'auto-administrer de l'alcool, puis ceux qui arrêtaient d'appuyer lorsque la conséquence négative était ajoutée ont été sélectionnés. Chez ces animaux, l'induction de l'hypodopaminergie de la voie nigrostriée les a conduits à continuer cette fois-ci à appuyer malgré la conséquence négative, démontrant ainsi que cette altération contribue directement au développement de la compulsivité.

L'ensemble de ce travail doctoral souligne finalement l'implication majeure de l'état hypodopaminergique de la voie nigrostriée dans l'alcoolodépendance, une pathologie où cette voie est encore peu étudiée, alors qu'elle pourrait représenter une pièce importante du puzzle.

Mots clés : Alcoolodépendance, dopamine, compulsivité, chémogénétique, comportement, électrophysiologie, microdialyse

Abstract:

Alcohol addiction, the most severe form of Alcohol Use Disorder (AUD), is a chronic relapsing disorder characterized by compulsive alcohol seeking and drinking and the emergence of a negative emotional and motivational state in absence of alcohol. Among the different theories developed to explain this pathology, the allostasis theory of addiction proposes that the negative emotional and motivational state and the compulsive use of alcohol could result from the progressive alteration of neurotransmission systems fundamental for emotional and motivational processes. Among these systems, dopamine (DA) has long been considered as an important actor in the pathology. However, its exact role remains poorly understood. Previous results from our team and other groups suggested an important implication of the nigrostriatal DA pathway, composed of DA neurons projecting from the substantia nigra pars compacta (SNc) to the dorsal striatum, in emotional and motivated behaviors. Moreover, different studies clearly demonstrate the involvement of the dorsal striatum in the development of compulsive alcohol use.

In this thesis project, we therefore investigated the implication of the hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway in the motivational and emotional deficits associated with withdrawal and compulsive alcohol use.

We first measured DA levels of the nigrostriatal pathway in rats expressing, or not, compulsive alcohol-related behavior. For this purpose, rats were trained to self-administer alcohol and the compulsive nature of the performed behavior was assessed by coupling self-administration with the delivery of an electric shock. This negative consequence allowed discrimination between rats expressing a compulsive alcohol-related behavior, which continued to press despite the negative consequence, and "non-compulsive" rats, which stopped pressing. Brain dissections were then performed and DA levels in the striatum were quantified by ELISA. We observed that "compulsive" rats showed a decrease in DA levels only within the dorsolateral striatum, suggesting a hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway. We next asked whether this nigrostriatal hypoDA leads to a negative emotional and motivational state reminiscent of alcohol withdrawal. To induce a selective and reversible alteration of the nigrostriatal pathway, a chemogenetic approach DREADDs was used. The inhibitory receptor hM4Di was selectively expressed in SNc DA neurons using TH-Cre transgenic rats. To activate this receptor, the synthetic compound C21 was chosen and *in vivo* electrophysiology and microdialysis experiments were performed to verify that our approach induced selective hypodopaminergy of the nigrostriatal pathway. The effect of this alteration was then evaluated on motivated, anxiety-related and depression-related behaviors. We found that this alteration induced motivational deficits but had no effect on the other behaviors. Finally, we investigated whether hypodopaminergic nigrostriatal pathway was causally involved in the development of alcohol-related compulsivity. Rats were trained to self-administer alcohol and then, rats that stopped supporting the negative consequence upon footshocks exposure were selected. In these rats, the induction of hypodopaminergic nigrostriatal pathway led the rats to continue to press despite the negative consequence, demonstrating that this alteration contributes directly to the development of compulsivity.

Taken together, these results highlight the major implication of the hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway in alcohol addiction, a pathology where this pathway is still poorly studied although it could represent an important piece of the puzzle.

Key words: Alcohol addiction, dopamine, compulsivity, chemogenetic, behaviour, electrophysiology, microdialysis