



Action des drogues sur les sous-réseaux dopaminergiques de la VTA dans les processus d'addiction

Tinaïg Le Borgne

► To cite this version:

Tinaïg Le Borgne. Action des drogues sur les sous-réseaux dopaminergiques de la VTA dans les processus d'addiction. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS691 . tel-04554923

HAL Id: tel-04554923

<https://theses.hal.science/tel-04554923>

Submitted on 22 Apr 2024

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 de doctorat de Sorbonne Université

Spécialité Neurosciences
École doctorale Cerveau, Cognition & Comportement

Présentée par :
Tinaïg Le Borgne

Pour obtenir le grade de :
Docteur de Sorbonne Université

Sujet de thèse :

**Action des drogues sur les sous-réseaux dopaminergiques de la VTA dans les
processus d'addiction**

Soutenue publiquement le 24 novembre 2023

Devant le jury composé de :

Dr. Pierre Trifillieff	Rapporteur
Dr. François Georges	Rapporteur
Dr. Camilla Bellone	Examinatrice
Dr. Anna Beyeler	Examinatrice
Dr. Laurent Venance	Président du jury
Dr. Fabio Marti	Directeur de thèse
Dr. Philippe Faure	Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement **François Georges** et **Pierre Trifilieff** pour avoir accepté et pris le temps d'être rapporteurs de ma thèse. Merci pour vos retours positifs et bienveillants ! Je remercie également **Camilla Bellone**, **Anna Beyeler** et **Laurent Venance** qui complètent mon jury de soutenance. Laurent, merci pour tes retours constructifs et encourageants tout au long de cette thèse via les comités de suivi. Je suis reconnaissante et honorée de votre présence qui mènera certainement à une discussion stimulante.

« La thèse n'est pas un sprint, c'est un marathon. »

J'arrive au bout de ces 4 années, légèrement essouffée et avec de nouveaux croisés, mais suis désormais endurcie et mentalement armée.

Fabio, merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse à tes côtés, sur ce projet des inhibés, histoire initiée depuis déjà des années. Les débuts de notre collaboration ont été timides et il aura fallu du temps pour trouver nos repères. Depuis, je mesure le privilège de t'avoir comme directeur de thèse. Merci pour toutes ces discussions, pour ton accessibilité, pour ta bienveillance et pour ta rigueur. Je me dois également de mentionner à quel point tu m'as toujours poussé à aller de l'avant – même lorsqu'absolument rien ne fonctionnait comme imaginé –, à faire plus, toujours plus, jusqu'à parfois me demander quand cela allait s'arrêter. Je suis consciente des opportunités que tu m'as offertes et de tout ce que tu m'as apporté scientifiquement ! Je suis arrivée en ne connaissant rien à la « dopa » et repars avec des bagages bien remplis. Merci de m'avoir permis de vivre cette riche expérience : les montagnes russes que représentent 4 années de thèse ! A toutes ces souris que tu m'as laissées en fin de journée à juxtater, à cette responsabilité des médicaments, à ces chirurgies toujours plus compliquées et à ces expériences toujours plus chiadées. Au-delà de l'aspect scientifique, merci pour tous ces fous rires, tes pétages de câble divers et variés (enos, animalerie, politique et j'en passe), tes bitchages cinglants ainsi que tes nombreuses expressions dont j'ai fait une courte sélection : « pas la fête à neuneu », « ouf maboule », « on s'en bat la mite » ou encore « au hasard balthazar ». Merci pour ces moments de qualité ! J'estime également avoir développé des compétences en haute compréhension du langage Fabio, pouvant désormais détecter des mots prononcés à l'autre bout d'une pièce ou au cours d'un mouvement dirigé vers la sortie, le tout enveloppé dans un nuage de fumée.

Philippe, merci de m'avoir accepté dans cette équipe après un stage de M2 chaotique. Merci pour ton investissement à toute épreuve et pour avoir su recadrer et orienter ce projet. J'ai énormément appris de ta rigueur, de ton exigence, de ton expérience et, je t'en remercie ! Je t'ai craint pendant longtemps (peut être toujours un peu maintenant ?) mais ai également découvert quelqu'un de très humain et décidé à tirer le meilleur de chacun d'entre nous. Tu

n'es pas non plus le dernier à déconner et à tacler à la moindre opportunité. Nous sommes une grande équipe, où plusieurs projets parfois très différents se croisent et s'entremêlent, nous permettant de diversifier nos connaissances et compétences, et comme tous, je suis admirative de ta force à gérer et diriger tout cela à la fois. Parfois rude, parfois drôle, je pense qu'au final la bienveillance est toujours ton maître mot. Merci de m'avoir permis de travailler dans une équipe si riche de diversité et d'opportunités ! Même si je n'ai pas toujours su trouver ma place dans ce projet déjà plus qu'avancé, je vous remercie, toi et Fabio, pour tout ce que vous m'avez apporté.

L'envie de se lever le matin étant nettement corrélée à la qualité des personnes avec qui vous travaillez, je vais maintenant parler de ceux qui ont partagé le plus clair de mon temps ces dernières années.

Léo, ma plus belle rencontre de ces 4 années. Je n'aurais pas imaginé à nos premiers contacts que je te compterai aujourd'hui parmi mes véritables ami(e)s. Débarquées dans cette équipe au même moment, binôme des premiers jours, nous avons patché côte à côte durant une année, dans un placard sans lumière ni espace pour se déplacer, forcément ça rapproche. Nous avons « grandi » ensemble dans cette aventure, faite de très hauts et de très bas. Tu as rendu cette thèse tellement plus belle, plus drôle, plus supportable, tellement plus humaine. Collègue patcheuse, camarade de bitchage favorite, alliée de confiance, soutien inébranlable, aide précieuse, confidente, la liste est longue. Les mots me manquent pour décrire tes qualités et tout ce que tu m'as apporté. Je souhaiterais que tu puisses te voir comme je te vois, possédant tous les éléments pour aller loin, sur le long-terme, de la bonne manière, sans avoir besoin d'écraser ni de diminuer les gens t'entourant, en apportant tendresse, franchise, communication et bienveillance. Te côtoyer m'a fait évoluer, m'aura rendu j'espère un peu meilleure, plus bienveillante, ouverte et plus informée sur un tas de sujets où mon attention ne s'était alors jamais portée. Je suis reconnaissante d'avoir croisé ta route. J'espère que cette belle histoire ne fait que débiter et ne s'arrêtera pas en si bon chemin ! PS : tentez svp de ne pas trop la faire rire, il se pourrait qu'elle s'étouffe en oubliant de respirer.

Maxime, homologue masculin des débuts à la fin. Le M2, le fameux concours de l'ED, puis ces débuts, contre toute attente, dans la même équipe. Les CSI, les deadlines (bien trop nombreuses) jonchant notre parcours, les colloques, les congrès, jusqu'à l'écriture du manuscrit puis la soutenance. Je suis reconnaissante d'avoir eu un bourrin comme toi à mes côtés, pour essayer les pots cassés, aller au casse-pipe en premier, n'avoir peur de rien ni de personne. J'ai beaucoup appris de ta culture, de ton ouverture d'esprit, de tes convictions et de tes ressentis. Et même si tu m'as tapé sur les nerfs plus d'une fois avec cette attitude provocante et désinvolte que tu maîtrises tant, tu as aussi été un soutien plus que précieux et nécessaire pour moi. Sans toi cette thèse n'aurait pas été la même ! Merci pour tous tes délires, tes pétages

de câble, pour ton énergie, pour ta bonne humeur, pour ta bienveillance, pour ta présence, pour ton regard critique et pour tous les biscuits/gâteaux dont tu as alimenté ce bureau 2. Je ne te souhaite que le meilleur pour l'avenir, tu le mérites !

Clément, rencontre tant inattendue que bienvenue, modèle de réussite et de rigueur, source d'inspiration, esprit affuté et aiguisé, rien ne semble te ralentir ou entraver ta détermination. Je ne doute pas que tu réussiras dans tout ce que tu entreprendras ! Merci de m'avoir tant appris, autant scientifiquement qu'humainement. Merci d'être aussi accessible et d'avoir su te montrer si bienveillant. Merci pour cette folie, cette légèreté et cette bonne humeur dont tu as su nous régaler chaque midi passé en ta compagnie. Je te souhaite le meilleur !

Elise, ou boubou2 (pour moi), ce n'est plus pareil sans toi. Ta sincérité, ton entièreté, ton franc-parler et ton humanité m'ont guidé dans mes débuts bancals. A nos prochains verres, concerts, week-ends et escapades ! Ta présence est à la fois apaisante, bienveillante, pétillante et teintée d'humour. Tu es une personne en or. Big up Zazou.

Joachim, fournisseur officiel de Gerblé tantôt miel & sésame tantôt figue & son, bosser dans le bureau 2 n'a étrangement plus la même saveur ces derniers temps. Merci pour tous tes conseils avisés, nos longues discussions sur l'essence même d'une thèse ou sur bien d'autres sujets tout aussi prenants. Tu m'as beaucoup apporté humainement parlant. N'oublie pas qu'un avenir dans le mannequinat – *regard ténébreux* – te tend les bras à tout moment.

Nico, Gustavo, merci de me faire autant rire, d'être aussi décalé tout en étant si calé. Partenaire de résultats négatifs, tu apportes un vent de fraîcheur sur une recherche peut être parfois trop rigide et figée. Ton expérience, ta sincérité, ta science et ta persévérance te mèneront à tes objectifs j'en suis sûre. Méfiance tout de même car derrière ses airs craintifs et innocents, se cache une véritable bitch dévergondée. En l'espace de 2 minutes, vous êtes rhabillé pour l'hiver.

Lauren, maintenant plus parisienne qu'américaine ? Tu m'as beaucoup appris, soutenu, encouragé, aidé et je t'en remercie énormément ! A ces discussions en juxta, comme à ces commérages dans un coin de couloir, à tes petits cours d'anglais improvisés, à ta présence durant mon dernier mois d'écriture où tu es devenue ma nouvelle voisine. Je ne doute pas que ta carrière sera brillante, à l'image de tout ce que tu as accompli jusqu'à présent !

Louison, la seule et l'unique. Merci pour ton aide précieuse durant ton stage de M1, pour ta bonne humeur, ta rigueur et ton investissement. J'ai été ravie de t'encadrer. Je te souhaite le meilleur et je ne doute pas de tes capacités pour mener à bien cette thèse que tu souhaites réaliser.

Aylin, tu es une personne si rayonnante. Ne doute pas de tes capacités et de tout ce que tu as réalisé jusqu'à présent. Tu es douée et je serai plus qu'honorée de t'avoir comme relève. **Yasmine**, une énergie et un renouveau qui sera j'en suis sûre bénéfique à cette équipe, soupoudré d'un caractère bien trempé qui te permettra de relever haut la main les défis qui s'offrent à toi. **Arnaud**, débarqué malgré toi dans cette équipe de fous furieux, tu es le compagnon fort agréable qu'il manquait à ce bureau 2. **Maria**, you've made so much progress que je peux continuer en français. Force et honneur pour la suite de l'histoire.

Alex, merci pour ton expertise et nos discussions, pour toutes ces situations loquaces (« certains customers... » [même si je suis désolée la LED était vraiment violette]), pour ton autodérision, pour essayer d'ouvrir nos esprits de biologistes à un peu de chimie (pas gagné), et pour apporter un peu de légèreté à cette équipe ! **Cécile**, fraîchement arrivée, ta présence féminine fait du bien et porte un vent de renouveau. Vive les légumes ! **Jean-Pierre**, merci pour tes retours constructifs et toujours bienveillants. Tu apportes beaucoup à cette équipe. **Veste**, également capable de rhabiller plus d'une personne pour l'hiver, ton humour cinglant et ton franc-parler font partie des murs de cette équipe. **Robin**, le flegme incarné, tes errances passagères au bureau 2 me manqueront [**Sophie**, c'est comme si tu n'étais jamais bien loin depuis que tu es partie, tout le meilleur pour la suite]. **Nico D.**, une bien belle recrue ! Merci pour ton humour, ta bonne humeur & ton affection pour Port-Blanc (surtout pour Maz !).

La « team cantine », merci (ou pas parfois) pour tous ces débats enflammés, ces séquences bitchages et rattrapages d'actualités. **Mathilde**, derrière cette carapace se cache une personne qui mérite d'être connue, franche, sincère et brillante. Ne laisse personne te faire douter de ta valeur et de tes capacités. **Chloé**, **Alice**, votre arrivée signe un renouveau bienvenu, rempli de fraîcheur, d'énergie et de motivation débordante.

Merci à toutes les personnes de ce couloir qui ont permis de le rendre un peu plus vivant qu'il y a deux ans lorsque nous avons déménagé. **Baptiste**, pour avoir le mérite d'être le nouveau moteur des student meeting, **Clément P.**, **Maelle**, **Charlie**, **Antoine**, **Elisa**, **Lucie**, **Coraline**, **Nisrine**, **Typhaine**, **Laura**, **Jean-Paul** et tant d'autres. Merci les « mouches », merci les « souris ».

Claire, tu as été mon modèle durant toute la durée de cette thèse. Vivre dans ton ombre n'a pas toujours été chose aisée, mais c'est avec l'expérience que je mesure d'autant plus la qualité du travail que tu as effectué. Merci de m'avoir prise sous ton aile, de m'avoir mise sur les rails, d'avoir été si tendre et bienveillante. Je n'aurais pu espérer mieux. Hâte de découvrir ce que tu vas encore nous concocter à l'avenir ! **Sarah**, je suis admirative de ta détermination, de ton ambition et de ta persévérance. Merci de m'avoir également encadrée dès mon arrivée, de m'avoir enseigné les bonnes pratiques du patch jusqu'à m'en effrayer. Ton caractère bien trempé m'a longtemps intimidé mais c'est ce qui te mènera loin j'en suis certaine ! **Benji**, la Bretagne

sure. Je n'oublie pas que c'est toi qui m'as poussé à m'engager dans cette thèse. Merci pour les conseils, pour le soutien et pour la bêtise. Je te souhaite d'être heureux sur ton bout de terre glacé, et que la réussite t'accompagne à chaque pas ! La team des anciens du B2bar, **Cuong, Hervé Arul, Agathe, Salima, Hervé le breton**. Merci pour ces belles années jussieusiennes, merci pour le bar clandestin, pour les soirées, pour les débats, pour les cartes postales (de vacances bretonnes) et autres moments partagés ! Merci à vous qui avez croisé mon chemin et égayé mon quotidien : **Bruno, Sandrine, Bernadette, Ester, Charlotte, Théo, Éric, Tarek, Anne-Claire, Eude, Clarisse, Ella, Reda, Khanh, Otilia, Émilie, Hélène, Sacha**, etc.

La team « pré fou ». **Liz, So, Marine, Audrey, Nankan, Eli, Maïween, Estelle**. Merci pour mes plus belles années étudiantes, des souvenirs à jamais gravés, une passion naissante pour les « neurosciences » noyée dans quelques litres d'alcool bas de gamme au cours de folles soirées dans cet appartement devenu QG. Je ne doute pas que ces belles amitiés perdureront encore un moment et d'ailleurs, à quand notre voyage ?

Les potes du BIP. **Audrey** (encore toi, jamais bien loin depuis notre rencontre, quelle chance j'ai eu de t'avoir à mes débuts parisiens), **Raph, Virginie, Thomas, Antoine**, sans vous le master aurait été sans saveur. Merci pour les rires, les discussions, les révisions et les soirées passées en votre compagnie. Temps si proche et pourtant si lointain. J'ai l'impression de ne pas vous avoir vu depuis des années, chacun absorbé par nos thèses respectives. Notre liberté serait-elle bientôt retrouvée ? **Célia**, le hasard d'une collaboration et maintenant peut-être ton emménagement proche. Ta douceur a été plus que bienvenue dans ce monde de brutes. **Maud**, une bien belle personne, tant brillante qu'adorable, à qui je souhaite le meilleur pour la suite.

MC (solar), Marie-Chantale, Passe-Mu', tu as été le lien me raccrochant à cette double vie bretonne. Merci d'avoir toujours été là depuis notre rencontre au lycée. Comme tu le dis si bien, des TPE sur la schizophrénie à une thèse sur l'addiction à Jussieu, qui l'eut cru ? Les mots me manquent pour souligner à quel point tu as été précieuse durant toutes ces années, et particulièrement durant les 4 dernières. Une épaule inébranlable, un soutien à toute épreuve, bienveillante, encourageante, une capacité à ne jamais minimiser, à comprendre sans avoir besoin d'expliquer. Tu as réussi cette épreuve haut la main, je suis si fière de toi et du chemin parcouru ! Je te souhaite tout le bonheur pour l'avenir, qui j'en suis sûre sera enfin radieux.

Liza, plus de 17 années d'amitié maintenant, amie précieuse, pilier de ma vie, les temps forts sont trop nombreux pour les énumérer ici, mais sache qu'ils ont permis de me maintenir à flot et me rappeler ce à quoi ressemble une vie normale. Tu sais déjà tout, T.F. **Lucie**, ton soutien ne m'a jamais quitté, je mesure l'honneur de t'avoir dans ma vie et de te compter parmi mes véritables ami(e)s, pour j'espère une éternité encore. Ta positivité et ta chaleur ont réchauffé

plus d'une fois mon cœur ! **Léna**, toujours là pour soutenir, pour encourager, pour écouter et pour festoyer. Merci d'être l'amie sur qui l'on peut décider de se reposer. **Maxou**, ce meilleur ami si cher à mon cœur. Nos horaires défiant toute concurrence rendent souvent nos prises de contacts challengeantes mais chaque instant en ta présence n'est que plus précieux. Merci d'être toi. **Yffic**, un honneur de côtoyer un si grand homme, capable de parcourir à la vitesse de l'éclair l'ensemble des terminaux d'un aéroport. Merci pour tous ces moments de qualité. **Perrine**, merci pour ton écoute et ton soutien. Je vous souhaite tout le bonheur, tu le mérites enfin. **Guillaume**, ta connaissance et culture quasi-universelle m'épateront toujours, merci pour le soutien de grand blessé. **Orelsan**, tant d'années passées, tant de changements et pourtant toujours là. Tu es devenu mon fermier préféré. **Kenan, Clara**, à nos futures escapades sportives. **Tom**, que de chemin parcouru depuis ces trajets en bus. Chapeau l'artiste. **Charlotte**, merci d'être là à ta façon, un soutien immuable, derrière ce fort caractère se cache un cœur de guimauve. **Emma**, à ce stage court mais intense, mesure ta valeur, tu mérites le meilleur. **Coco**, à cette cohabitation ponctuelle, j'espère que tu trouveras ta voie.

A mes potes de l'athlé, qui m'avez beaucoup accompagné durant les premières années. **Svevo, Émeline, Océane, Solenn, Olivier, Maxime...** Cela fait longtemps que je ne viens plus mais, quand je serai remise qui sait, peut-être aurai-je maintenant enfin du temps. Svevo, que la force soit avec toi, tu y arriveras !

Armelle, ta présence m'a accompagné durant toute l'écriture de ce manuscrit.

Boub', merci d'être qui tu es, profondément aimant et positif, et de faire de moi quelqu'un de meilleur. Ta présence et ton soutien ont été inestimables cette dernière (rude) année. L'histoire est belle, mais j'espère que nous ne sommes encore qu'au début d'un long chemin. **Brigitte, Patrick**, merci d'être aussi bienveillants et de m'avoir accueilli à bras ouverts dans cette si belle famille.

Mamie, terminé les études, on touche à la fin, enfin. Je chéris chaque moment passé en ta compagnie. **Bleu**, loin des yeux mais (très) près du cœur. Je te souhaite tout le bonheur du monde car tu le mérites, tu es mon soleil et j'aimerais que tu réalises à quel point tu peux briller. Le meilleur est à venir ! **Maman, Papa**, si j'en suis là c'est grâce à vous. Je n'ai pas les mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude. Maman, j'ai probablement hérité d'un soupçon de ta persévérance et de ta détermination dans la vie et, Papa, j'espère un peu de ton dévouement à toute épreuve, de ta résilience et de ton humanité. Aucune tempête ne dure éternellement, aussi violente soit-elle.

Les portes de l'avenir sont ouvertes à ceux qui savent les pousser.

Table des matières

RESUME.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTE DES PUBLICATIONS.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
PREFACE.....	11
CHAPITRE 1 : SYSTEME DE LA RECOMPENSE & DOPAMINE.....	15
I. RECOMPENSE & THEORIES D'APPRENTISSAGE.....	15
a. <i>Récompense & conditionnement</i>	16
b. <i>Récompense & motivation vers un but</i>	19
c. <i>Récompense & prise de décision</i>	21
II. LE SYSTEME DE LA RECOMPENSE.....	24
a. « Centres » de la récompense & dopamine.....	24
b. <i>Récompense & signal dopaminergique</i>	26
III. ACTION DES DROGUES SUR LE SYSTEME DE LA RECOMPENSE.....	29
CHAPITRE 2 : LE CIRCUIT MESOLIMBIQUE (OU MESOCORTICOLIMBIQUE).....	33
I. L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE.....	33
a. <i>Les neurones dopaminergiques</i>	34
b. <i>Les neurones GABAergiques</i>	37
c. <i>Les neurones glutamatergiques</i>	39
d. <i>Co-libération de neurotransmetteurs</i>	40
II. ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES.....	43
a. <i>Modes de décharge des neurones dopaminergiques</i>	43
b. <i>Mécanismes de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques</i>	45
i. <i>Activité pacemaker ou tonique</i>	45
ii. <i>Activité en bouffées ou phasique</i>	46
c. <i>Hétérogénéité de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques</i>	47
d. <i>Dynamiques de libération de la dopamine</i>	48
III. NEUROMODULATION & DOPAMINE.....	49
a. <i>Signalisation dopaminergique</i>	49
b. <i>Régulation de la neurotransmission dopaminergique</i>	52
IV. AFFERENCES & EFFERENCES DE LA VTA.....	54
a. <i>Connectivité & afférences de la VTA</i>	54
b. <i>Régions de projection de la VTA</i>	55
i. Le noyau accumbens.....	55
ii. L'amygdale.....	62

V. EFFET DES DROGUES SUR LA NEUROTRANSMISSION DOPAMINERGIQUE	69
CHAPITRE 3 : RENFORCEMENT A LA NICOTINE & EFFETS NEGATIFS ASSOCIES	71
I. TRANSMISSION NICOTINIQUE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES	71
a. <i>L'acétylcholine</i>	71
b. <i>Les récepteurs nicotiniques au sein du circuit de la récompense</i>	73
i. Structure générale	73
ii. Allostérie	75
iii. Localisation des récepteurs nicotiniques au sein du système nerveux central.....	77
iv. Rôles fonctionnels de la neuromodulation nicotinique.....	77
II. NEUROPHYSIOLOGIE DU RENFORCEMENT A LA NICOTINE.....	78
a. <i>Action aiguë de la nicotine sur la VTA</i>	79
b. <i>Implication de la sous-unité $\beta 2$ dans le renforcement à la nicotine</i>	81
c. <i>Effets d'une exposition chronique à la nicotine et conséquences</i>	84
III. BALANCE DES EFFETS POSITIFS ET NEGATIFS DANS LA PRISE DE DROGUE	86
a. <i>Rôle de la dopamine dans la signalisation de signaux aversifs</i>	87
b. <i>Contrôle de la consommation par les effets aversifs de la nicotine</i>	91
c. <i>L'anxiété induite par une prise de nicotine</i>	93
CHAPITRE 4 : PREMIERE PUBLICATION SCIENTIFIQUE	101
CHAPITRE 5 : SECONDE PUBLICATION SCIENTIFIQUE	157
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GENERALE	207
I. MECANISME DE L'INHIBITION DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DANS UN CONTEXTE DE PRISE DE DROGUES : L'HYPOTHESE D'UNE BOUCLE DE RETROACTION INHIBITRICE.....	207
a. <i>L'hypothèse GABAergique locale</i>	211
b. <i>L'hypothèse de l'activation qui entraîne l'inhibition</i>	212
i. L'inhibition à la nicotine médiée par une libération locale de dopamine.....	212
ii. L'inhibition à la nicotine médiée par une inhibition GABAergique distale.....	213
II. MECANISME DE L'INHIBITION : POINTS COMMUNS AVEC D'AUTRES DROGUES D'ABUS.....	215
III. IMPLICATION FONCTIONNELLE DE CETTE BOUCLE DE RETROACTION INHIBITRICE DANS L'ADDICTION	217
a. <i>Conséquence d'une baisse de dopamine au niveau de l'amygdale</i>	218
b. <i>Rôle de l'effet anxiogène médié par la nicotine</i>	219
c. <i>L'alcool induit-il un effet anxiogène ?</i>	220
d. <i>L'inhibition de la voie VTA-BLA influe-t-elle sur le renforcement ?</i>	221
IV. IMPLICATION FONCTIONNELLE DE CETTE BOUCLE DE RETROACTION INHIBITRICE DANS LE CAS DE RECOMPENSES NATURELLES	223
V. CONCLUSION GENERALE	224
BIBLIOGRAPHIE	227

Résumé

Le tabagisme, qu'il soit actif ou passif, ainsi que la consommation d'alcool souvent associée, sont deux des facteurs qui contribuent le plus au développement du cancer. Comprendre les mécanismes cellulaires et la séquence des événements neuronaux qui conduisent à l'addiction est un enjeu majeur de santé publique. La recherche préclinique a permis de mettre en évidence que la mise en place d'une dépendance est liée à l'action initiale des drogues sur les neurones libérant la dopamine, un neurotransmetteur du système de la récompense. Les neurones produisant cette dopamine, situés dans la région de l'aire tegmentale ventrale (VTA), sont notamment impliqués dans les processus de renforcement, de motivation et de prise de décision. La nicotine, en se liant aux récepteurs nicotiniques des neurones de la VTA, produit une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques, entraînant une forte libération de dopamine dans les structures cibles. La répétition des expositions va entraîner un renforcement positif à la drogue. Outre ses propriétés gratifiantes, la nicotine a également des effets négatifs. Les mécanismes sous-tendant ces effets sont, par contre, mal connus.

La première partie de mes travaux de thèse a montré l'hétérogénéité des réponses induites par la nicotine. Par le biais d'enregistrements juxtacellulaires *in vivo* chez la souris anesthésiée, couplés à des injections de traceurs rétrogrades, nous avons découvert que les neurones dopaminergiques projetant vers le noyau accumbens sont activés par une injection de nicotine (comme traditionnellement décrit auparavant) alors que ceux projetant vers l'amygdale sont inhibés par la nicotine. Ces réponses électrophysiologiques opposées révèlent deux circuits qui médient des effets comportementaux fonctionnellement distincts. L'activation de la voie dopaminergique projetant vers le noyau accumbens produit un renforcement alors que l'inhibition de la voie dopaminergique projetant vers l'amygdale induit de l'anxiété.

La seconde partie de mes travaux a cherché à déterminer quels mécanismes pourraient expliquer l'inhibition des neurones dopaminergiques induite par la nicotine; et si cette hétérogénéité des réponses pourrait s'étendre à une autre drogue comme l'alcool. Nous avons démontré que, comme la nicotine, l'alcool induit deux réponses opposées sur les mêmes sous-populations de neurones dopaminergiques. Connaissant la cible moléculaire de la nicotine, nous avons étudié le mécanisme de l'inhibition induite par cette dernière. Les récepteurs nicotiniques étant des canaux cationiques, dépolarisants, il ne peut s'agir d'un effet direct de la nicotine sur les neurones dopaminergiques. Nous avons constaté que l'inhibition observée en réponse à la nicotine dépendait de l'activation de la population dopaminergique projetant vers le noyau accumbens. Ce mécanisme d'inhibition repose donc sur un fonctionnement de réseau mettant en jeu une boucle de rétroaction inhibitrice. Ce mode d'action serait ainsi partagé par la nicotine et l'alcool. Ces résultats soulèvent la question du rôle de l'inhibition dans l'équilibre entre les effets positifs et négatifs des drogues, un point essentiel qui détermine le début de leur consommation et la transition vers une dépendance.

Abstract

Smoking and alcohol consumption are often associated, and their continued use is associated with negative health outcomes such as the development of cancer. Understanding the cellular mechanisms and sequence of neuronal events that lead to addiction is thus a major public health challenge. Preclinical research has shown that the onset of addiction is linked to the initial action of drugs on dopamine-releasing neurons, a neurotransmitter of the reward system. These neurons, located in the ventral tegmental area (VTA), are notably involved in the processes of reinforcement, motivation and decision-making. When nicotine binds to nicotinic receptors on VTA neurons, it increases the activity of dopaminergic neurons, leading to a strong release of dopamine in the target structures. Repeated exposure leads to positive reinforcement of the drug. In addition to its rewarding properties, nicotine also has negative effects. The mechanisms underlying the negative effects of nicotine are, however, poorly understood.

The first part of my thesis demonstrates the heterogeneity of nicotine-induced responses. By coupling retrograde tracer injections with *in vivo* juxtacellular recordings in anesthetized mice, we discovered that dopaminergic neurons projecting to the nucleus accumbens are activated by nicotine injection (as traditionally described), however those projecting to the amygdala are instead inhibited by nicotine. These opposite electrophysiological responses reveal two circuits mediating the functionally distinct behavioral effects of nicotine: activation of the dopaminergic pathway projecting to the nucleus accumbens produces reinforcement, while inhibition of the dopaminergic pathway projecting to the amygdala induces anxiety.

The second part of my work sought to determine what mechanisms might explain the nicotine-induced inhibition of dopaminergic neurons; and whether this heterogeneity of responses could extend to another drug such as alcohol. We have shown that, like nicotine, alcohol induces two opposite responses on the same subpopulations of dopaminergic neurons. We investigated the mechanism of nicotine-induced inhibition. Because nicotinic receptors are cation channels, this cannot be a direct effect of the drug on dopaminergic neurons. We found that nicotine-induced inhibition depends on activation of the dopaminergic population projecting to the nucleus accumbens. This mechanism of inhibition thus relies on a network function involving an inhibitory feedback loop. Furthermore, this mode of action is shared by nicotine and alcohol. These results raise the question of the role of inhibition in balancing the positive and negative effects of drugs, an essential point which determines the initiation of their use, and the transition to addiction.

Liste des publications

Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe « Neurophysiologie et Comportement » dirigée par Dr. Philippe Faure et Dr. Alexandre Mourot sous la supervision de Dr. Fabio Marti, tout d'abord à l'Institut Paris Seine (IBPS) au sein de l'unité Neurosciences Paris Seine (NPS) dirigée par le Dr. Hervé Chneiweiss (octobre 2019 à août 2021), puis à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI) au sein du laboratoire Plasticité du Cerveau (LPC) dirigé par Dr. Thomas Prémat (septembre 2021 à novembre 2023). Cette thèse a été financée par une ANR obtenue par Dr. Fabio Marti et a donné lieu à deux publications : une en tant que troisième auteure publiée en 2021, et une en tant que première auteure en cours de préparation :

- **Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety.** Nguyen C., Mondoloni S., **Le Borgne T.**, Centeno I., Come M., Jehl J., Solié C., Reynolds L.M., Durand-de Cuttoli R., Tolu S., Valverde S., Didienne S., Hanneke B., Fiancette J.F., Pons S., Maskos U., Deroche-Gamonet V., Dalkara D., Hardelin J.P., Mourot A., Marti F.*, Faure P.*. **Neuron (2021).** *Co-last.
- **Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway through a NAc inhibitory feedback loop.**
Le Borgne T., Nguyen C., Vicq E., Jehl J., Solié C., Guyon N., Daussy L., Reynolds L.M., Gulmez A., Mondoloni S., Tolu S., Pons S., Valjent E., Maskos U., Mourot A., Faure P.*, Marti F.*. **En préparation.** *Co-last.

Les collaborations au sein et en dehors de l'équipe ont également conduit à des publications en tant que co-auteure :

- **Dopamine neuron activity and stress signalling as links between social hierarchy and psychopathology vulnerability.**
Battivelli D., Vernochet C., Conabady E., Nguyen C., Zayed A., Lebel A., Meersman A.C., Messaoudene S., Fieggen A., Dreux G., Rigoni D., **Le Borgne T.**, Marti F., Contesse T., Barik J., Tassin J.P., Faure P., Parnaudeau S., Tronche F. **Biological Psychiatry (2023).**
- **Maternal immune activation disrupts the activity and connectivity of dopaminergic neurons through alterations of synaptic refinement by microglia.**
Delhay C., Marti F., Turlure E., **Le Borgne T.**, Faure P., Le Magueresse C. **En préparation.**
- **Contingency representation and error signaling in mesolimbic dopamine change with exploratory strategy in a decision-making game in mice.**
Come M., Gulmez A., Keshishian L., Jehl J., Bousseyrol E., Didienne S., Vicq E., **Le Borgne T.**, Dalkara D., Mourot A., Faure P. **En préparation.**
- **Nicotine in adolescence freezes dopamine circuits in an immature state.** Reynolds L.M., Gulmez A., Fayad S.L., Costa Campos R., Rigoni D., Nguyen C., **Le Borgne T.**, Topilko T., Rajot D., Franco C., Marti F., Heck N., Mourot A., Renier N., Barik J., Faure P. **BioRxiv.**

Liste des abréviations

AADC	DOPA décarboxylase
AAV	Virus adéno-associé
AC	Adénylate Cyclase
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
Amg	Amygdale
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
$\beta 2^{KO}$	Souris transgéniques délétées pour la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiniques
BLA	Amygdale Baso-Latérale
BNST	Noyau Basal de la Strie Terminale
CeA	Amygdale centrale
ChAT	Choline-Acétyltransférase
ChR2	Channel-Rhodopsine de type 2
CLi	Noyau linéaire caudal
CPA	Aversion de Place Conditionnée
CPP	Préférence de Place Conditionnée
Cre	Cre-recombinase
CS	Stimulus conditionné
D1R	Récepteur à la dopamine de type 1
D2R	Récepteur à la dopamine de type 2
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DAT-D2 ^{KO}	Souris transgéniques délétées pour les récepteurs D2
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
GABA	Acide γ -amino-butyrique
GABA _A	Récepteur GABA de type A
GFP	Green Fluorescent Protein
GIRK	Courant potassique rectifiant activé par les protéines G
Glu	Glutamate

HCN	Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non selective Channel
HFHB	Haute fréquence de décharge et haute activité en bursts
HFLB	Haute fréquence de décharge et basse activité en bursts
HPC	Hippocampe
IC	Intracrâniale
IF	Noyau interfasciculaire
Ih	Courant cationique activé par hyperpolarisation (canaux HCN)
IP	Intrapéritonéale
IPN	Noyau interpédonculaire
IV	Intraveineuse
KO	<i>Knock-out</i> , type délété
Kv	Canal potassique voltage-dépendant
LDTg	Noyau tegmental latérodorsal
LFHB	Faible fréquence de décharge et haute activité en bursts
LFLB	Faible fréquence de décharge et faible activité en bursts
LHb	Habénula latérale
MFB	Faisceau médian du télencéphale
MHb	Habénula médiale
mIPSC	Courants Post-Synaptiques Inhibiteurs miniatures
MLA	Méthyllycaconitine
ml	lemnisque médian
MSN	Neurones GABAergiques épineux
NAC	Noyau accumbens (striatum ventral)
NAcCore	Noyau accumbens, partie du Core
NAcShellLat	Noyau accumbens, partie du Shell Latéral
NAcShellMed	Noyau accumbens, partie du Shell Médial
nAChR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NB	Neurobiotine
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
OF	Paradigme compartimental <i>openfield</i> (arène ouverte)
OFC	Cortex orbitofrontal
OM	Paradigme comportemental de O-Maze
PA	Potentiel d'action
PBP	Noyau parabrachial pigmenté
pDA	Neurone dopaminergique putatif
PFC	Cortex préfrontal

PKA	Protéine kinase A
PN	Noyau latéral paranigral
PPTg	Noyau pédonculo-pontin
RLi	Noyau linéaire rostral
RMTg	Noyau tegmental mésopontin rostro-médian
RPE	Erreur de prédiction de récompense
siPSC	Courants Post-Synaptiques Inhibiteurs spontanés
SK	Canaux potassiques de petite conductance activés par le calcium
SNC	Substance Noire pars Compacta
SNR	Substance Noire pars Reticulata
SWB	Potentiels d'action dans les bouffées
TAN	Interneurone cholinergique à Activité Tonique
TH	Tyrosine Hydroxylase
TTX	Tétradotoxine
VACHT	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VGAT	Transporteur vésiculaire de l'acide γ -amino-butérique (GABA)
VGCC	Canaux calciques voltage-dépendants
VGLUT	Transporteur vésiculaire du glutamate
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
VTA	Aire tegmentale ventrale
WT	Souris de phénotype sauvage (<i>Wild-Type</i>)
YFP	Yellow Fluorescent Protein
5HT3	Récepteur de la sérotonine (5-hydroxy tryptamine)

Préface

La consommation de substances psychoactives conduit à des troubles de la dépendance, caractérisés par un ensemble de symptômes cognitifs, comportementaux et physiologiques qui témoignent de la persistance de la consommation, malgré les effets indésirables qui en découlent (DSM-5 : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 2015). Cette dépendance à une substance va conduire à une recherche compulsive et un désir de consommer dès lors que l'individu est confronté à des stimuli en lien avec la substance. Cette perte de contrôle sur la consommation va également s'accompagner d'un phénomène de manque, c'est-à-dire en l'absence de la drogue, d'états émotionnels négatifs liés au sevrage (dysphorie, anxiété, irritabilité ; Koob, 2006). Ces symptômes de sevrage peuvent pousser l'individu à reprendre la consommation de la substance pour masquer les effets indésirables du manque.

Une des théories de l'addiction est basée sur l'idée que les drogues d'abus détournent le système de la récompense. Ce dernier joue un rôle essentiel dans la régulation de comportements tels que le conditionnement, l'apprentissage par renforcement, la motivation ou la prise de décision. Il est admis qu'une augmentation d'activité des neurones dopaminergiques, et donc une élévation de la libération de dopamine au niveau de structures cibles comme le noyau accumbens, est impliquée dans l'encodage des récompenses et l'évaluation de la valeur subjective des actions associées. Une compréhension approfondie du fonctionnement physiologique de ce système, et de sa modulation par son principal neurotransmetteur – la dopamine –, est essentielle pour comprendre comment les drogues peuvent altérer nos comportements quotidiens liés à la recherche de récompenses. En effet, les substances addictives sont capables de générer un renforcement pathologique, induisant une quête compulsive sans prise en compte des effets négatifs associés et au détriment des récompenses naturelles.

Mon travail de thèse s'est concentré sur la compréhension des mécanismes d'action de substances addictives comme la nicotine et l'alcool, deux drogues qui sont souvent consommées en même temps, et figurent parmi les trois principaux facteurs de risque d'apparition de cancers (Tran et al., 2022). La nicotine agit au niveau du système nerveux, central et périphérique, en se fixant sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. Il existe une grande variété de ces récepteurs nicotiniques, chacun présentant des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques distinctes, ainsi que des fonctions spécifiques. Une fois consommée, la nicotine perturbe l'activité de nombreuses régions du

cerveau, contribuant au développement d'une dépendance. Mon attention s'est portée sur son action au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA), région centrale du système de la récompense. La VTA est une région contenant une grande proportion de neurones dopaminergiques et exprimant une forte densité de récepteurs nicotiniques. Elle a notamment été impliquée dans les mécanismes de renforcement à la nicotine, via une action sur les récepteurs nicotiniques contenant spécifiquement la sous-unité $\beta 2$. Toutefois, la VTA est également une région très hétérogène sur le plan moléculaire, anatomique et fonctionnel. Elle est constituée de plusieurs sous-populations distinctes, notamment dopaminergiques, présentant des afférences et efférences différentes. Aussi, l'étude des mécanismes d'action des drogues au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA doit également prendre en compte cette diversité neuronale.

L'objectif de ma thèse a été de comprendre l'implication des neurones dopaminergiques de la VTA dans les comportements renforçants à la nicotine (effets positifs), mais également dans la balance des effets négatifs. J'ai ainsi cherché à montrer que la nicotine et l'alcool peuvent induire la même hétérogénéité de réponses *in vivo* sur des sous-populations dopaminergiques de la VTA. Ces deux drogues activent (comme traditionnellement décrit auparavant) les neurones dopaminergiques projetant vers le noyau accumbens alors qu'elles inhibent ceux projetant vers l'amygdale. J'ai donc tenté de i) déterminer les mécanismes sous-tendant cette inhibition des neurones dopaminergiques aux drogues, et ii) de comprendre comment cette hétérogénéité des réponses électrophysiologiques pourrait porter des messages antagonistes, positifs ou négatifs, influençant l'initiation ou non d'un renforcement.

L'introduction commencera par définir les théories régissant les comportements de recherche de la récompense, comme le conditionnement, la motivation ou encore la prise de décision, ainsi que le rôle de la dopamine (**Chapitre 1**). Cette première section abordera également comment les drogues agissent et perturbent ce système. Ensuite, je fournirai une explication détaillée de l'hétérogénéité et des caractéristiques fonctionnelles du circuit mésolimbique comprenant la VTA ; en me concentrant en particulier sur deux régions de projection : le noyau accumbens et l'amygdale (**Chapitre 2**). La dernière partie de l'introduction développera la spécificité du renforcement à la nicotine et les effets négatifs y étant associés (**Chapitre 3**). La partie résultats de ce manuscrit s'organisera autour de deux publications issues de mes travaux de thèse : la première déjà publiée, en tant que co-auteure (**Chapitre 4**), et la seconde en cours de préparation (**Chapitre 5**). En conclusion, je discuterai mes résultats de thèse à la lumière de données expérimentales et des études de la littérature (**Chapitre 6**).

Introduction

Chapitre 1 : Système de la récompense & dopamine

L'obtention de récompenses et les conséquences associées sont au cœur de nos comportements quotidiens et régissent bon nombre de nos décisions. Le neuroscientifique Damasio a dit : « La récompense conduit les organismes à s'ouvrir et à se tourner vers leur environnement, à l'approcher, à la rechercher, et ce faisant, à augmenter et leur chance de survie et leur vulnérabilité. Au contraire, la punition conduit les organismes à se refermer sur eux-mêmes, à se figer et à se retirer de leur entourage. ». Dans ce chapitre, j'expliquerai les comportements induits par les récompenses naturelles, tels que l'apprentissage, le conditionnement, le renforcement, la motivation ou bien encore la prise de décision. Puis, nous aborderons les bases neurales de ces différents comportements, encodés au sein de ce que l'on appelle le système de la récompense. Nous verrons également comment la dopamine régule ce système et constitue la cible des drogues d'abus.

I. Récompense & théories d'apprentissage

Il est tout d'abord intéressant de rappeler que les récompenses sont principalement définies par leur effet sur le comportement et pas vraiment par leur qualité (la physique et la chimie des stimuli), comme c'est le cas pour les entrées sensorielles (Schultz, 2006). Le concept de récompense englobe des notions de désir, de quête de plaisir et d'émotions positives. Une récompense peut prendre la forme d'un objet, d'une situation, d'un événement ou encore d'une activité sportive ou artistique. Il est généralement considéré qu'une grande partie de nos comportements sont gouvernés par cette recherche de récompense, à commencer par nos actions les plus élémentaires comme s'hydrater, se nourrir et se reproduire. Une récompense peut donc être végétative (qui concerne les fonctions physiologiques), indispensable pour la survie d'un individu ; comme la boisson, la nourriture ou la reproduction. La composante hédonique associée à ces actions aurait été sélectionnée au cours de l'évolution dans le but de répéter ces comportements nécessaires à la survie de l'espèce (Berridge, 2004; Keramati & Gutkin, 2014; Pessiglione, 2014). On distingue ces récompenses dites primaires, des récompenses apprises par expérience, nommées récompenses secondaires. Celles-ci peuvent être non végétatives ; comme l'argent, l'esthétique, le pouvoir ou la sécurité (Schultz, 2006). Dans un contexte d'éducation, une récompense peut être le moyen d'encourager l'apparition d'un comportement souhaité. Quand un individu réalise une bonne action, il peut obtenir comme récompense un aliment qui lui confère l'envie et la motivation de répéter l'action pour en obtenir davantage. Une récompense peut aussi être un bien matériel que l'on peut donner ou recevoir en échange

d'une action réalisée ou d'un service rendu, ou, au contraire, être immatérielle comme la gratification par autrui. On peut donc recevoir une récompense – un bien tangible comme une médaille ou intangible comme de la reconnaissance – dans le but de valoriser un travail fourni, engendrant de la joie et de la satisfaction.

On comprend donc ici que le concept de récompense fait appel à des notions i) **d'hédonisme**, composante affective, ii) **d'apprentissage**, composante cognitive, et iii) de **motivation**. Elle a une retombée positive sur l'individu, qui aura alors tendance à reproduire la situation pour pouvoir à nouveau obtenir cette récompense.

a. Récompense & conditionnement

En 1927, Yvan Pavlov, un médecin et physiologiste russe, théorise un premier type de renforcement, dans lequel un stimulus va, après apprentissage, conditionner une réaction (Clark, 2004; Schultz, 2006; Watson, 2017). Dans cette première définition, l'individu n'a pas besoin de fournir un effort particulier pour obtenir la récompense. Cette dernière est reçue passivement mais elle déclenche une réaction, un changement de comportement. Dans ses expériences, Y. Pavlov étudie chez le chien le réflexe de salivation après présentation de boulettes de viande. Dès qu'il présente des boulettes de viande au chien, celui-ci se met à saliver. C'est donc une réponse non conditionnée, que l'on pourrait qualifier d'innée. Ensuite, il ajoute un son de cloche, le stimulus neutre, juste avant de donner les boulettes de viande au chien. Après répétition de l'expérience, le chien finit par saliver au moment du son de la cloche et non au moment de la présentation des boulettes et ce, même si les boulettes ne sont pas présentées. C'est ce que Pavlov appellera le **conditionnement classique répondant**, que l'on appelle maintenant le **conditionnement pavlovien**. Il dira : « on parle de conditionnement lorsque l'on observe l'apparition d'un comportement nouveau déclenché de manière involontaire sous l'influence d'un signal provenant généralement de l'environnement ». Dans ce type d'apprentissage, on observe la construction d'une boucle quasi-réflexe, un comportement automatique déclenché par la présentation d'un stimulus. On a ici deux événements, sans aucun rapport initial de causalité : le réflexe, qui est la sécrétion du suc digestif par le biais de la salive – biologiquement signifiant – et, le conditionnement, qui est le signal sensoriel initié par un stimulus neutre au départ. Pavlov définit ainsi le réflexe conditionnel ou conditionné (**Figure 1.1-A**). Il décrit donc la récompense comme un objet qui produit un changement dans le comportement, changement que l'on appelle apprentissage.

Les travaux de Pavlov sont précurseurs du mouvement **behavioriste** du début du XXe siècle, qui est la première formalisation d'une théorie d'apprentissage. Ce courant se base

principalement sur l'idée que l'apprentissage repose sur l'acquisition de nouveaux comportements par conditionnement, c'est-à-dire le changement dans la réponse comportementale suite à la présentation d'un stimulus. La doctrine behavioriste consiste à dire que si l'on renforce de manière positive la réponse comportementale à un stimulus, alors on augmente la probabilité d'apparition de cette réponse.

Toujours dans ce même courant behavioriste, Edward Thorndike démontre que l'apprentissage est une réponse motrice à une perception. Il va définir ce qu'on appelle le **conditionnement opérant** (Pessiglione, 2014; Schultz, 2006; Watson, 2017). Le psychologue américain réalise des expériences de comportement chez le chat. Dans l'une d'entre elles, un chat est enfermé dans une cage avec un loquet et doit trouver, en explorant au hasard, le mécanisme lui permettant d'en sortir et ainsi d'accéder à la nourriture se situant en dehors. Thorndike a noté qu'après plusieurs essais, les chats comprennent comment obtenir la nourriture et sortent plus rapidement de la cage ; le temps pour chaque essai diminuant jusqu'à un certain seuil plancher. Dans les expériences de Thorndike, l'apprentissage est une réponse à une situation donnée, qui reflète l'établissement d'un lien entre une perception (un stimulus) et une réaction motrice (la réponse conditionnée). Le psychologue établit alors deux lois d'apprentissage : 1) *la loi de l'exercice*, où chaque fois qu'une réponse conditionnée est émise en présence d'un stimulus, cela augmente la probabilité que ce stimulus provoque cette réponse conditionnée (la probabilité d'apparition de la réponse augmente avec le nombre d'essais) ; et 2) *la loi de l'effet*, où une action est plus susceptible d'être répétée si elle entraîne une récompense et une satisfaction. La répétition d'une action est donc soit renforcée, soit affaiblie, en fonction de ses conséquences positives ou non sur un sujet. L'individu peut choisir de répéter une action ou un événement car la première expérience a été plaisante. Il obtient donc une récompense car il a fait la bonne action associée. Thorndike va ainsi introduire cette notion de renforcement positif.

John Broadus Watson, psychologue américain, est le premier à expérimenter le conditionnement classique sur un modèle humain en étudiant les comportements de peur chez un enfant de 9 mois (Clark, 2004; Watson, 2017), au cours d'expériences éthiquement critiquables. Comme Pavlov, il s'appuie sur l'association stimulus extérieur / réaction comportementale. Le but de son expérience sur le « petit Albert » est d'essayer de créer une réaction de peur associée à un stimulus neutre. On présente au petit Albert un stimulus neutre, un rat blanc, de façon répétée. Ce dernier n'en a pas peur et joue même avec. Au bout de deux mois, Watson va associer la présentation du rat à un stimulus sonore, un grand coup donné sur une barre métallique. Ce bruit violent va provoquer une réaction de peur chez l'enfant qui va se mettre à pleurer. Le chercheur va répéter l'expérience jusqu'à

ce que le stimulus neutre (le rat) entraîne une réponse conditionnée. L'enfant finit par faire l'association entre le bruit qui lui fait peur et le rat, et il se mettra à pleurer dès qu'un rat lui sera présenté. Ce mécanisme sera également généralisé à d'autres animaux. Cette expérience montre que le conditionnement classique est donc aussi applicable à l'humain.

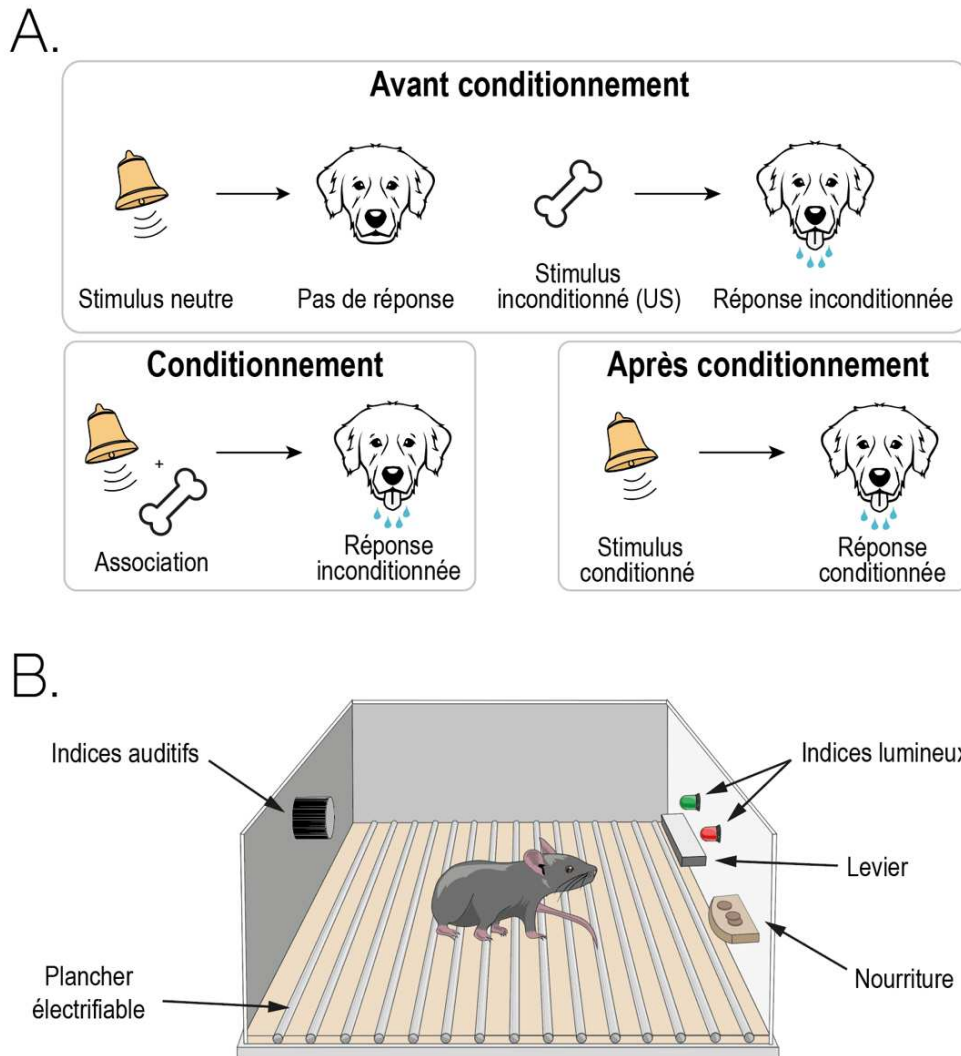


Figure 1.1. Conditionnement pavlovien & conditionnement opérant | A. Principe du conditionnement classique de Pavlov. Avant conditionnement, la présentation d'un stimulus neutre (son d'une cloche) n'évoque pas de réponse comportementale alors que celle d'un stimulus inconditionné (comme de la nourriture) évoque une salivation (réponse inconditionnée). Durant le conditionnement, le stimulus neutre est associé au stimulus inconditionné. Après conditionnement, la présentation du stimulus conditionné (maintenant le son de la cloche) suffit à évoquer une salivation (réponse conditionnée). **B.** Schéma d'une cage opérante de Skinner. Plusieurs variantes sont possibles avec i) des indices qui peuvent être auditifs ou lumineux, ii) la récompense qui peut être de type nourriture solide ou liquide (jus sucré), des stimulations électriques ou optogénétiques, l'injection de drogue, ou iii) la délivrance de chocs électriques (plancher électrifié). L'animal apprend ainsi à faire l'association entre un stimulus et une action (le levier) pour obtenir la récompense.

Dans la continuité de Thorndike, Burrhus Frederic Skinner défend la théorie du **conditionnement opérant** ou instrumental. Ce psychologue et éthologue américain met au point une expérience d'obtention de nourriture chez le rat (Pessiglione, 2014; Schultz, 2006; Skinner, 2011). Dans la boîte opérante de Skinner, on retrouve un levier permettant de délivrer de la nourriture, des indices visuels et sonores ainsi qu'un plancher électrifié (**Figure 1.1-B**). Grâce à cette expérience, Skinner va montrer que toute action aboutissant à une récompense induit un apprentissage. Les rats vont apprendre à appuyer sur le levier pour obtenir de la nourriture. Par le biais de cette boîte opérante, Skinner montre qu'il est possible de conditionner un animal en fonction de différents stimuli sonores ou visuels. Le rat peut alors apprendre qu'il doit appuyer sur le levier seulement si l'indice lumineux est présenté. Il étudie alors l'apprentissage par essai-erreur en présence soit d'un renforcement (nourriture) soit d'une punition (plancher électrifié). Pour Skinner, les travaux de Pavlov sont incomplets et il fait apparaître la notion de « contingence de renforcement » ; en d'autres termes, l'importance de l'obtention d'une récompense dans un *court délai* après un stimulus. Ainsi, pour qu'une action soit renforcée, la réponse comportementale (appui sur un levier) doit être immédiatement récompensée (obtention de nourriture) ou punie (choc électrique). Ces expériences de comportement opérant ont permis d'introduire la notion de valeur (positive ou négative) d'un stimulus.

Le courant behavioriste se concentre donc sur l'étude des changements observables et quantifiables sur le comportement d'un individu après obtention d'une récompense. L'idée d'un apprentissage associatif entre un stimulus et une récompense a permis une analyse approfondie des comportements animaux. Cela inclut le conditionnement classique/pavlovien, qui lie deux événements indépendants, ainsi que le conditionnement opérant, qui associe une action à son résultat. Malgré ces avancées dans la compréhension et la conceptualisation des comportements animaux, il convient de noter que les behavioristes ne prennent pas en compte des processus mentaux tels que l'intention, la représentation d'un but ou la conscience lors de la formation de ces comportements (Schultz, 2006).

b. Récompense & motivation vers un but

Dans la partie précédente, la notion de renforcement a été explicitée dans le cadre de théories d'apprentissage appartenant au courant behavioriste. Nous allons aborder ici la motivation – ou l'incitation – qui arrive *en amont* de la récompense et qui pousse à agir, menant éventuellement par la suite au renforcement. On peut promettre une récompense à

quelqu'un qui va alors travailler pour l'obtenir. La motivation est donc la composante qui va permettre de transformer une récompense anticipée en action comportementale. C'est un état psychologique qui pousse à agir dans le sens du but désiré, permettant ainsi de générer, de s'engager et de maintenir un certain nombre de comportements permettant d'atteindre une récompense. Deux aspects de la motivation ont très tôt été distingués : un effet "directeur", qui détermine le(s) but(s) actuel(s) du comportement (par exemple la nourriture ou l'eau), et un effet "énergisant", qui détermine la force ou la vigueur qui soutient ces actions (Niv et al., 2006).

À la base des comportements animaux, se trouve la nécessité de combler les besoins vitaux comme la nourriture, la reproduction ou sa protection, en évitant tout danger pour l'intégrité physique. Découlant de cela, la définition de la motivation s'est longtemps basée sur le principe de régulation homéostatique (Pessiglione, 2014), un concept développé par le physiologiste Claude Bernard. Selon ce principe, « tout système laissé à lui-même en l'absence de perturbations, revient spontanément à un état d'équilibre au travers d'une série de processus régulateurs ». Ainsi, tout écart par rapport à un "point de référence" va provoquer des ajustements comportementaux visant à réguler et rétablir cet équilibre. Par exemple, en cas d'hypoglycémie, le mécanisme de recherche alimentaire est enclenché pour rétablir le niveau de glucose (Pessiglione, 2014). La détection d'un déficit va donc engendrer des mécanismes de correction par le biais d'un moteur motivationnel permettant ainsi la mise en place de réponses appropriées pour stabiliser l'organisme au point de référence (Berridge, 2004). Cette explication de la motivation s'applique à des récompenses dites primaires mais elle ne peut expliquer tous les autres types de récompense. Les notions de désir et d'hédonisme permettent d'expliquer la recherche de récompenses qualifiées de secondaires, qui ne répondent pas à une régulation homéostasique. Un individu est ainsi capable de se représenter le plaisir d'une récompense, même si les besoins vitaux sont assouvis. Cela peut suffire à s'engager dans un comportement, manger des crêpes ou des bonbons, même si l'organisme a déjà eu une quantité suffisante de nourriture lors du repas précédent et n'en a pas besoin pour sa survie.

Au cours du XXe siècle, plusieurs définitions de la **motivation incitatrice** se sont succédées parmi les neuroscientifiques spécialistes du comportement. A partir de travaux précédemment réalisés par Sherrington, Wallace Craig a proposé que tout comportement motivé pouvait être divisé en deux phases : initialement une *phase appétitive* – l'approche flexible avant d'arriver au but –, qui précède une *phase de consommation* – déclenchée par l'atteinte du but – (Berridge, 2004). Vers les années 1970, Teitelbaum a ensuite proposé que la motivation serait capable d'induire un comportement opérant flexible. Il suggère que,

lorsqu'un individu apprend une nouvelle stratégie pour atteindre un objectif, ce n'est pas seulement réflexe ou instinctif, mais cela démontre une réelle motivation pour y parvenir : il y a alors mise en place d'un effort spécifique pour arriver à obtenir la récompense (Berridge, 2004). Dans ce contexte, le comportement instrumental peut être assimilé à cette phase appétitive, qui précède l'accomplissement de l'objectif, i.e. la récompense. Pour Teitelbaum, cette phase appétitive est essentielle dans la définition de motivation. En effet, la modulation de la phase de consommation seule n'est pas suffisante pour parler de motivation. En 1980, Epstein ajoute trois nouveaux critères pour étoffer la définition de ce qu'est la motivation : i) **l'orientation flexible** des objectifs vers un but, ii) **la prévision** d'un objectif, et iii) **l'affect** (Berridge, 2004).

La flexibilité peut se définir par la mise en place d'une nouvelle stratégie cognitive ou spatiale pour atteindre un objectif, malgré un changement de contexte ou de règle. La flexibilité affine ainsi la définition de motivation, qui est bien plus qu'une simple orientation vers un but.

Un second critère important est la capacité à anticiper un objectif et à former une représentation de ce que peut constituer une récompense. Par exemple, Crespi a montré qu'un rat était capable d'ajuster sa vitesse de déplacement en fonction de la quantité de nourriture qu'il pouvait obtenir (Crespi, 1942). Ce comportement montre que le rat adapte progressivement sa vitesse d'atteinte de la récompense proportionnellement à la taille de cette dernière. En d'autres termes, quand la récompense est soudainement augmentée, le rat est susceptible de se diriger plus rapidement vers la récompense à l'essai suivant. Il est donc capable de se représenter la quantité et la valeur de la récompense qu'il peut obtenir, basé sur les essais antécédents (Crespi, 1942). La vitesse de déplacement de l'animal, ou la vigueur de l'action vers le but, reflète la motivation à se diriger vers la nourriture.

Enfin, le troisième critère de Epstein suggère que la motivation est teintée de réactions affectives envers l'objectif. Ainsi, la motivation est orientée vers des buts hédoniques et déclenche donc une réaction émotionnelle. Selon lui, la présence de réactions affectives prouve que le comportement est réellement motivé.

c. Récompense & prise de décision

Précédemment, nous avons abordé les théories et mécanismes de l'apprentissage, en mettant l'accent sur le conditionnement et l'apprentissage par renforcement, dans le cadre de tâches dites opérantes. Toutefois, dans un environnement naturel et non contraint, un individu est confronté à des choix pour obtenir des récompenses. La prise de décision est une action cognitive qui va sélectionner une action ou des options parmi plusieurs

alternatives, en se représentant les différentes conséquences que cela pourrait engendrer. Il est généralement considéré que cette construction de préférence est basée sur un mécanisme d'évaluation des options disponibles au moment du choix (Glimcher & Rustichini, 2004; Kable & Glimcher, 2009; Rangel et al., 2008). Plusieurs étapes peuvent être distinguées dans un processus de prise de décision basé sur la valeur. Cela implique la construction d'une représentation de la situation, l'évaluation de la **valeur des options**, la sélection de l'action et enfin l'ajustement des comportements futurs en fonction de ces informations, c'est-à-dire l'apprentissage (Ernst & Paulus, 2005; Rangel et al., 2008). Ce processus est influencé par une gamme de facteurs cognitifs, émotionnels et biologiques, et il joue un rôle crucial dans l'apprentissage et l'adaptation des comportements individuels.

Le processus commence par la construction d'une représentation mentale de la situation qui nécessite une décision. Cette représentation intègre des informations à propos de l'état interne de l'individu (comme la faim, la soif, etc.), d'informations externes (comme la disponibilité de la nourriture, le niveau de danger, etc.), ainsi que sur les différentes options qui s'offrent à lui. La construction de la préférence d'une option consiste à jauger à quel point l'option est plaisante, à évaluer la valeur attendue des options disponibles au moment du choix (Rangel et al., 2008). Un animal peut ainsi évaluer si une option A présente un intérêt (valeur positive) ou plutôt une menace (valeur négative) par rapport à une option B (Pessiglione, 2014). Le choix est connoté d'une valeur subjective puisqu'il va s'agir de se représenter les conséquences de la décision en question. Chaque action va pouvoir être sélectionnée en fonction de la valeur subjective qu'elle représente (Pessiglione & Lebreton, 2015). En effet, le choix est influencé par une composante émotionnelle, dont le vécu de l'individu (ses expériences passées), mais également par les paramètres externes de son environnement et ses paramètres corporels (informations intéro et extéroceptives) au moment du choix. Si l'individu a faim ou soif, cela influencera forcément son choix entre, par exemple, de la nourriture ou de la boisson. On peut également se retrouver confronté à devoir choisir entre une crêpe ou un gâteau, les deux étant de la nourriture, le choix se fera en faveur de l'objet présentant la valeur subjective la plus importante. Une fois la situation représentée, l'individu associe une valeur à chaque option en fonction de ces paramètres. L'objectif est de prédire de la manière la plus précise possible les conséquences probables de chaque option. Cette évaluation peut être influencée par des facteurs tels que la probabilité d'obtenir une récompense, la saillance de la récompense (son intensité ou son contraste par rapport à l'environnement), ou encore le délai avant de recevoir la récompense (Ernst & Paulus, 2005).

Après avoir évalué la valeur de chaque option, l'individu sélectionne une action en fonction de la valeur subjective attribuée à chaque option. Il choisira généralement l'option qui présente la valeur la plus élevée mais d'autres facteurs, telles que les émotions et les expériences passées, peuvent également influencer ce choix. Pour réaliser cette étape, les actions concurrentes doivent être inhibées pour mettre en œuvre la séquence d'action adéquate (Ernst & Paulus, 2005). Dans le processus de décision, on peut distinguer deux stratégies importantes (J. D. Cohen et al., 2007; Spence, 1964). D'une part il y a l'exploitation, qui consiste à continuer d'effectuer les actions que l'on sait déjà réaliser et qui ont la plus forte valeur. Cette stratégie permet d'optimiser les récompenses sur du court terme. Un animal sait qu'à un endroit spécifique de son environnement il va trouver de la nourriture qui lui permet de subsister donc il va y retourner chaque jour. D'autre part il y a l'exploration, qui consiste cette fois à s'éloigner de ce que l'on connaît déjà. Cela implique de s'éloigner d'un quotidien prédéfini et de se diriger vers une zone inconnue afin de trouver de nouvelles informations. C'est une stratégie plus à risque que l'exploitation mais qui permet de maximiser les récompenses sur le long-terme. Si un animal vient à explorer un nouveau territoire dans un environnement naturel, il peut alors : soit ne pas trouver de nourriture et donc le choix de l'exploitation aurait peut-être été plus bénéfique sur le moment, soit au contraire trouver un nouveau point de nourriture où celle-ci s'avère plus nourrissante et plaisante que celle dont il était coutumier. Dans cette stratégie, la notion d'incertitude rentre en compte du fait que l'individu ne sait pas toujours quand se produira la récompense ni de quelle nature elle sera.

Une fois que l'action est faite, l'individu évalue les conséquences de cette action par rapport à ce qu'il avait initialement anticipé. Cette évaluation des résultats obtenus par rapport aux attentes initiales est essentielle pour ajuster les processus de prise de décision à venir. Cette comparaison génère **l'erreur de prédiction de la récompense (RPE)**. Bien souvent, une différence est observée entre la valeur attendue et celle obtenue. Une RPE positive indique que la récompense obtenue est meilleure que prévue, tandis qu'une RPE négative indique le contraire. Cette erreur de prédiction de la récompense, conceptualisée dans le cadre des théories de l'apprentissage, jouerait un rôle crucial dans l'apprentissage et l'ajustement des comportements futurs (*voir partie II.b. pour le rôle de la dopamine dans la RPE*). Elle permet de mettre à jour les valeurs attribuées à différentes options et ainsi d'adapter les choix futurs (Ernst & Paulus, 2005; Pessiglione, 2014; Pessiglione & Lebreton, 2015).

La prise de décision est donc un ensemble de processus faisant intervenir des paramètres cognitifs, moteurs et émotionnels : i) qui vont tout d'abord reposer sur la construction de valeurs des options disponibles dans l'environnement d'un individu, permettant la formation

d'une préférence pour une des options, ii) l'initiation et la réalisation d'une action appropriée en lien avec l'option préférée, et iii) l'obtention du résultat (ou récompense) avec l'actualisation de la valeur réelle de ce dernier influençant les comportements futurs (exploration/exploitation).

II. Le système de la récompense

Les processus comme l'apprentissage, la motivation ou encore la prise de décision sont essentiels à la recherche et l'acquisition de récompenses. Cette section explorera les différentes régions et circuits qui composent le système de récompense, ainsi que la manière dont la dopamine (DA) modifie son fonctionnement. Ce neurotransmetteur joue un rôle essentiel dans l'encodage de la récompense, et nous verrons par quel biais il régule des fonctions d'apprentissage, de motivation ou encore de prise de décision.

a. « Centres » de la récompense & dopamine

La découverte et compréhension du système de la récompense ainsi que son mode de fonctionnement se sont réalisées en plusieurs étapes. Les travaux pionniers de Olds et Milner ont, en 1954, permis de cartographier plusieurs zones du cerveau impliquées dans le renforcement positif (Olds & Milner, 1954). Pour ce faire, ils ont procédé à l'implantation d'électrodes de stimulation dans différentes régions de cerveaux de rats. Les animaux étaient ensuite placés dans des boîtes opérantes de Skinner, là où ils pouvaient appuyer sur un levier pour s'auto-administrer des stimulations électriques dans les zones cérébrales implantées. Les rats appuyaient alors pour s'auto-stimuler, de manière fréquente et aussi longtemps qu'il leur était permis d'être dans la boîte (Olds & Milner, 1954). Cette tâche d'auto-stimulation déclenchait donc un système d'association entre un levier et une récompense. Suite à ces expériences, plusieurs régions ont alors été décrites comme « les zones du plaisir », compte tenu des propriétés renforçantes provoquées par les stimulations induites dans ce conditionnement opérant (Milner, 1991; Olds & Milner, 1954). Ce paradigme d'auto-administration a ainsi pour conséquence de « créer » une valeur associée à la stimulation électrique, mettant en évidence une stimulation directe des régions cérébrales liées au système de la récompense, et ce, sans passer par les stimulations sensorielles ou externes à l'animal comme dans le cas des conditionnements classiques. Grâce à ces expériences, Olds identifie en 1956 le « **medial forebrain bundle** » (MFB) comme un élément central du système de la récompense (Olds, 1956). Suite à cela, Marianne et Jim Olds démontrent, en 1963, un renforcement positif plus important lors de

la stimulation du MFB au niveau de l'hypothalamus latéral et du tegmentum ventromédial. Ces expériences de stimulation électrique du MFB ont permis de mettre en évidence plusieurs régions innervées par ce dernier dont : l'hypothalamus, le mésencéphale, le striatum, les cortex frontaux (préfrontal ou prélimbique, PFC ; orbitrofrontal, OFC), l'amygdale et le septum (Wise, 2005 ; Wise & Rompre, 1989 ; **Figure 1.2**). A noter que, dans ces expériences de stimulations électriques intra-cérébrales, certaines régions stimulées ont également pu provoquer des effets aversifs ou encore ne pas provoquer d'effets (neutre ; Olds et al., 1960). Additionné à ces découvertes, le recours à des techniques d'immunohistochimie et d'imagerie par rayons X a permis de valider la localisation des électrodes de stimulation et ainsi de cartographier les différentes zones cérébrales impliquées dans le renforcement positif.

Par ailleurs, les interconnexions spécifiques entre ces différentes régions ont été mises en évidence au moyen de lésions effectuées chez le rat mais aussi chez d'autres modèles animaux comme le chat ou le singe (Milner, 1991). Ces régions identifiées comme des « centres » du plaisir ont donc rapidement été considérées comme un ensemble de sous-circuits et non comme des régions isolées, formant ainsi le « système de la récompense » (**Figure 1.2**).

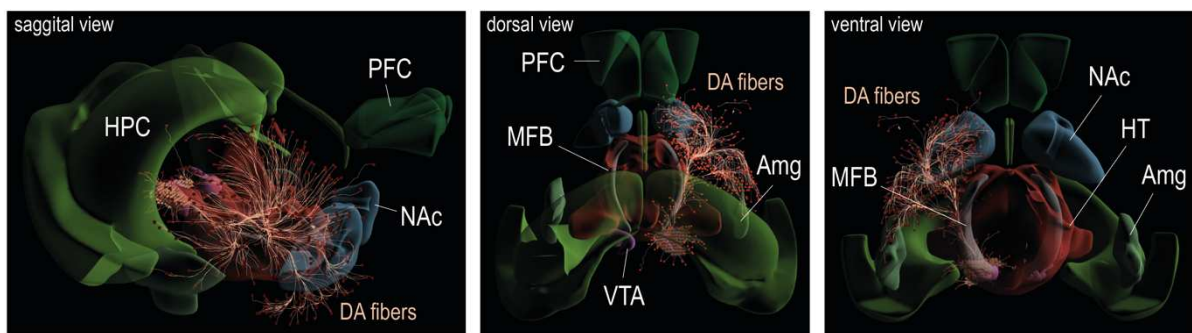


Figure 1.2. Système de la récompense | Visualisation en 3D d'après le « Allen Brain Explorer » du circuit mésocorticolimbique ou système de la récompense chez la souris. Représentation de côté (gauche), vu du dessus (milieu) ou vue du dessous (droite). Les fibres dopaminergiques sont représentées en orange. HPC : hippocampe ; PFC : cortex préfrontal et prélimbique ; NAc : noyau accumbens ; MFB : medial forebrain bundle ; VTA : aire tegmentale ventrale ; Amg : amygdale ; HT : hypothalamus.

L'émergence d'études pharmacologiques a permis de mieux comprendre la régulation du système de la récompense. Une grande partie de ces découvertes est due à l'utilisation d'antagonistes spécifiques des monoamines. Les monoamines sont des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés dont les catécholamines, dérivées de la tyrosine, et les tryptamines, dérivées du tryptophane. En 1956, il a été montré que l'utilisation de bloqueurs des

catécholamines induisait une diminution de l'auto-stimulation chez des rats où des électrodes de stimulation intracrânienne étaient implantées au niveau de l'hypothalamus ou du septum (Olds et al., 1956). Par la suite, la présence de fibres monoaminergiques a été identifiée au sein du MFB (Dahlström & Fuxe, 1964; Hillarp et al., 1966). Les techniques d'immunohistochimie ont mis en évidence la présence de deux neurotransmetteurs catécholaminergiques, la noradrénaline (ou norépinéphrine) et la DA, ainsi qu'un neurotransmetteur tryptamine, la sérotonine. Bien que la théorie de la norépinéphrine ait été soutenue comme substrat neurophysiologique de la récompense (David Wise & Stein, 1969), elle a été remise en cause au profit d'une théorie dopaminergique. En effet, Carlsson et Hillarp ont montré en 1958 que la DA et la norépinéphrine étaient présentes en proportion similaire dans le cerveau, et donc que la DA n'était pas seulement un précurseur dans la synthèse de la norépinéphrine (comme alors considéré), mais bien un neurotransmetteur à part entière. De plus, un cluster impliqué dans les comportements d'auto-administration a ensuite été identifié au niveau du tegmentum ventral contenant les noyaux dopaminergiques (Crow, 1972). Additionnée à cela, l'utilisation de pimozide, antagoniste spécifique de la DA, a montré une suppression des comportements d'auto-administration (Phillips et al., 1989). En conclusion, ces études ont montré que la stimulation des fibres du MFB active les axones en provenance des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et de la substance noire, aboutissant à la modulation des structures en aval (Wise, 2005). Ainsi, la DA a été identifiée comme le neurotransmetteur principal du système de la récompense, permettant la transmission d'informations entre les régions impliquées (Milner, 1991).

Les expériences de stimulation électrique du MFB ont permis de cartographier les régions cérébrales constituant ce circuit, mais également de montrer que la stimulation directe du MFB est capable de « simuler » une récompense. En effet, la stimulation électrique ne déclenche pas directement de mouvement ou de comportement spécifique mais crée une valeur et une représentation de la récompense via la stimulation directe des fibres dopaminergiques. Ces expériences d'auto-stimulation ont donc ouvert le champ aux recherches sur le rôle de la dopamine au sein du système de la récompense.

b. Récompense & signal dopaminergique

Le rôle des neurones dopaminergiques dans l'évaluation des récompenses a été mis en évidence par des séries d'expériences électrophysiologiques qui ont démontré le lien entre l'activité du système dopaminergique et les différentes composantes du processus

d'évaluation. Le système dopaminergique s'active à la présentation d'une récompense et permet la transmission d'informations entre régions impliquées. Les différentes études ont permis de montrer que cette activation ne signale pas le plaisir mais code un signal d'apprentissage qui peut être utilisé pour apprendre la valeur subjective des actions : l'erreur de prédiction de la récompense (RPE).

L'enregistrement de neurones dopaminergiques du mésencéphale chez le singe a permis d'aborder une compréhension, cette fois, non plus uniquement basée sur les changements comportementaux, mais également sur les propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques régissant le système de la récompense (Ljungberg et al., 1992; Mirenowicz & Schultz, 1994, 1996; Schultz, 1997b, 1997a). Les travaux menés dans l'équipe de Wolfram Schultz ont démontré qu'une activité en bouffées des neurones dopaminergiques de la VTA, synchronisée avec l'arrivée d'une récompense, entraîne une libération massive et transitoire de DA – 50 à 110 ms après l'arrivée du stimulus et durant moins de 300 ms – que l'on qualifie de phasique (*voir Chapitre 2, partie II. pour plus de détails sur la décharge des neurones dopaminergiques in vivo*). C'est ce mode de libération **phasique**, spécifique de la dopamine, au niveau notamment du noyau accumbens (NAc, partie ventrale du striatum), qui est associé à l'apprentissage par renforcement et la prédiction de récompense.

Un élément essentiel de la démonstration du rôle de la DA dans l'apprentissage a été apporté par Schultz dans une expérience désormais incontournable, où il enregistre les neurones dopaminergiques au cours d'une association pavlovienne (Ljungberg et al., 1992 ; **Figure 1.3-A**). Au début de l'expérience, c'est-à-dire avant apprentissage, une goutte de jus de fruit (récompense) est délivrée de manière imprévisible et déclenche une activation phasique, rapide et transitoire, des neurones dopaminergiques. Par la suite, un stimulus lumineux neutre est associé à la goutte de jus de fruit, une seconde avant sa distribution. De manière surprenante, après plusieurs répétitions de cette association, les neurones dopaminergiques s'activent de manière phasique, non plus au moment de la distribution de la récompense, mais au moment de l'apparition de l'indice visuel qui est devenu un stimulus conditionné. Une troisième condition consiste à présenter l'indice visuel mais à ne pas présenter la récompense (omission). Dans ces expériences d'omission, les neurones dopaminergiques s'activent toujours au moment du stimulus conditionné mais leur fréquence de décharge diminue en dessous de leur taux d'activité basal, au moment où la récompense aurait dû être délivrée.

Si l'on prend l'activité du neurone au moment de la délivrance de la récompense, on constate que les neurones dopaminergiques ne se contentent pas de signaler la survenue

d'évènements appétitifs. En effet, leur activité semble plutôt coder un écart ou une erreur entre la récompense effectivement reçue et les prévisions concernant le moment et l'ampleur de la récompense (**Figure 1.3-B**). Cette série d'expériences montre que les neurones dopaminergiques émettent un signal positif si un événement appétitif est meilleur que prévu (non prédit) ; aucun signal si un événement appétitif se produit comme prévu ; et un signal négatif si un événement appétitif est moins bien que prévu. C'est ce calcul que l'on nomme RPE et qui peut être utilisé pour évaluer la valeur associée à une récompense (**Figure 1.3**).

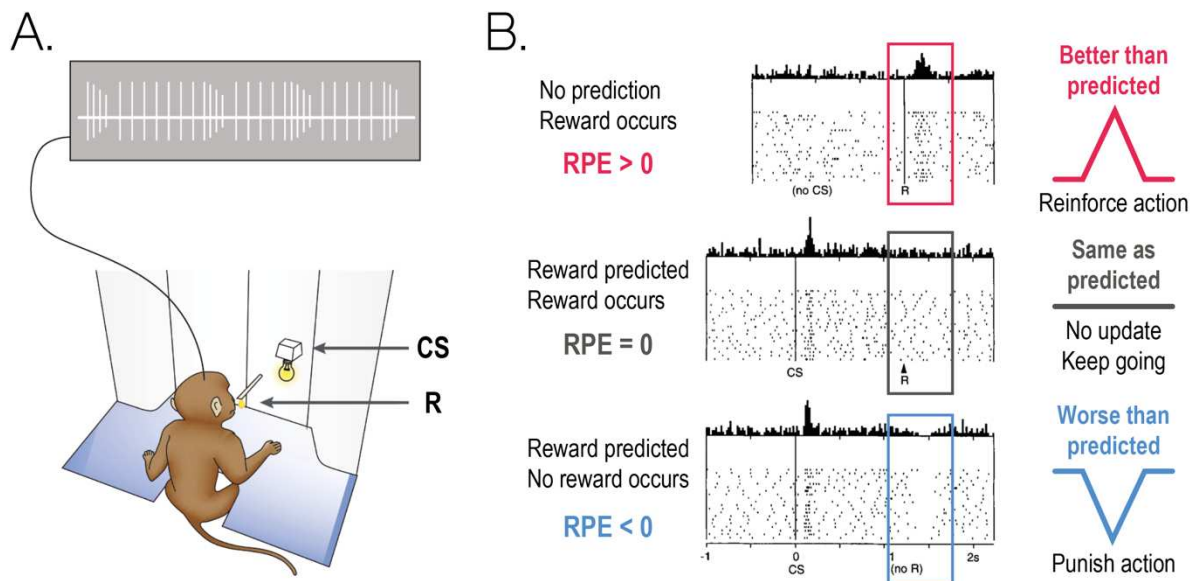


Figure 1.3. Récompense, dopamine & RPE | A. Schéma du dispositif de conditionnement d'un singe entraîné à prédire la délivrance d'une récompense (goutte de jus de fruit, R) après présentation d'un indice lumineux (stimulus conditionné, CS). **B.** Exemple de l'activité d'un neurone dopaminergique à différentes étapes du conditionnement. Chaque point est un potentiel d'action et chaque ligne est un essai (raster plot). Avant apprentissage, un pic de DA est observé au moment de la délivrance de la récompense de manière inattendue. Le singe obtient donc une récompense qu'il n'attendait pas donc $RPE > 0$ (haut). Après apprentissage, le CS prédit la distribution de la récompense et celle-ci est délivrée comme attendue. Le singe obtient ce qu'il attendait donc $RPE = 0$ (milieu). Si le CS prédit la récompense mais que celle-ci n'est pas délivrée, on observe une baisse d'activité dopaminergique. Le singe n'obtient pas ce qu'il avait prédit donc $RPE < 0$ (bas). *Adapté de Schultz et al. 1997 & Bromberg-Martin et al. 2010.*

Il est à noter que le rôle de la DA phasique au moment de l'indice visuel précédant une récompense (ou au moment de l'initiation d'une action), reste débattu. En effet, le pic dopaminergique prédictif observé au moment du stimulus conditionné pourrait refléter un apprentissage, mais également une composante motivationnelle pour l'essai en cours. Nous l'avons vu, le comportement motivé peut se découper en phases, où l'animal doit dans un premier temps s'approcher ou rechercher le stimulus renforçant l'objectif. Afin de

comprendre si le signal phasique dopaminergique code uniquement pour la RPE ou bien également pour d'autres paramètres tels que la motivation ou la prise de décision, une manipulation optogénétique des neurones dopaminergiques a été réalisée au sein de mon équipe de thèse. Il a ainsi été montré qu'une inhibition optogénétique de l'activité phasique précoce, c'est-à-dire juste avant d'atteindre la récompense, avait un impact sur des paramètres reflétant la vigueur et la motivation des animaux à effectuer la tâche (Bousseyrol et al., 2023).

Ces différentes données nous montrent donc que l'activité phasique des neurones dopaminergiques code pour la RPE, mais également pour une composante motivationnelle, reflétée par la vigueur déployée par l'animal pour effectuer la tâche et obtenir une récompense.

III. Action des drogues sur le système de la récompense

Comme nous venons de le voir, le système de la récompense et son principal neurotransmetteur, la DA, sont impliqués dans les processus de conditionnement, d'apprentissage par renforcement, de motivation et de prise de décision. Il est maintenant très largement considéré que les drogues d'abus, du fait de la répétition des expositions, vont conduire par renforcement à une consommation associée à une perte de contrôle sur la prise, et ce, malgré les conséquences négatives de ces drogues. Le renforcement aux récompenses naturelles s'effectue par essai-erreur et l'individu oriente et ajuste en permanence ses choix de manière flexible afin d'obtenir des récompenses satisfaisantes. Toutefois, les récompenses dites « non naturelles », comme les drogues d'abus, vont détourner le système de la récompense, produisant un renforcement tout en s'affranchissant des notions d'efforts ou d'effets négatifs associés à la drogue. En effet, si les drogues addictives sont consommées en premier lieu pour améliorer l'humeur et/ou l'état global d'une personne, une consommation répétée de ces drogues produit aussi des effets indésirables importants (Hyman & Malenka, 2001; Nestler, 2001). L'usage de substances psychotropes a pour conséquence un comportement compulsif de recherche et de consommation de la drogue, avec des épisodes récurrents d'abstinence et de rechute ainsi qu'une perte de contrôle. Plusieurs phases rentrent en jeu : du renforcement initial à la drogue, aux stimuli associés à la rechute, en passant par la poursuite de la consommation en dépit des conséquences négatives. On notera la mise en place i) d'une tolérance à la drogue, qui pourrait contribuer à l'augmentation toujours accrue de la consommation observée au cours du développement de la dépendance, ii) d'un état adapté à l'exposition à la drogue – la dépendance – qui prépare le terrain pour les symptômes de sevrage

lorsque la consommation de drogue s'arrête. Cet état peut conduire à de la dysphorie et expliquer la rechute apparaissant dans les premières phases de sevrage. Additionnée à cela, on a également iii) une sensibilisation à la drogue, qui pourrait contribuer cette fois au risque accru de rechute après des périodes de sevrage plus longues. Les drogues d'abus induisent donc un dérèglement persistant du circuit de la récompense, permettant un renforcement sans adaptation aux conséquences négatives.

Au-delà de ces considérations comportementales, l'hypothèse dopaminergique de l'addiction repose sur le fait que les drogues activent et agissent sur les mêmes circuits que ceux utilisés en réponse aux récompenses naturelles (Kelley & Berridge, 2002). De nombreuses évidences montrent que les drogues d'abus ciblent précisément le système dopaminergique de la récompense (Hyman & Malenka, 2001 ; Nestler, 2001 ; Volkow et al., 2003 ; Volkow & Morales, 2015). Après une consommation aiguë, il a été observé une activation des circuits cérébraux impliqués dans l'obtention de récompenses (NAc et pallidum ventral), la motivation (cortex orbitofrontal, OFC), la mémoire (amygdale et hippocampe) et le contrôle cognitif (PFC ; Volkow et al., 2003). L'administration aiguë de drogues augmente la libération de DA au niveau du NAc (Di Chiara & Imperato, 1988), nécessaire à l'initiation de la consommation puis au renforcement. Un blocage pharmacologique du système dopaminergique induit une baisse de renforcement liée à une perte d'intérêt pour la drogue, qui ne dépend pas de la locomotion de l'animal (Wise, 2005 ; Wise & Bozarth, 1987). Des expériences de lésions ont mis en évidence le même rôle de la DA (Koob & Bloom, 1988). De plus, une activation optogénétique des neurones dopaminergiques de la VTA induit un renforcement et partage les mêmes caractéristiques qu'un renforcement à la cocaïne (Pascoli et al., 2015). Enfin, une consommation chronique entraîne une diminution marquée de l'activité dopaminergique, qui persiste des mois après la désintoxication et qui est également associée à une dérégulation des régions frontales du cerveau (Volkow et al., 2003). Les drogues d'abus entraîneraient aussi une modification profonde des neurones dopaminergiques et des structures cibles, notamment du NAc, conduisant à des altérations marquées des mécanismes de renforcement et de l'état motivationnel. Parmi les modifications engendrées, on peut citer des effets au niveau : i) transcriptionnel, avec une régulation de l'expression de certaines gènes impactée, ii) post-transcriptionnel, comme des altérations de la traduction des ARN messagers ou la dégradation de protéines, ou iii) de la structure des synapses, en modifiant le nombre de dendrites présentant des boutons synaptiques (Nestler, 2001). Ces changements profonds, qui seraient plus importants que ceux induits par des récompenses naturelles, conduiraient à une plasticité neuronale dépendante de la prise de drogue et à des réponses sensibilisées aux drogues et aux signaux environnementaux associés.

Partant du constat que la mise en place de l'addiction fait appel aux mêmes mécanismes neurophysiologiques que les systèmes normaux d'apprentissage par renforcement (Everitt & Robbins, 2005), certains auteurs ont postulé qu'il devait être possible d'établir une base neurocomputationnelle d'un apprentissage par renforcement qui sélectionne de manière inappropriée un stimulus addictif (Redish, 2004). L'addiction rentre ainsi dans le cadre d'une « prise de décision inappropriée ». Il est admis que les neurones dopaminergiques encodent la RPE et signalent le fait de continuer à renforcer pour une récompense ou au contraire d'arrêter le comportement si cela n'en vaut plus la peine (Bromberg-Martin et al., 2010; Schultz, 1997b). De la même façon que la stimulation électrique du MFB, les drogues, via leur action directement au niveau du système dopaminergique, vont créer une valeur et une nouvelle représentation de la récompense. En particulier, il a été avancé que les drogues d'abus produisent un signal de RPE à chaque fois que la drogue est consommée (Di Chiara & Imperato, 1988; Redish, 2004), par le biais d'une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques et d'une libération phasique de DA. En cas de consommation répétée, la répétition de ces signaux conduirait à renforcer les indices et les actions liés à la drogue jusqu'à des niveaux pathologiques, biaisant la prise de décision future vers le choix de la drogue. Un signal dopaminergique phasique émergerait donc au moment de l'indice prédictif de la drogue mais ne serait pas modulé par les attentes de l'individu et persisterait tout au long de l'apprentissage (Keiflin & Janak, 2015 ; **Figure 1.4**). Cela contraste avec les récompenses naturelles qui produisent des signaux de RPE seulement jusqu'à ce que les prédictions correspondent aux événements réels (Keiflin & Janak, 2015 ; **Figure 1.4**). Une consommation de drogue va donc biaiser les décisions à venir, avec une automatisation des processus et de nouvelles associations avec des stimuli prédictifs de la drogue dans l'environnement, pour aboutir à une consommation répétée (Ahmed, 2018). Par exemple, un stimulus extérieur, comme la terrasse d'un bar, va être associé à la prise d'un verre d'alcool et, ce dernier sera peut-être lui-même associé à une cigarette. La terrasse, qui est le stimulus, va déclencher l'envie de fumer. Le système dopaminergique rentre donc en jeu au moment de l'association mais également dans les processus motivés pour obtenir la cigarette, et ce, malgré les efforts pour lutter contre cette prise de nicotine. De plus, dans un processus d'addiction, la force du contrôle cortical serait diminuée au profit d'une suractivation des circuits limbiques (Volkow et al., 2003; Volkow & Morales, 2015), menant à des schémas d'action automatisés et non plus flexibles (Keiflin & Janak, 2015).

En conclusion, cette théorie de l'addiction repose sur le fait que les drogues induisent un apprentissage par renforcement comme dans le cas des récompenses naturelles, mais en ajoutant une nouvelle composante au modèle de RPE. Bien qu'un signal phasique émerge

au moment d'un stimulus rappelant la drogue, il persiste également au moment de la prise et de façon plus massive que dans le cas d'une récompense naturelle. Ce modèle ne prend pas en compte les différentes conséquences au niveau moléculaire, mais il théorise le rôle du système dopaminergique et comment sa sur-stimulation conduit à sur-sélectionner les actions menant à la consommation de drogue. L'addiction mène donc à une surévaluation des conséquences positives et une sous-évaluation des conséquences négatives.

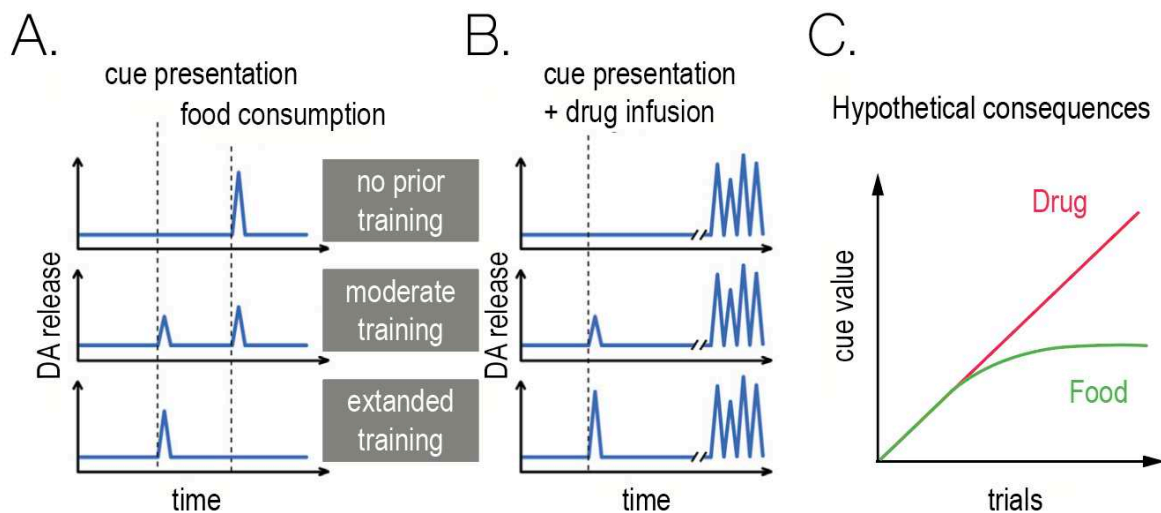


Figure 1.4. Différences de signal dopaminergique entre récompenses naturelles et drogues | A. Avant apprentissage, la nourriture délivrée de manière inattendue induit un signal phasique de DA. Après apprentissage, l'individu apprend qu'un stimulus signale la délivrance de récompense et le signal phasique de DA est transféré progressivement au moment du stimulus prédictif. **B.** Sur le même principe, lorsque la récompense est une drogue (de la cocaïne), on observe un signal phasique de DA au moment de l'infusion. Après apprentissage, le signal phasique va être transféré progressivement au moment du stimulus. En revanche, à la différence de la nourriture, l'infusion de cocaïne va continuer de provoquer une libération de DA au moment de l'obtention de cette dernière, en plus du moment où le stimulus prédictif apparaît. **C.** Représentation hypothétique des conséquences des signaux dopaminergiques induits par les récompenses naturelles ou les drogues sur l'apprentissage. Les signaux dopaminergiques induits par de la nourriture favorisent l'apprentissage jusqu'à ce que la prédiction soit en accord avec le résultat, ce qui conduit à une valeur stable du stimulus après plusieurs essais. En revanche, les signaux dopaminergiques persistants induits par la cocaïne participent à augmenter la valeur du stimulus prédictif à chaque essai. La valeur des stimuli prédictifs de la cocaïne peuvent donc dépasser la valeur des stimuli prédictifs de nourriture et cela peut biaiser la prise de décision en faveur de la drogue. *Adapté de Keiflin & Janak, 2015.*

Chapitre 2 : Le circuit mésolimbique (ou mésocorticolimbique)

Dans le chapitre précédent, je vous ai parlé de la notion de récompense et du rôle de la dopamine ainsi que des acteurs du circuit de la récompense dans la compréhension du comportement animal. Au sein du système nerveux central, l'innervation dopaminergique provient majoritairement du mésencéphale et plus précisément de 3 noyaux (A8, A9 et A10) : le champ rétrosubstantiel, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Dans ce chapitre, je vais à présent vous exposer les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la VTA, région centrale du système de la récompense et au cœur du circuit mésolimbique. La connectivité et le rôle de deux régions de projection de la VTA, le noyau accumbens (NAc) et l'amygdale (Amg), seront détaillés ; ainsi que l'action des drogues d'abus sur la VTA.

I. L'aire tegmentale ventrale

La VTA correspond au noyau A10 selon la classification anatomique de Dahlström et Fuxe (Dahlström & Fuxe, 1964; Moore, 1978). Ce noyau dopaminergique est en réalité un assemblage de plusieurs sous-noyaux, sans limites distinctes entre eux. Les deux noyaux majeurs sont le parabrachial pigmenté (PBP) et le paranigral (PN), situés au niveau latéral et en partie ventrale, et contiennent la plus forte proportion de neurones dopaminergiques au sein de la VTA. En partie médiale de la VTA, on retrouve 3 autres sous-noyaux : le caudal linéaire (CLi), le rostral linéaire (RLi) et l'interfasciculaire (IF ; **Figure 2.1**).

Au sein de ces différents noyaux, on retrouve bien évidemment une grande majorité de neurones dopaminergiques mais également des neurones GABAergiques (libérant de l'acide γ -amino-butérique ou GABA) et glutamatergiques (libérant du glutamate ; **Figure 2.2-A**), dont les proportions respectives varient en fonction de leur localisation (dorso-ventral, rostro-caudal ou medio-latéral). Bien que l'on distingue trois types neuronaux distincts, les neurones libérant un même neurotransmetteur constituent une population hétérogène, notamment en termes d'expression de récepteurs, de transporteurs, d'enzymes ou de projection. Les neurones de la VTA sont constitués de 60 à 70% de neurones dopaminergiques (Margolis et al., 2006; Nair-Roberts et al., 2008; Swanson, 1982), de 35% de neurones GABAergiques et de 2 à 5% de neurones glutamatergiques (Hnasko & Edwards, 2012; Margolis et al., 2006; Nair-Roberts et al., 2008; Olson & Nestler, 2007; Swanson, 1982; Taylor et al., 2014; Yamaguchi et al., 2007).

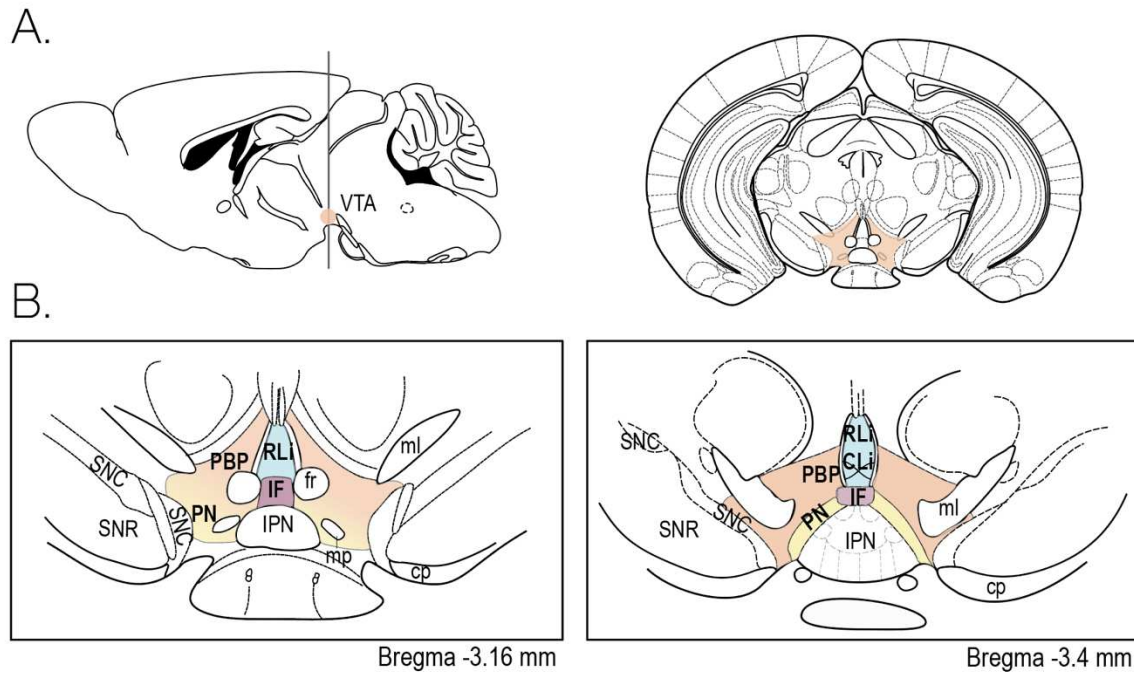


Figure 2.1. Neuroanatomie de la VTA | A. Localisation de la VTA en coupe sagittale (gauche) et coronale (droite). **B.** Coupe de VTA antérieure (-3.16 mm en arrière du bregma) ou postérieure (-3.4 mm en arrière du bregma). RL: noyau linéaire rostral; CLi: noyau linéaire caudal; IF: noyau interfasciculaire; PBP: noyau parabrachial pigmenté; PN: noyau latéral parabrachial; SNC: substance noire pars compacta; SNR: substance noire pars reticulata. *Figure adaptée de l'atlas « The mouse brain » de Georges Paxinos et Keith B.J. Franklin.*

a. Les neurones dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques contiennent une grande quantité de tyrosine hydroxylase (TH), essentielle à la signalisation dopaminergique (*voir partie III.a.*), qui est le marqueur le plus souvent utilisé pour identifier cette population de neurones. Parmi les neurones positifs pour l'enzyme TH, il existe une hétérogénéité moléculaire, notamment au niveau des transporteurs à la dopamine (DAT) et aux monoamines (VMAT2) ou encore du récepteur à la dopamine D2 (D2R), dont les expressions sont plus importantes dans la partie latérale de la VTA. Au contraire, les neurones exprimant à la fois la TH et le transporteur au glutamate VGLUT2 sont situés au niveau médial de la VTA (Morales & Margolis, 2017).

Des différences sur l'axe médo-latéral sont également présentes au niveau électrophysiologique. Il a longtemps été admis que les neurones dopaminergiques se reconnaissent à la présence d'un courant Ih. Ce courant généré par les canaux HCN (« *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels* ») est cationique non spécifique à rectification interne et est activé par l'hyperpolarisation du neurone. L'activation

du courant I_h a donc pour conséquence la repolarisation progressive du potentiel de membrane du neurone. Au sein de la SNC, ce courant est spécifique des neurones dopaminergiques (Margolis et al., 2006). Toutefois, dans la VTA, une proportion non négligeable de neurones dopaminergiques, située plutôt en partie médiale postérieure, ne présente que très peu (ou pas) de courant I_h (Ford, 2014; Juarez & Han, 2016; Margolis et al., 2006), pourtant longtemps considéré comme un des critères principaux d'identification de ces neurones.

L'étude plus fine des caractéristiques anatomiques des neurones dopaminergiques a permis de mettre en évidence des sous-populations distinctes au sein de la VTA, grâce notamment à l'émergence de traceurs rétrogrades (Riddle et al., 1995). Ces traceurs, injectés dans la région de projection, sont captés par les terminaisons axonales des neurones et remontent ainsi jusqu'aux corps cellulaires (dans la VTA). En effet, il a été montré que le système dopaminergique est en réalité composé de sous-réseaux, spatialement organisés au sein de la VTA, avec très peu de neurones projetant vers deux régions à la fois (Lammel et al., 2008). Ainsi, cinq sous-populations principales ont été mises en évidence au sein de la VTA par rapport à leur région de projection : vers le PFC médial, l'amygdale (Amg), le NAc core, le NAc shell médial ou le NAc shell latéral (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008, 2011; Roeper, 2013 ; **Figure 2.2-B**). Une topographie particulière est ainsi observée sur le plan médio-latéral de la VTA avec : i) les neurones projetant vers le PFC, situés dans la partie la plus médiale, ii) les neurones projetant vers l'Amg, situés en partie médio-dorsale, iii) les neurones projetant vers le NAc shell médial, situés en partie médio-ventrale, et enfin iv) les neurones projetant vers le NAc shell latéral, situés au plus latéral (**Figure 2.2-C**). A noter que les neurones projetant vers le NAc core se situent dans les mêmes localisations que ceux ciblant le NAc shell médial, avec une distribution un peu plus ventrale (Lammel et al., 2008).

De plus, certaines des différences moléculaires ou électrophysiologiques observées chez les neurones dopaminergiques pourraient correspondre à des caractéristiques de ces sous-populations. En effet, les ratios DAT/TH et DAT/VMAT2 sont plus élevés dans les neurones projetant vers le NAc shell latéral, justement situés au niveau latéral de la VTA où ces marqueurs sont enrichis (Lammel et al., 2008; Morales & Margolis, 2017).

De même, les neurones dopaminergiques situés en partie dorsolatérale de la VTA présentent un large courant I_h et projettent spécifiquement vers le NAc shell latéral (Lammel et al., 2011; Roeper, 2013). Au contraire, les neurones dopaminergiques situés en partie ventromédiale de la VTA projetant vers le NAc shell médial, le NAc core, l'Amg ou le PFC présentent très peu voire pas de rebond d'activité HCN (Lammel et al., 2011; Roeper, 2013). Parmi ces neurones ventromédiaux, ceux projetant vers le PFC expriment peu de

récepteurs D2 et présentent peu de courant GIRK (courant potassique rectifiant activé par les protéines G ; Lammel et al., 2008).

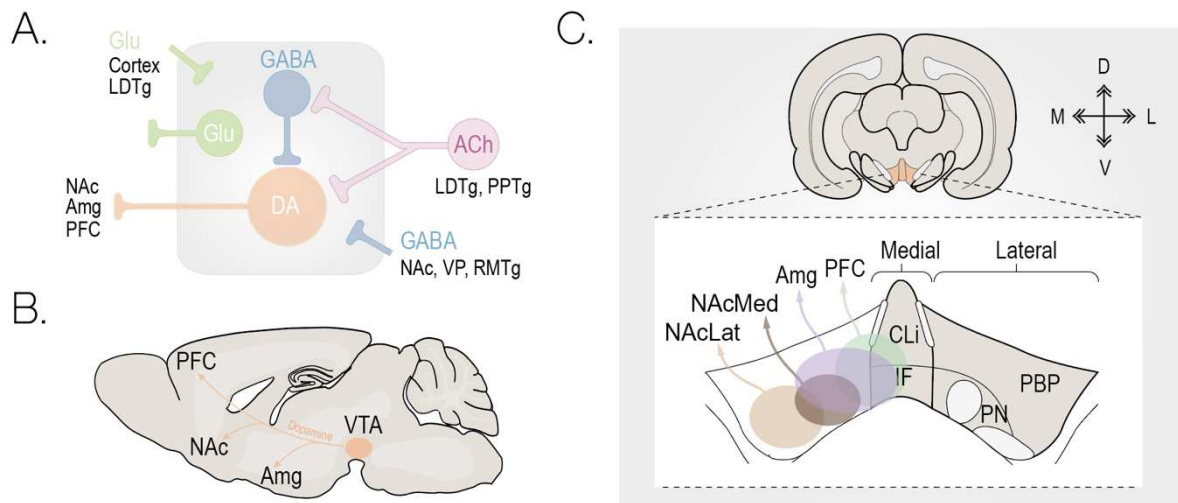


Figure 2.2. Types cellulaires et principales projections dopaminergiques de la VTA | A. Représentation schématique des trois types neuronaux retrouvés au sein de la VTA : les neurones dopaminergiques, GABAergiques et glutamatergiques. La VTA reçoit également des afférences diverses (glutamatergique, cholinergique, GABAergique) d'autres régions. *Adapté de Changeux 2010*. B. Schéma des projections dopaminergiques principales de la VTA : vers le NAc, l'Amg et le PFC. C. Représentation de la distribution des sous-populations dopaminergiques au sein de la VTA en fonction de leurs régions cibles. *Adapté de Beier et al. 2015*.

Enfin, les neurones projetant vers le PFC ou le NAc shell médial présentent un ratio des récepteurs glutamatergiques AMPA/NMDA plus important que ceux projetant vers le NAc shell latéral (Lammel et al., 2011), suggérant des différences intrinsèques entre ces sous-populations dans les processus de plasticité synaptique. Par ailleurs, une administration de cocaïne (stimulus considéré récompensant) augmente le ratio AMPA/NMDA dans les neurones projetant vers le NAc alors qu'une injection de formaline (stimulus aversif causant une irritation de la patte) augmente ce ratio dans les neurones projetant vers le PFC (Lammel et al., 2011). Ces résultats suggèrent des rôles fonctionnels différents pour les neurones dopaminergiques en fonction des voies de projection, avec une voie VTA-NAc impliquée dans les comportements récompensants et une voie VTA-PFC dans les comportements aversifs.

Les neurones dopaminergiques présentent donc une large hétérogénéité au sein de la VTA, notamment corrélée avec des régions de projection distinctes. A la lumière de ces résultats, il est désormais plus juste de considérer la VTA comme un ensemble de sous-circuits dopaminergiques, avec leurs caractéristiques et leurs fonctions propres. De plus, il convient

de reconsidérer certains critères électrophysiologiques permettant d'identifier un neurone comme étant ou non dopaminergique, telle que la présence d'un courant *I_h* ou l'expression de récepteurs D2. A ce jour, l'expression de TH et de DAT semble être le critère le moins biaisé pour définir si un neurone est bien dopaminergique.

b. Les neurones GABAergiques

Les neurones GABAergiques sont présents dans toutes les sous-régions de la VTA (RLi, IF, PBP, PN et CLi) mais sont concentrés majoritairement au niveau latéral (PBP, PN ; Taylor et al., 2014). Ces neurones GABAergiques de la VTA reçoivent différentes entrées modulatrices en provenance d'autres régions. Ces afférences peuvent être i) excitatrices, de nature glutamatergique, ou ii) inhibitrices, de nature GABAergique. Parmi les entrées excitatrices, on peut citer le colliculus supérieur, le PFC, l'habénula latérale (LHb) ; et pour les entrées inhibitrices majeures, les sous-noyaux du NAc. On peut également nommer des régions qui présentent à la fois des afférences glutamatergiques et GABAergiques sur les neurones GABAergiques de la VTA comme : le BNST (« *bed nucleus of the stria terminalis* »), l'hypothalamus latéral, le raphé dorsal et la PAG (Morales & Margolis, 2017). Les neurones GABAergiques de la VTA apparaissent donc au centre d'afférences de natures à la fois excitatrices et inhibitrices, les plaçant comme des éléments d'intégration de signaux en provenance de différentes régions du cerveau.

Comme les neurones dopaminergiques, les neurones GABAergiques de la VTA forment une population hétérogène (Morales & Margolis, 2017). Il existe trois types de neurones GABAergiques dans la VTA : i) des interneurones locaux, ii) des neurones projetant en dehors de la VTA et iii) des neurones du noyau tegmental mésopontin rostro-médian (RMTg), bien que ce dernier soit désormais considéré comme une structure distincte de la VTA.

Les interneurones GABAergiques forment des synapses inhibitrices locales au sein de la VTA et participent ainsi au contrôle inhibiteur de l'activité dopaminergique (Bouarab et al., 2019; Johnson & North, 1992; Omelchenko et al., 2009; Polter et al., 2018; Tan et al., 2012). Il a été montré que les synapses provenant de ces interneurones locaux se trouvent principalement sur les dendrites proximales des neurones dopaminergiques de la VTA, ce qui permettrait de coordonner l'activité locale par un contrôle inhibiteur. L'effet inhibiteur de ces interneurones pourrait alors avoir un rôle modulateur au sein de la VTA, différant d'une inhibition plus drastique provenant d'autres sources GABAergiques contactant les neurones dopaminergiques directement au niveau somatique, comme le RMTg ou les neurones

GABAergiques d'autres régions (Bouarab et al., 2019; Omelchenko et al., 2009). En effet, des études plus récentes montrent que les axones GABAergiques provenant de la VTA ont une dispersion beaucoup plus limitée comparé à une distribution plus large et uniforme des axones provenant du RMTg (Polter et al., 2018). Cependant, il a été démontré que les neurones GABAergiques de la VTA sont couplés par des jonctions gap (Allison et al., 2006; Stobbs et al., 2004), ce qui suggérerait une synchronisation des signaux inhibiteurs provenant de ces neurones, à grande échelle dans la VTA sans nécessiter de connectivité axonale. En effet, dans la VTA, une activation synchronisée par optogénétique des neurones GABAergiques peut induire une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques, associée à un comportement d'évitement (Tan et al., 2012).

Au sein de la VTA, il y a également des neurones GABAergiques de projection dont les terminaisons axonales ciblent d'autres régions, sans pour autant exclure la présence de collatérales au sein de la VTA (Omelchenko & Sesack, 2009). Parmi les régions de projection des neurones GABAergiques de la VTA, on retrouve : le pallidum ventral, la LHb, l'Amg, le PFC, le NAc, le dorsal raphé, le BNST, la PAG (« periaqueductal gray ») et les noyaux préoptiques (MCPO/OT; Bouarab et al., 2019; Breton et al., 2019; Morales & Margolis, 2017; Taylor et al., 2014). De la même manière que les neurones dopaminergiques, ces neurones GABAergiques de projection peuvent appartenir à des circuits neuronaux distincts. En effet, les études de traçage ont permis de mettre en évidence que le PFC contacte de façon distincte et spécifique les neurones GABAergiques de la VTA qui projettent vers le NAc et les neurones dopaminergiques qui reprojetent en retour vers le PFC (Carr & Sesack, 2000). Ce degré de spécificité synaptique des neurones du PFC avec certaines cibles dans la VTA, suggère des effets fonctionnels distincts pour les différentes voies de projection GABAergiques. De même, il a été montré que les neurones GABAergiques de la VTA font directement des synapses sur les interneurons cholinergiques (TAN) et non sur les neurones GABAergiques épineux (MSN) du NAc (Al-Hasani et al., 2021; Brown et al., 2012). Cette voie VTA_{GABA}-NAc participe au contrôle du tonus cholinergique dans le NAc, et jouerait un rôle dans la saillance et la modulation du comportement récompensant. Les neurones GABAergiques ne seraient donc pas seulement des régulateurs de l'activité dopaminergique mais pourraient constituer des voies sélectionnées dans certains comportements impliquant par exemple spécifiquement le PFC ou le NAc.

Le RMTg aussi appelé « queue de la VTA » est un noyau GABAergique caudal à la VTA et situé en partie dorso-latérale du noyau interpedonculaire (IPN, situé sous la VTA; Zhou, Geisler, et al., 2009; Kaufling et al., 2009). Le RMTg a été mis en évidence chez le rat

(Jhou, Fields, et al., 2009; Jhou, Geisler, et al., 2009) et, bien que son existence ait été remise en doute chez d'autres espèces, il est désormais admis qu'il existe un équivalent fonctionnel chez la souris (Juarez & Han, 2016; Morales & Margolis, 2017; Polter et al., 2018; Steidl et al., 2017). Dû à son emplacement, le RMTg a longtemps été vu comme une prolongation de la VTA mais est désormais considéré comme une structure à part entière. En effet, on observe de nettes différences au niveau anatomique, génétique et fonctionnel entre les neurones GABAergiques au sein de la VTA et ceux du RMTg (Jhou, Fields, et al., 2009; Jhou, Geisler, et al., 2009; Lahti et al., 2016; Polter et al., 2018; Simmons et al., 2017; Smith et al., 2019). Au sein du RMTg, les neurones GABAergiques expriment des marqueurs comme la somatostatine (Bourdy & Barrot, 2012) alors qu'au sein de la VTA, on retrouve la parvalbumine, la calrétinine, la calbindine ou encore la cholecystokinine (Merrill et al., 2015; Olson & Nestler, 2007). Il existe également une différence au niveau de facteurs de transcription spécifiques comme FoxP1 pour le RMTg et Zfp256 ou En1 pour la VTA (Lahti et al., 2016). De plus, à la différence de la VTA, les neurones du RMTg co-libèrent du GABA avec de la glycine, un neurotransmetteur inhibiteur aux cinétiques rapides et présent en grande quantité dans la moelle épinière (Polter et al., 2018). Les neurones GABAergiques du RMTg sont donc différents de ceux énoncés précédemment, et forment des connections synaptiques avec les neurones dopaminergiques de la VTA (Jhou, Fields, et al., 2009; Jhou, Geisler, et al., 2009). Par ailleurs, ces neurones GABAergiques reçoivent massivement des entrées glutamatergiques en provenance de la LHb (Jhou, Geisler, et al., 2009), constituant un circuit notamment impliqué dans l'encodage des stimuli aversifs et dans des comportements d'évitement (Jhou, Fields, et al., 2009; Jhou, Geisler, et al., 2009; Lahti et al., 2016; Matsumoto & Hikosaka, 2007; Omelchenko et al., 2009; Stamatakis & Stuber, 2012).

Les neurones GABAergiques de la VTA ont ainsi des cibles et des fonctions variées, au-delà d'une simple régulation dopaminergique, avec des rôles fonctionnels distincts ou complémentaires de ceux attribués au système dopaminergique. En effet, leur modulation optogénétique bidirectionnelle (leur activation ou leur inhibition) a montré qu'ils contribuent, tout comme les neurones dopaminergiques, à l'apprentissage par renforcement et au codage de la RPE (Eshel et al., 2015).

c. Les neurones glutamatergiques

Une minorité des neurones, concentrée au niveau médial et dorsal de la VTA, exprimant le transporteur vésiculaire VGLUT2 mais pas la TH, est de nature glutamatergique (Morales &

Root, 2014; Taylor et al., 2014). Leur densité décroît sur l'axe médio-latéral et ils sont majoritairement situés dans les zones de la VTA où les neurones dopaminergiques sont les moins présents (Morales & Margolis, 2017). Comme les neurones GABAergiques, ces neurones glutamatergiques peuvent avoir des connexions synaptiques au sein et à l'extérieur de la VTA. Dans la VTA, ils forment des synapses à la fois sur les neurones dopaminergiques et non dopaminergiques (Dobi et al., 2010), ce qui suggère une neurotransmission locale excitatrice. Les neurones glutamatergiques projettent également vers le NAc, la LHb, le BNST, le pallidum ventral, le PFC, l'Amg et les noyaux préoptiques (Hnasko et al., 2012; Taylor et al., 2014). Bien que constituant une population de neurones très minoritaire dans la VTA, les neurones glutamatergiques peuvent paradoxalement constituer une voie de projection conséquente dans certaines régions telles que le PFC, en comparaison aux projections dopaminergiques (Gorelova et al., 2012; Yamaguchi et al., 2013). Il a donc été suggéré que ces neurones glutamatergiques pourraient participer à la transmission rapide et localisée de signaux d'erreurs de prédiction depuis la VTA vers le PFC. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que la signalisation glutamatergique rapide de la VTA pouvait induire un renforcement indépendamment de la signalisation dopaminergique lente. Ainsi, dans un protocole d'autostimulation optogénétique au sein de la VTA, les souris préfèrent une stimulation brève (1s) dans le cas d'une activation des neurones glutamatergiques, alors qu'elles favorisent des stimulations longues (20s) dans le cas d'une activation des neurones dopaminergiques (Yoo et al., 2016). Le rôle de ces neurones glutamatergiques pourrait donc être lié à une transmission plus rapide d'informations. Une autre étude a montré que les neurones glutamatergiques ciblaient spécifiquement les interneurones GABAergiques à parvalbumine du NAc qui contactent à leur tour les MSN. L'activation glutamatergique aurait ainsi pour conséquence une inhibition des MSN, induisant de l'aversion (Qi et al., 2016). Ces résultats démontrent un rôle bien défini d'une population de la VTA, sous-estimée pendant de nombreuses années au profit de théories exclusivement dopaminergiques. Les rôles respectifs des sous-circuits, glutamatergique ou dopaminergique, pourraient donc dépendre du comportement mis en jeu et des cinétiques de neurotransmission nécessaires pour le mettre en place.

d. Co-libération de neurotransmetteurs

Ce n'est que récemment que des études ont reconnu le rôle indépendant des neurones GABAergiques et glutamatergiques, au-delà d'une simple régulation ou d'un soutien aux neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, ces derniers constituent des sous-réseaux parallèles aux réseaux dopaminergiques et ont des rôles spécifiques au sein du circuit de

la récompense, notamment au niveau du NAc et du PFC (Fields et al., 2007). Toutefois, un nombre non négligeable de neurones possède la capacité de colibérer deux types de neurotransmetteurs.

En effet, une sous-population de la VTA co-libère à la fois du GABA et du glutamate. Cette dernière projette vers la LHb et le pallidum ventral. Il a été montré que la majorité des terminaisons axonales de la VTA ciblant la LHb coexprime les marqueurs glutamatergiques (VGLUT2) et GABAergiques (VGAT). De plus, une activation optogénétique des neurones glutamatergiques de la VTA induit des courants glutamatergiques et GABAergiques monosynaptiques dans les neurones de ces structures (Yoo et al., 2016, Root et al., 2014). Cette co-libération de neurotransmetteurs induit une activation au niveau des neurones du pallidum ventral et une inhibition au niveau des neurones de la LHb. Cette différence d'effet serait due à la présence de synapses asymétriques, liées à l'excitation, et de synapses symétriques, liées à l'inhibition (Root et al., 2014). Des stimulations optogénétiques des terminaisons GABAergiques de la VTA peuvent également induire des courants GABAergiques et glutamatergiques dans les neurones du gyrus dentelé (hippocampe) et les inhiber *in vivo* en conséquence (Ntamati & Lüscher, 2016).

Une autre sous-population est capable de colibérer du GABA et de la DA. Cette libération de GABA pourrait dépendre, non pas du transporteur vésiculaire GABAergique VGAT, mais de VMAT2, le transporteur vésiculaire de la DA (Tritsch & Sabatini, 2012). Il peut donc exister au sein des réseaux dopaminergiques de la VTA, des neurones n'exprimant pas les marqueurs habituels des neurones GABAergiques, mais pourtant capables de co-libérer du GABA dans d'autres structures. Ainsi, il a été montré que des axones provenant de neurones dopaminergiques de la VTA relarguaient principalement du GABA au sein de la LHb. L'activation de cette voie entraîne des comportements de préférence associés à des phénotypes récompensants, dépendants d'une signalisation GABAergique au sein de la LHb. En condition de récompense, la voie VTA-LHb permettrait donc d'inhiber les sorties de la LHb, connues pour avoir des conséquences aversives (Stamatakis et al., 2013).

Une dernière sous-population que l'on peut qualifier d'hybride est celle co-libérant la DA et le glutamate (Hnasko & Edwards, 2012; Morales & Margolis, 2017; Yamaguchi et al., 2011). Des axones provenant de la VTA et contenant de la DA et du glutamate, ciblent les régions du NAc, de l'Amg et du cortex (Hnasko et al., 2010; Mingote et al., 2015; Qi et al., 2016; Stuber et al., 2010; Tecuapetla et al., 2010). Notamment, une forte proportion des neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg exprime VGLUT2, le transporteur du glutamate (Taylor et al., 2014). Corrélée à cette observation, une stimulation optogénétique

de la voie VTA–Amg a montré une co-libération de glutamate. En effet, la stimulation des neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg induit des courants glutamatergiques dans les neurones de cette région cible (Lutas et al., 2019). De plus, il a été montré qu'au niveau du NAc, les neurones exprimant à la fois TH (DA) et VGLUT2 (glutamate) présentent des axones avec des microdomaines, c'est-à-dire différentes sous-parties d'une terminaison axonale, chacun rempli de vésicules d'un des neurotransmetteurs. Les vésicules de glutamate sont donc concentrées dans des microdomaines axonaux, où elles établissent les synapses asymétriques généralement associées à la transmission excitatrice. Ces synapses sont adjacentes à d'autres microdomaines axonaux contenant la DA, qui peuvent participer à la neurotransmission synaptique ou bien volumique de la DA (Zhang et al., 2015). Une seule et même terminaison axonale peut donc fournir 1) une signalisation excitatrice rapide via le glutamate et 2) une signalisation modulatrice plus lente via la DA (Morales & Margolis, 2017). Jusqu'à récemment, l'existence d'une population de neurones projetant vers le NAc et exprimant à la fois VGLUT2 et DAT a remis en question l'effet renforçant attribué aux neurones glutamatergiques de la VTA (Yoo et al., 2016). Cependant, dans une étude plus récente, il a été montré que l'effet renforçant d'une activation rapide des neurones glutamatergiques de la VTA projetant vers le NAc, perdure lorsque la libération de DA est abolie dans ces neurones (Zell et al., 2020).

Il existe donc une diversité des types neuronaux présents au sein de la VTA ainsi qu'une hétérogénéité au sein de chaque population qui doit être prise en compte. Cependant, bien qu'il existe trois types neuronaux distincts (dopaminergique, GABAergique, glutamatergique), la faculté des neurones à co-libérer les neurotransmetteurs associés doit également être gardée à l'esprit. L'implication de plusieurs neurotransmetteurs au sein d'une voie de projection spécifique peut permettre d'expliquer les applications comportementales différentes en fonction du contexte dans lequel se trouve un individu. Cette diversité soulève l'implication de sous-réseaux parallèles et intriqués. Toutefois, il est à noter que le rôle de la DA peut être spécifiquement adressé grâce à des outils spécifiques ciblant la TH ou DAT, alors que ce n'est pas toujours le cas des études mettant en jeu des co-libérations. En effet, le fait que des neurones expriment à la fois des marqueurs glutamatergiques (VGLUT2) et des marqueurs dopaminergiques (DAT, TH) implique que les outils utilisés pour cibler des populations de neurones spécifiques soient questionnés et affinés afin de comprendre les rôles respectifs de ces sous-circuits. En revanche, il convient de souligner que jusqu'à présent, les neurones glutamatergiques et GABAergiques de la VTA semblent être associés aux mêmes fonctions que les neurones dopaminergiques (renforcement/éviterment, RPE), et que, dans le cadre de comportements physiologiques, une composante dopaminergique reste nécessaire (Ljungberg et al., 1992; Schultz, 1997b). Cela suggère que les autres types

neuronaux de la VTA ainsi que la co-libération, peuvent participer aux fonctions portées par les neurones dopaminergiques, plutôt que se substituer à eux pour assurer des fonctions spécifiques, indépendantes de la DA.

II. Activité électrophysiologique des neurones dopaminergiques

a. Modes de décharge des neurones dopaminergiques

Grace et Bunney ont réalisé une caractérisation pionnière des neurones dopaminergiques (exprimant la TH) *in vivo* chez le rat (Grace & Bunney, 1980; Grace & Bunney, 1984). De ces travaux ont émergé les paramètres encore utilisés à l'heure actuelle pour identifier les neurones dopaminergiques *in vivo*, à savoir : 1) la localisation, c'est-à-dire les coordonnées stéréotaxiques correspondant à la région d'intérêt (dans notre cas la VTA), et 2) le profil électrophysiologique propre aux neurones dopaminergiques. Parmi ces caractéristiques électrophysiologiques particulières, il y a : i) la forme du potentiel d'action (PA), ii) sa durée et iii) la fréquence de décharge du neurone. Les neurones dopaminergiques sont caractérisés par la présence d'un large PA, c'est-à-dire une durée de PA à partir du déclenchement jusqu'à la phase d'hyperpolarisation supérieure à 1.1 ms. La durée d'un PA est considérée comme longue et lente, soit supérieure à 2 ms si l'on prend en compte l'espacement entre deux PA, à laquelle s'ajoute une large hyperpolarisation. La fréquence de décharge de ces neurones est régulière, de type *pacemaking*, comprise entre 1 et 10 Hz.

On retrouve trois types d'activité différentes des neurones dopaminergiques.

Tout d'abord, les neurones peuvent être « silencieux », car dans un état hyperpolarisé qui entraîne l'inhibition de leur activité, ou inactivés à la suite d'un « *depolarization block* » témoin d'une hyperexcitation. Cet état peut être observé *ex vivo* à la suite d'injection d'haloperidol ou de glutamate, forçant leur activation.

On retrouve également deux types d'activité spontanée *in vivo*, chez des souris anesthésiées ou vigiles. L'activité **régulière** ou ***pacemaker*** est le mode d'activité basal majoritaire des neurones dopaminergiques. La régularité de décharge se caractérise par un espacement entre deux PA en moyenne de 200 à 250ms (Grace & Bunney, 1984). Dans l'activité *pacemaker*, on décompose un PA en trois phases : i) une lente dépolarisation voltage-dépendante, ii) le déclenchement effectif du PA et iii) l'hyperpolarisation suivant le PA (AHP, *after hyperpolarization*). Cette AHP va stopper le PA en cours et est médiée par des conductances potassiques sensibles au calcium I_{Ca} (Grace & Bunney, 1984). Elle dure en

moyenne 20 ms après un seul PA mais peut atteindre 50 ms après un train de PA, apparaissant ainsi proportionnelle à l'activité dopaminergique.

Enfin, un dernier mode de décharge des neurones dopaminergiques se caractérise par l'émission de PA en **bouffées** (ou « bursts »). Une bouffée est constituée de 2 à 10 PA avec une amplitude progressivement décroissante et une durée allongée où l'intervalle entre deux PA augmente avec le burst (Grace & Bunney, 1984). Au sein d'une bouffée, l'intervalle entre deux PA est inférieur à 80 ms, caractéristique de cette décharge en bursts (**Figure 2.3-A**). Ces bouffées seraient générées par un important influx de calcium au sein du neurone, provoquant ce patron de décharge particulier, probablement via l'inactivation de conductances potassiques. Une période d'inactivité, comme une pause, est observée à la fin d'une bouffée de PA (Grace & Bunney, 1984). La fin d'une bouffée est marquée par un intervalle entre deux PA supérieur à 160 ms (**Figure 2.3-A**).

La décharge des neurones dopaminergiques peut être décrite comme un continuum entre ces deux modes de décharge, régulier et en bouffées, ce qui permet une représentation des profils de décharges en 4 catégories de neurones : 1) à faible taux de décharge et faible activité en bursts, 2) à faible taux de décharge et forte activité en bursts, 3) à fort taux de décharge et faible activité en bursts et 4) à fort taux de décharge et forte activité en bursts (Faure et al., 2014; Mameli-Engvall et al., 2006 ; **Figure 2.3-BC**).

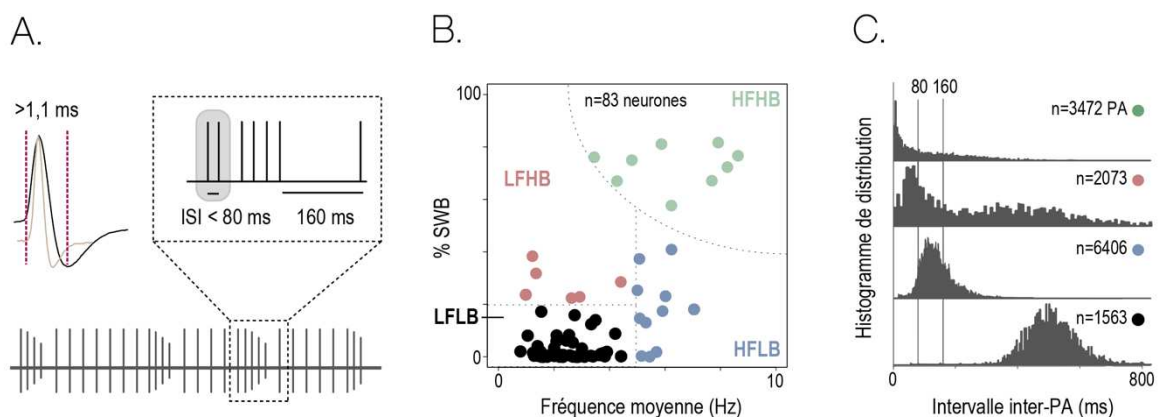


Figure 2.3. Activité spontanée des neurones dopaminergiques de la VTA *in vivo* | A. Représentation d'un PA de neurone dopaminergique (en noir) par rapport à celui d'un neurone GABAergique (en gris). Illustration d'un neurone qui présente une activité régulière avec des épisodes de bursts (enchainement successif d'un minimum de deux PA ayant moins de 80ms d'intervalle (ISI, *interspike interval*)). **B.** Représentation des différents profils d'activité spontanée des neurones dopaminergiques en fonction de leur fréquence de décharge et de leur activité en bouffées. LFLB: Low Firing Low Burst; LFHB: Low Firing High Burst; HFLB: High Firing Low Burst; HFHB: High Firing High Burst. *Adapté de Faure et al. 2014.* **C.** Distribution des intervalles entre PA (ms) selon le profil de décharge. *Adapté de Mameli-Engvall et al. 2006.*

Ex vivo, on retrouve également cette activité *pacemaker* mais de plus faible fréquence. Généralement, les neurones dopaminergiques en tranches ont une fréquence autour de 1 à 2 Hz, ce qui est plus faible que la moyenne *in vivo*. Ceci peut en partie être expliqué par les afférences qui sont coupées sur tranches et qui peuvent participer, au-delà d'une activité intrinsèque déjà présente, à dépolariser davantage les neurones. A noter qu'une particularité des neurones dopaminergiques *ex vivo* est qu'ils ne déchargent pas en bouffées. Cela suggère que l'activité en bursts serait médiée par des entrées synaptiques sur les neurones dopaminergiques, manquantes sur tranches (Shi, 2009). Néanmoins, l'enregistrement des neurones dopaminergiques *ex vivo* a permis de faire de grandes avancées concernant notamment les mécanismes sous-tendant l'activité spontanée des neurones dopaminergiques de la VTA (*point qui sera développé dans la partie suivante, II.b.*).

Par ailleurs, le patron de décharge des neurones dopaminergiques peut dépendre de l'état d'éveil de l'animal enregistré ou de l'espèce. En effet, les neurones déchargent en moyenne entre 3 et 4 Hz avec environ 10 à 20% de PA en bursts chez l'animal anesthésié (Mameli-Engvall et al., 2006; Morel et al., 2018; Tolu et al., 2013, 2017; Torquet et al., 2018) contre 5 Hz et 35% de PA en bursts chez l'animal éveillé (J. Y. Cohen et al., 2012; Naudé et al., 2018; Solié et al., 2022). De plus, le mode d'anesthésie peut également influencer sur la fréquence et la décharge en bouffées : les neurones enregistrés sous isoflurane ont une activité légèrement augmentée en comparaison avec une anesthésie sous hydrate de chloral (Marinelli & McCutcheon, 2014). Similairement, l'activité peut légèrement varier sur animaux éveillés, selon qu'ils soient immobilisés ou libres de leurs mouvements. L'espèce choisie (rat, souris, singe) peut aussi influencer l'activité spontanée des neurones dopaminergiques enregistrés. Par exemple, une comparaison de l'activité de souris et rats adultes dans les mêmes conditions d'enregistrements (anesthésiés, hydrate de chloral), montre une décharge en fréquence (3.6 vs. 4.2 Hz) et en bouffées (8-10% vs. 30%) légèrement diminuée chez les souris (Marinelli & McCutcheon, 2014).

b. Mécanismes de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques

i. Activité *pacemaker* ou tonique

L'activité *pacemaker* est régulée par des mécanismes intrinsèques alliant des conductances sodiques, calciques et potassiques.

Tout d'abord, les canaux sodiques voltage-dépendants semblent participer à cette activité *pacemaker* car leur inhibition par la tétródotoxine (TTX) impacte la dépolarisation et la

genèse d'un PA. D'autres conductances, dont des canaux calciques voltage-dépendants (VGCC), peuvent aussi jouer un rôle dans cette activité *pacemaker*. Les canaux de type L et P/Q contribueraient à la phase de dépolarisation du PA, tandis que les canaux de type T seraient impliqués à la fois dans les phases de dépolarisation et de repolarisation du potentiel (Shi, 2009). Ces VGCC sont activés lors de la dépolarisation du neurone et donc lors de l'initiation d'un PA (Shi, 2009). Ils sont perméables au calcium, ce qui va activer en conséquence les canaux potassiques SK (*small conductance calcium-activated potassium channels*). Ces derniers, sensibles au calcium, laissent passer du potassium conduisant à une hyperpolarisation du neurone. Ce sont ces canaux SK qui sont à l'origine de l'AHP observée après chaque PA.

Une partie des neurones dopaminergiques présente des canaux HCN, régulant également l'activité *pacemaker*. L'ouverture de ces canaux se produit suite à une hyperpolarisation, et produit quant à elle une dépolarisation du neurone via le courant I_h . Ce mécanisme permet au potentiel de membrane de se dépolariser à nouveau après activation des canaux SK hyperpolarisants, jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement d'un nouveau PA. L'intensité du courant I_h peut jouer sur la fréquence de l'activité *pacemaker* du neurone. En effet, un blocage de ces courants réduit significativement l'activité régulière des neurones dopaminergiques. Il existe également des canaux potassiques voltage-dépendants Kv. Ces derniers sont activés lorsque la membrane est dépolarisée et induisent une hyperpolarisation du neurone via le courant potassique I_A , augmentant ainsi l'intervalle entre deux PA. Plus il y a de canaux Kv exprimés à la membrane du neurone et plus l'activité *pacemaker* sera ralentie (Shi, 2009). De plus, les canaux NALCN (*sodium leak channel*) ont été impliqués dans l'activité spontanée des neurones dopaminergiques, leur inactivation les rendant silencieux (Philippart & Khaliq, 2018). L'activité *pacemaker* serait donc médiée, au moins en partie, par un courant sodique des canaux NALCN.

ii. Activité en bouffées ou phasique

L'activité en bouffées repose sur la présence de plusieurs récepteurs.

Tout d'abord, les récepteurs ionotropes glutamatergiques NMDA (N-Methyl-D-aspartate) semblent jouer un rôle prépondérant (Floresco et al., 2003; Grace & Bunney, 1984). En effet, l'application de NDMA sur les neurones dopaminergiques induit des bursts que ce soit *in vivo* ou *ex vivo* (Overton & Clark, 1992). L'activation de ces récepteurs induit une entrée de calcium, ion nécessaire à l'émergence d'une bouffée. Les canaux SK sont également importants pour l'activité en bouffées, car leur inhibition induit une augmentation de la décharge en bursts (Soden et al., 2013). De plus, il a été démontré l'importance des récepteurs ionotropes GABA_A, l'infusion d'un antagoniste de ces récepteurs augmentant

l'activité de décharge en bouffées (Paladini & Tepper, 1999). Aussi, la genèse d'un burst pourrait être due à une désinhibition des neurones dopaminergiques via les récepteurs GABA_A.

De la même manière, les synapses excitatrices cholinergiques ont été impliquées dans le contrôle de l'activité en bouffées des neurones dopaminergiques. En effet, la VTA reçoit des afférences glutamatergiques mais également cholinergiques en provenance des noyaux du pont : le LDTg (noyau tegmental latérodorsal) et le PPTg (noyau tegmental pédoculopontin ; Dautan et al., 2016; Floresco et al., 2003). L'inactivation du LDTg supprime la décharge en bursts et ce, même après application de glutamate (Lodge & Grace, 2006). De plus, chez des souris délétées de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiniques, les neurones dopaminergiques ne présentent plus d'activité en bursts et cette activité peut être restaurée en rétablissant la signalisation nicotinique dans les neurones dopaminergiques et GABAergiques de la VTA (Tolu et al., 2013).

Ces données suggèrent que les entrées cholinergiques en provenance du pons pourraient exercer, via les récepteurs nicotiniques de la VTA, un contrôle permissif (*gating*) des entrées glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques, et ainsi permettre la genèse des bouffées.

c. Hétérogénéité de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques

Comme nous l'avons vu, il existe une grande hétérogénéité dans les activités spontanées des neurones dopaminergiques, particulièrement *in vivo*. Cette hétérogénéité intra-individuelle des patrons de décharges peut être le reflet des différences intrinsèques et extrinsèques des neurones présentées plus haut dans ce chapitre. Ainsi, des différences d'activité spontanée sont observées *ex vivo* et *in vivo* en fonction des régions de projection. En effet, *ex vivo*, suite à l'injection d'une rampe de courant, on observe que les neurones à large lh projetant vers le NAc shell latéral présentent une fréquence de décharge lente alors que les neurones à faible lh projetant vers le PFC, l'Amg, le NAc core ou le NAc shell médial présentent une fréquence de décharge plus élevée (Lammel et al., 2008). A l'inverse, *in vivo*, les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc shell latéral présentent une fréquence de décharge plus élevée et moins de pauses entre les bouffées de PA en comparaison aux neurones projetant vers le NAc shell médial (Farassat et al., 2019). Les auteurs suggèrent ainsi que, *in vivo*, les neurones dopaminergiques projetant vers le shell médial pourraient être la cible d'une inhibition tonique plus importante, par rapport aux neurones projetant vers le shell latéral. Une hétérogénéité du patron de décharge peut ainsi dépendre du sous-réseau dopaminergique enregistré au sein de la VTA.

D'autres paramètres tels que l'expression de récepteurs membranaires, peuvent venir réguler l'activité des neurones dopaminergiques. Par exemple, le patron d'expression des sous-unités nicotiques varie d'un neurone à un autre et peut influencer le patron de décharge des neurones dopaminergiques (Changeux, 2010). En effet, nous l'avons vu, la délétion de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiques entraîne une perte de l'activité en bouffées des neurones dopaminergiques (Mameli-Engvall et al., 2006; Tolu et al., 2013). Cependant, l'abolition de la sous-unité $\alpha 7$ des récepteurs nicotiques n'induit pas de changement majeur dans la fréquence de décharge ni dans l'activité en bouffées, mais a un impact sur l'association entre ces deux paramètres. Ces souris *knock-out* pour la sous-unité $\alpha 7$ ne présentent plus de populations de neurones à faible fréquence de décharge et haute activité en bursts ainsi qu'à haute fréquence de décharge et faible activité en bursts (Mameli-Engvall et al., 2006).

Enfin, on retrouve également une hétérogénéité inter-individuelle dans les patrons de décharge des neurones dopaminergiques, dépendante de l'historique des individus. Une exposition à des stress sociaux induit une augmentation de la décharge en fréquence et en bouffées après un protocole de défaite sociale chronique (Anstrom et al., 2009; Krishnan et al., 2007). Également, l'environnement social dans lequel l'animal évolue va avoir un impact sur l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, dans un large environnement semi-automatisé en laboratoire, on observe l'émergence de différences inter-individuelles dans les comportements sociaux chez des souris au fond génétique homogène. Ces différences de phénotype reposent sur des propriétés différentes de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA (Torquet et al., 2018). L'activité électrophysiologique de la VTA varie donc en fonction de la place et du comportement de l'individu au sein d'un groupe social. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la consommation de drogues telles que la nicotine peut également modifier drastiquement le patron de décharge des neurones dopaminergiques d'un individu.

d. Dynamiques de libération de la dopamine

La décharge des neurones dopaminergiques de la VTA et le mode de libération de la DA dans les structures cibles sont corrélés (**Figure 2.4**).

D'une part, le mode de libération dit tonique correspond à une libération basale et constante de DA dans le temps. Dans ce mode de libération, les neurones d'une même population déchargent de manière asynchrone les uns des autres, permettant de maintenir une concentration extracellulaire de DA relativement faible et stable (Floresco et al., 2003). Ce

mode de libération est lent, de l'ordre de la minute à l'heure, et est directement relié à l'activité *pacemaker* des neurones dopaminergiques. Ce relargage tonique résultant de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques de la VTA, permet de maintenir un niveau basal de DA dans les structures cibles et serait impliqué dans les processus motivationnels et moteurs (Schultz, 2002).

D'autre part, le mode de libération dit phasique est quant à lui la résultante d'une synchronisation de l'activité d'une population dopaminergique. Cela engendre une libération de DA massive et transitoire, de l'ordre de 10 à 100ms, notamment observée en réponse à des stimuli saillants. Comme mentionné précédemment, les travaux de Schultz ont permis d'identifier la décharge en bouffées des neurones dopaminergiques comme générant un relargage phasique de DA au moment de l'obtention d'une récompense ou au moment d'un signal prédictif (Mirenowicz & Schultz, 1996; Schultz, 1997b). Au contraire, une omission de récompense entraîne une baisse brusque d'activité dopaminergique dans la VTA. Ces bouffées et ces pauses modulent et interrompent ainsi le mode régulier dans lequel sont généralement les neurones dopaminergiques en absence de stimulations extérieures.

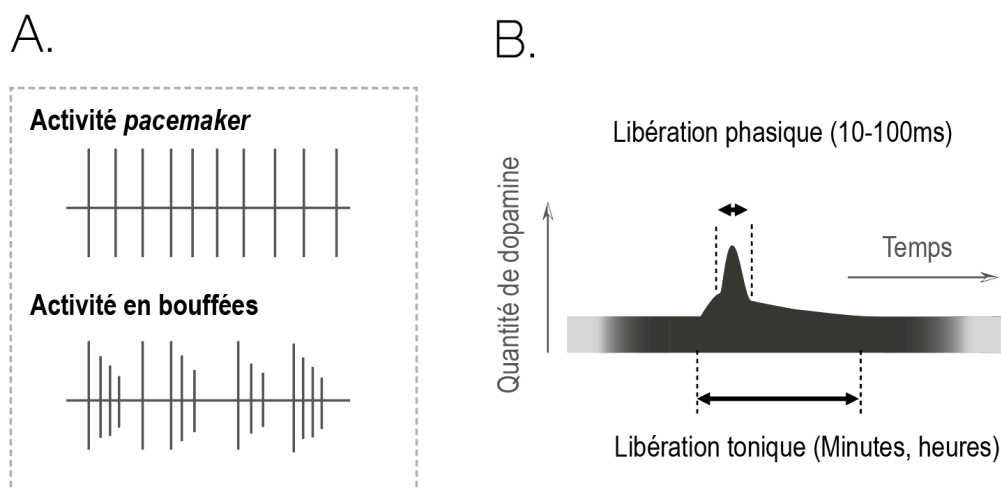


Figure 2.4. Dynamiques de libération de la dopamine en lien avec l'activité spontanée | A. Profils d'activité spontanée régulière (haut) et en bouffées (bas). B. Schéma des deux modes de libération de la dopamine: i) phasique, sur une courte échelle de temps (10 à 100 ms), ou ii) tonique, sur une échelle de temps plus longue (minutes, heures). *Adapté de Schultz 2007.*

III. Neuromodulation & dopamine

a. Signalisation dopaminergique

La DA, rappelons-le, est un neurotransmetteur catécholaminergique. Les catécholamines ont pour point commun l'enzyme de la tyrosine hydroxylase (TH) qui effectue une

hydroxylation de la L-tyrosine, produisant le précurseur de la DA, la L- dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). La L-DOPA est ensuite convertie en DA par la DOPA- décarboxylase (aromatic amino acid decarboxylase, AADC; **Figure 2.5**). Basé sur cette synthèse de DA, la TH est le marqueur utilisé pour identifier les neurones à catécholamines mais ne permet pas de différencier les neurones dopaminergiques des neurones noradrénergiques par exemple. Afin de distinguer les différents types de neurones catécholaminergiques, il est possible d'utiliser le marqueur de l'enzyme dopamine- F3- biosynthétique, qui convertit la DA en NE, permettant d'identifier les neurones NE ou épinéphrine. On peut ainsi différencier les neurones DA des autres neurones catécholaminergiques (Rogawski, 2012).

En termes de neurotransmission, les neurones dopaminergiques peuvent former des synapses avec d'autres types neuronaux mais leurs nombreuses terminaisons axonales sont peu connectées directement sur un élément postsynaptique. Les terminaisons axonales des neurones dopaminergiques peuvent être de type synaptique ou non synaptique (Descarries et al., 2008). Dans le cas de terminaisons axonales non synaptiques, on parle de neurotransmission diffuse ou volumique (Agnati et al., 1995). En effet, il existe des boutons axonaux qui présentent des transporteurs vésiculaires impliqués dans le transport de la DA comme DAT ou VMAT2 (**Figure 2.5**), mais ne présentent pas de complexe de jonction, élément impliqué dans la formation de synapses. Une libération de DA à partir de ces terminaisons axonales non synaptiques entraîne donc une diffusion dans l'espace extracellulaire induisant des effets à distance si liaison sur des cibles ou récepteurs extrasynaptiques (Descarries et al., 2008; Descarries & Mechawar, 2000).

Une fois libérée dans l'espace extracellulaire ou dans une fente synaptique, la DA se lie à des récepteurs dopaminergiques. Ces récepteurs sont une classe de récepteurs transmembranaires métabotropes couplés aux protéines G. Il y a cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques : D1, D2, D3, D4 et D5. Les récepteurs D1 et D5 font partie de la famille des *D1-like* et les récepteurs D2, D3 et D4 font partie de la famille des *D2-like*.

Les récepteurs *D1-like* sont reliés aux protéines $G_{s/o}$ (RCPG), couplées positivement à l'adénylate cyclase (AC). L'activation de l'AC entraîne la production d'un second messenger, l'AMP cyclique (AMPc) et l'activation de la protéine kinase A (PKA). A l'inverse, les récepteurs *D2-like* sont couplés aux protéines $G_{i/o}$, qui inhibent l'AC et limitent donc l'activation de la PKA (**Figure 2.5**). Concernant les récepteurs *D1-like*, le principal rôle de l'activation de la PKA est la phosphorylation et la régulation de récepteurs voltage-dépendants potassiques, sodiques et calciques ; de récepteurs ionotropiques au glutamate

ou au GABA; ou de facteurs de transcription (Tritsch & Sabatini, 2012). La conséquence est donc une augmentation globale de l'excitabilité intrinsèque du neurone. De plus, la PKA va notamment phosphoryler des protéines en aval comme DARPP32 et donc participer à la régulation de la voie de signalisation ERK, modulée par les drogues d'abus (Cahill et al., 2014). Une activation des récepteurs *D2-like* aura les effets opposés, à savoir une régulation à la baisse de ces récepteurs et facteurs de transcription, et donc une réduction de l'excitabilité.

Ces récepteurs métabotropiques sont majoritairement exprimés dans les régions de projection, sur des neurones non dopaminergiques (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998), mais peuvent également être présents au sein des structures de production de la DA (comme les autorécepteurs D2 dans la VTA; Beutler et al., 2011; Ford, 2014; Vijayraghavan et al., 2007).

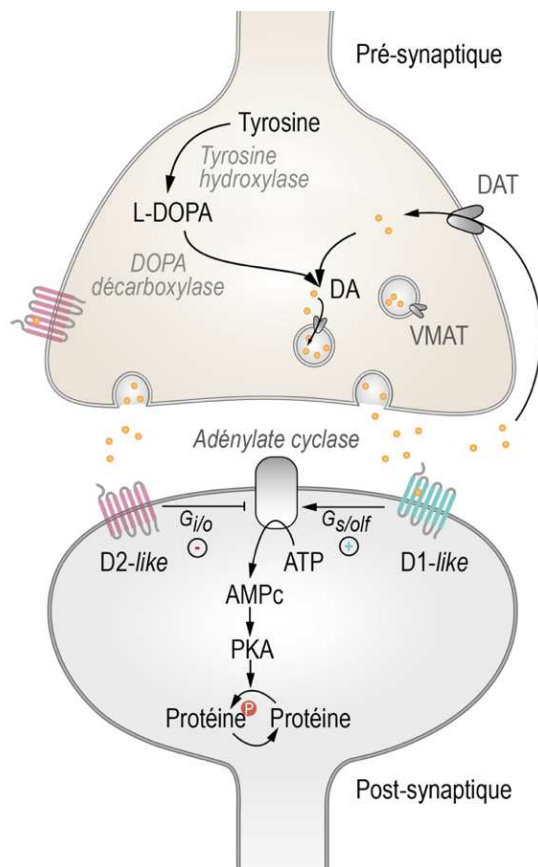


Figure 2.5. Synthèse et signalisation dopaminergique | Schéma de la synthèse dopaminergique au niveau d'un bouton présynaptique d'un neurone dopaminergique : la DA est synthétisée à partir de la tyrosine via l'action de la TH et de l'AADC puis est accumulée dans des vésicules via l'action du transporteur VMAT. La DA est ensuite libérée dans l'espace extrasynaptique. Elle se fixe ensuite sur des récepteurs dopaminergiques *D1-like* ou *D2-like* présents en post-synaptique. La fixation de la DA entraîne respectivement l'activation ou l'inhibition de l'AC et donc régule l'activité de la PKA et des cascades de signalisation associées.

Les propriétés pharmacologiques des différents sous-types de récepteurs dopaminergiques permettent une intégration différente de la signalisation dopaminergique lors d'une libération tonique ou phasique. En effet, l'affinité des récepteurs de type D2 serait 10 à 100 fois supérieure à celle des récepteurs de type D1 (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Tritsch & Sabatini, 2012). Le mode de libération tonique activerait donc préférentiellement les neurones exprimant les D2R, pouvant détecter des niveaux de DA plus faibles, et cette

activité serait supprimée lors d'une baisse de DA associée à la présentation de stimuli aversifs (Grace et al., 2007; Mirenowicz & Schultz, 1996; Ungless et al., 2004). Dans le cas de ces stimuli aversifs, il en résulterait une désinhibition des voies neuronales exprimant majoritairement les D2R (dans le NAc par exemple). Au contraire, une libération phasique de DA – comme celle déclenchée par une récompense – activerait, en plus, les D1R de faible affinité pour la DA (Grace et al., 2007; Mirenowicz & Schultz, 1994). Ainsi, les neurones exprimant les D1R vont répondre principalement à des libérations phasiques et transitoires de DA tandis que ceux exprimant les D2R vont répondre en cas de libération tonique mais également phasique (Marcott et al., 2014). Il en résulte que l'effet de la DA sur une population de neurones, dépend non seulement du type de récepteur exprimé par les neurones, mais également du mode de libération. En présence d'un niveau basal de DA, c'est donc principalement la population de neurones exprimant les D2R qui sera activée, alors qu'une augmentation phasique de DA activera la population de neurones exprimant les D1R. La libération de DA peut avoir des effets neuromodulateurs opposés en fonction du type de récepteur exprimé majoritairement dans une région de projection. Par exemple, le NAc exprimant ces deux récepteurs (D1R et D2R) sur des populations de neurones supposées ségréguées, le mode de libération de la DA en vigueur va privilégier l'activation d'une population vis-à-vis d'une autre.

b. Régulation de la neurotransmission dopaminergique

Au sein de la VTA, l'expression d'autorécepteurs D2 sur les neurones dopaminergiques est un des éléments majeurs de la régulation de la libération de DA. Ces autorécepteurs peuvent être situés au niveau somatodendritique comme au niveau axonal. Ils permettent un contrôle et une régulation de l'activité de décharge des neurones dopaminergiques et ainsi, une modulation de la libération de DA dans les structures de projection. Ces derniers permettent donc une rétroaction inhibitrice, modulatrice de l'activité dopaminergique.

Les autorécepteurs D2 peuvent jouer sur la transmission dopaminergique (Ford, 2014) :

- 1) En régulant la libération de DA. Les autorécepteurs D2 diminuent la probabilité de relargage des vésicules sur les terminaisons dopaminergiques, en activant des canaux potassiques voltage-dépendants $K_v1.2$ à l'origine d'une hyperpolarisation du neurone ; et en inhibant des canaux calciques voltage-dépendants responsables de l'entrée de calcium requise pour la libération de DA. D'autres mécanismes comme l'activation de canaux GIRK (canaux potassiques rectifiants) activés par les protéines G, pourraient expliquer une baisse de libération de DA. Une activation des GIRK entraîne une sortie de potassium et donc une hyperpolarisation du neurone.

2) En régulant la recapture de DA. Les autorécepteurs D2 augmentent l'expression et l'activité de DAT et donc la recapture de DA depuis l'espace extracellulaire. Cependant, une activité dopaminergique tonique basale est insuffisante pour mettre en jeu ce mécanisme, apparaissant uniquement lors de périodes soutenues d'activation des autorécepteurs ou lors de trains de stimulations prolongés.

3) En régulant la TH. Une activation sur le long-terme des autorécepteurs D2 entraîne une réduction de l'AC et de la production de PKA permettant de phosphoryler la TH. On a donc moins de production de DA et donc moins de DA se retrouvant dans les vésicules prêtes à être secrétées.

Ces 3 mécanismes d'action des autorécepteurs D2 sont principalement connus pour les régions de projection recevant une importante innervation dopaminergique, comme le NAc.

En termes de régulation de la transmission dopaminergique, on peut nommer deux facteurs clefs additionnels : le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2 et le transporteur de recapture de la dopamine DAT (Mulvihill, 2019 ; **Figure 2.5**).

D'une part, VMAT2 est la protéine responsable de la capture cytosolique de la DA dans des vésicules prêtes à être secrétées. VMAT2 est localisé dans les deux types de vésicules que l'on peut trouver dans les terminaisons dopaminergiques, les petites vésicules synaptiques mais également ce que l'on appelle les grandes vésicules denses (Kelly, 1993; Nirenberg et al., 1997). Une dérégulation de VMAT2 peut entraîner une augmentation du taux de DA cytosolique et ainsi une augmentation du stress oxydatif, délétère pour le neurone. Un taux plus élevé de VMAT2 peut donc être assimilé à un rôle neuroprotecteur. D'autre part, la régulation de la DA a également lieu via la recapture par DAT. Ce phénomène est le principal mécanisme d'élimination de la DA de l'espace extracellulaire. Il opère notamment un rôle dans les cinétiques d'action, à la fois au niveau spatial et temporel, sur les récepteurs cibles de la DA (Cragg & Rice, 2004; Schönfuß et al., 2001). Un taux suffisant de DAT est nécessaire afin de limiter la diffusion des molécules de DA.

Enfin, les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine exprimés au niveau des corps cellulaires et des terminaisons axonales des neurones dopaminergiques, participent à la régulation de la neurotransmission, en modulant l'activité phasique de décharge des neurones et les propriétés de libération en terminal. Comme décrit précédemment, l'activité spontanée des neurones dopaminergiques de la VTA, et donc la libération de DA, sont modulées par l'expression de sous-unités nicotiniques, notamment $\alpha 7$ et $\beta 2$ (Mameli-Engvall et al., 2006; Tolu et al., 2013). De plus, les interneurones cholinergiques du NAc (TAN) peuvent réguler les niveaux de libération de DA en terminal. Une activation optogénétique spécifique des

TAN est capable d'évoquer une libération de DA, par le biais de récepteurs nicotiniques contenant la sous-unité $\beta 2$ (Cachope et al., 2012; Exley et al., 2011).

IV. Afférences & efférences de la VTA

a. Connectivité & afférences de la VTA

Une très grande interconnexion est observée entre les efférences et afférences de la VTA. La plupart des régions ciblées par les neurones de la VTA, que ces connexions soient de nature dopaminergique, GABAergique ou glutamatergique, projettent également en retour sur la VTA (**Figure 2.6**).

Le NAc constitue une des principales afférences ciblant la VTA (Beier et al., 2015; Morales & Margolis, 2017; Watabe-Uchida et al., 2012; Yang et al., 2018). La CeA, sous-région de l'amygdale importante de la voie méso-limbique, projette également en retour sur la VTA et préférentiellement sur les neurones GABAergiques (Beier et al., 2015; Watabe-Uchida et al., 2012; Zhang et al., 2021).

De plus, la VTA reçoit des entrées en provenance de régions qualifiées « d'autonomes » comme le BNST, le noyau hypothalamique paraventriculaire, l'hypothalamus latéral ou encore la PAG (Watabe-Uchida et al., 2012).

Les afférences glutamatergiques proviennent majoritairement du PFC, du cortex antérieur, de la LHb, de la BNST et du PPTg (Beier et al., 2015; Geisler et al., 2007; Georges & Aston-jones, 2002; Morales & Margolis, 2017). Parmi les afférences GABAergiques non citées précédemment, on peut nommer le pallidum ventral, le septum latéral et en plus faible proportion la LHb (Beier et al., 2015; Morales & Margolis, 2017; Omelchenko et al., 2009).

Les neurones GABAergiques et dopaminergiques de la VTA reçoivent des entrées en provenance des mêmes régions mais ces entrées sont de natures diverses. On note notamment des entrées cholinergiques en provenance des noyaux du pons (PPTg, LDTg; Dautan et al., 2016). De plus, la VTA reçoit des projections i) de neurones à ocytocine ou à vasopressine en provenance de l'hypothalamus paraventriculaire, ii) de neurones à orexine ou à neurotensine en provenance de l'hypothalamus latéral, mais également iii) de neurones Tph (marqueurs des neurones sérotoninergiques), GABAergiques et glutamatergiques en provenance du raphé dorsal (Beier et al., 2015; **Figure 2.6**).

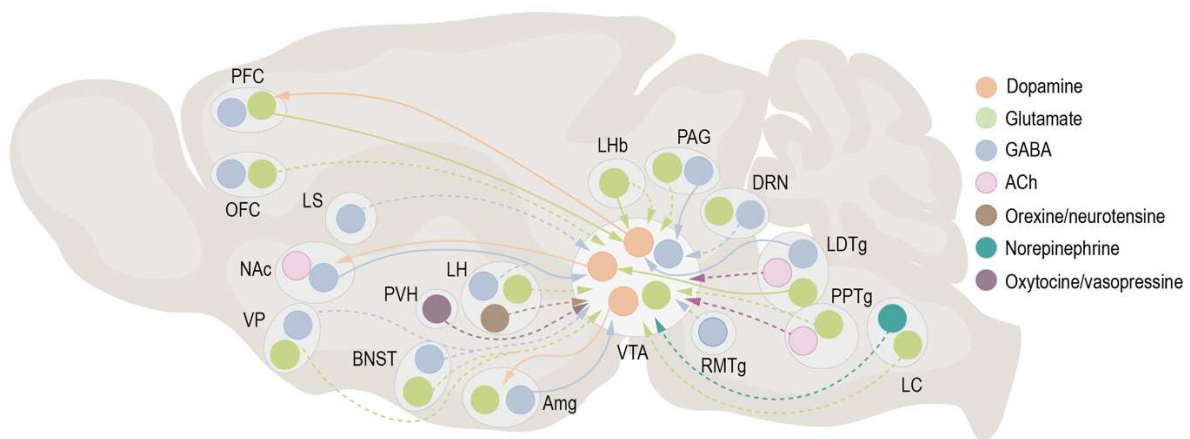


Figure 2.6. Afférences ciblant la VTA | A. Schéma non exhaustif des régions projetant sur la VTA, en retour ou non. Les afférences sont de natures diverses en fonction des régions (glutamate, GABA, acétylcholine, orexine, neurotensine, norepinephrine, oxytocine, vasopressine ; voir code couleur associé sur le schéma). PFC : cortex préfrontal ; OFC : cortex orbitofrontal ; LS : septum latéral ; NAc : noyau accumbens ; VP : pallidum ventral ; BNST : noyau basal de la strie terminale ; PVH : noyau hypothalamique paraventriculaire ; LH : hypothalamus latéral ; Amg : amygdale ; VTA : aire tegmentale ventrale ; RMTg : noyau tegmental mésopontin rostro-médian ; PPTg : noyau tegmental pedoculopontin ; LDTg : noyau tegmental laterodorsal ; LC : locus coeruleus ; DRN : noyau dorsal du raphé ; PAG : substance grise périaqueductale ; LHb : habénula latérale. *D'après Watabe-Uchida et al. 2012, Beier et al. 2015, Dautan et al. 2016, Morales & Margolis 2017, & Zhang et al. 2021.*

b. Régions de projection de la VTA

La VTA projette massivement sur plusieurs régions cérébrales qui constituent, nous l'avons vu, le système de la récompense. J'ai choisi de vous présenter plus en détails deux voies de projection particulières : celle vers le NAc et celle vers l'Amg. En effet, ces deux structures appartenant à la voie mésolimbique ont été l'objet d'une majorité de mes travaux de thèse.

i. Le noyau accumbens

Le noyau accumbens (NAc) a souvent été décrit comme un des « centres du plaisir » au sein du circuit de la récompense. Néanmoins, il est plus juste de définir cette région comme jouant un rôle majeur dans les comportements motivés pour atteindre un objectif (Floresco, 2015). En effet, le NAc est à l'interface entre des régions limbiques, les lobes frontaux et temporaux – comme le PFC, l'hippocampe et l'Amg – et des régions impliquées dans le contrôle moteur.

1. Neuroanatomie

Les travaux pionniers de Lennart Heimer et Gordon Mogenson ont permis d'identifier le NAc comme un noyau adjacent au septum, faisant partie de la région ventrale du striatum bien distincte du reste de la région (Floresco, 2015). Le NAc est une région hétérogène qui a été divisée en sous-régions, sur la base d'une expression différentielle de marqueurs histologiques, ainsi que sur une connectivité constituée d'efférences et d'afférences propres à chaque sous-partie (Zahm, 2000). On considère deux sous-régions principales au sein du NAc : le NAc core et le NAc shell. Le NAc shell est à nouveau divisé en deux parties : le shell médial et le shell latéral (Jong et al., 2022; Lammel et al., 2008, 2011; Roeper, 2013). Parfois, le NAc shell medial est même différencié au niveau de sa partie dorsale versus sa partie ventrale (Al-Hasani et al., 2021).

Parmi les neurones retrouvés dans les différentes sous-parties du NAc on peut citer : i) les MSN (*medium spiny neurons*), ii) les interneurones *fast-spiking*, iii) les interneurones à bas seuil de décharge (LTS, *low-threshold spiking*) et iv) les interneurones cholinergiques (*TAN*, *tonically active neurons*; **Figure 2.7-AB**).

Les MSN représentent 95% des neurones du NAc. Ce sont des neurones GABAergiques, avec une morphologie en épines, qui projettent en dehors de la région et qui constituent la seule sortie vers les ganglions de la base en aval. Les MSN se caractérisent par un potentiel de repos hyperpolarisé et une faible résistance d'entrée. Ces derniers expriment également plusieurs canaux potassiques rectifiants (Kirs; Kreitzer, 2009). Les cinq récepteurs dopaminergiques sont exprimés au sein du NAc mais les plus abondants sont les récepteurs D1 et D2. Aussi, les MSN peuvent être divisés en deux catégories : ceux exprimant le récepteur D1 et ceux exprimant le récepteur D2.

Les LTS sont des interneurones GABAergiques et ne représentent qu'une toute petite proportion des neurones du NAc. Ces interneurones LTS expriment la somatostatine, le neuropeptide Y, la NO synthase ainsi que le récepteur D5 (Kreitzer, 2009). Ces derniers reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex et du thalamus et forment des synapses sur les MSN. Ils sont capables de déclencher des PA à un bas seuil de dépolarisation et possèdent une importante résistance d'entrée ainsi qu'un potentiel de membrane dépolarisé (Kawaguchi, 1993).

Les FS sont des interneurones également GABAergiques et représentent moins de 3% des neurones du NAc. Ces interneurones présentent des caractéristiques similaires aux

neurones FS à parvalbumine que l'on peut retrouver dans le cortex, avec des PA très courts, une très haute fréquence de décharge et la présence de jonctions gap avec les autres interneurons FS (Kawaguchi, 1993). De plus, ils reçoivent des entrées glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus ainsi que des entrées inhibitrices en provenance des autres interneurons du NAc et d'une partie des neurones du Globus Pallidus (Gerfen & Surmeier, 2011; Kreitzer, 2009). Il semblerait qu'un interneurone FS connecte 135 à 541 MSN et qu'un MSN reçoit des entrées d'environ 4 à 27 FS différents (Koós & Tepper, 1999). Aussi, une bouffée d'activité au sein d'un seul interneurone FS peut suffire à retarder voire à bloquer la génération de PA dans les neurones MSN projetant (Koós & Tepper, 1999). Ces interneurons FS expriment également le récepteur D5 et des récepteurs nicotiques (nAChR ; Koós & Tepper, 2002). Les nAChR sont essentiellement présents sur les terminaisons dopaminergiques présynaptiques et sur ces interneurons FS du NAc (alors que les MSN, les interneurons cholinergiques et GABAergiques expriment plutôt des récepteurs cholinergiques muscariniques ; Kreitzer, 2009).

Les TAN sont des interneurons cholinergiques, capables de colibérer du glutamate, et constituent 1 à 2 % des neurones du NAc. Toutefois, leur influence sur les MSN et les interneurons FS est significative du fait de leur très large arborisation axonale. Ils reçoivent des afférences excitatrices majoritairement en provenance du thalamus, et plus rarement du cortex (Gerfen & Surmeier, 2011; Kreitzer, 2009). Ces derniers reçoivent également une inhibition en provenance des MSN. Ils se distinguent par un potentiel de membrane dépolarisé et une forte résistance d'entrée (Kawaguchi, 1993). Les TAN ont la particularité d'être actifs spontanément *in vivo* via des courants sodiques et présentent un courant Ih médié par les canaux HCN (Bennett et al., 2000). Leur fréquence de décharge est comprise entre 2 et 10 Hz avec la présence d'une large hyperpolarisation après chaque PA (Kawaguchi, 1993).. De plus, les TAN sont modulés par la DA car ils expriment les récepteurs D2 mais également D5 (Kreitzer, 2009). En retour, la libération d'acétylcholine et de glutamate par les TAN intervient dans la modulation de la libération de DA au niveau terminal (Sakae et al., 2015).

2. Connectivité

Les neurones MSN constituent la majorité des projections du NAc. Ces projections GABAergiques sont majoritairement vers des structures effectrices comme le pallidum ventral, l'hypothalamus et des régions motrices (Floresco, 2015). Le NAc fait partie des ganglions de la base, avec un rôle dans la mise en place (ou non) d'un mouvement volontaire. Les MSN exprimant le récepteur D1 (D1-MSN) appartiennent à la voie « directe »

ayant pour conséquence l'initiation d'un mouvement volontaire. Au contraire, les MSN exprimant les récepteurs D2 (D2-MSN) appartiennent à la voie « indirecte » qui va cette fois inhiber une action (Gerfen & Surmeier, 2011). Les MSN reçoivent des synapses en provenance des interneurons du NAc ainsi qu'en provenance de collatérales d'autres MSN (Tepper et al., 2004).

Le NAc reçoit de massives projections dopaminergiques en provenance de la VTA, à l'origine de la **voie mésolimbique**. La libération de DA induite par l'activité tonique ou phasique des neurones dopaminergiques va donc moduler l'activité du NAc qui intègre ainsi le signal de RPE (Bromberg-Martin et al., 2010). En effet, nous avons vu que l'activité phasique (*Chapitre 1 partie II.b. ; Chapitre 2 partie II.d.*) est déclenchée par des récompenses primaires ou conditionnées alors que l'omission d'une récompense va induire une diminution de cette activité phasique (Schultz, 1997). Les augmentations et diminutions de la libération de DA engendrées au niveau du NAc vont alors respectivement favoriser l'activation de la voie D1 directe ou D2 indirecte (*Chapitre 2, partie II.d.*).

Le NAc reçoit de la DA en provenance de la VTA mais y renvoie également des projections avec une topographie particulière (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008, 2011). En effet, le NAc core reçoit des projections dopaminergiques en provenance d'une population située au niveau médio-ventral de la VTA. Le NAc shell médial reçoit des afférences dopaminergiques qui se trouvent au niveau médial de la VTA alors que le NAc shell latéral reçoit quant à lui des afférences dopaminergiques situées en partie latérale de la VTA (Lammel et al., 2008 ; **Figure 2.7-C**). Cette ségrégation spécifique reflète une connectivité particulière. En effet, le NAc reçoit de la VTA et envoie à son tour des projections GABAergiques vers celle-ci, induisant un rétrocontrôle de l'activité dopaminergique. Ainsi, le NAc shell médial envoie principalement des projections GABAergiques directes sur les neurones dopaminergiques qui le ciblent (Xia et al., 2011). Sur le même principe, le NAc shell latéral envoie ses projections sur les neurones dopaminergiques qui projettent vers lui en retour (Yang et al., 2018). Cette connectivité réciproque est médiée par les MSN exprimant le récepteur D1 (Yang et al., 2018). Il y a donc existence de voies directes d'inhibition, médiées par une signalisation ionotrope via les récepteurs GABA_A, depuis les sous-régions du NAc vers les neurones dopaminergiques de la VTA qui y projettent respectivement (**Figure 2.7-C**). Ces voies inhibitrices descendantes contactent également des interneurons GABAergiques de la VTA, pouvant potentiellement désinhiber les neurones dopaminergiques (Yang et al., 2018). Une importante interconnexion existe donc entre le NAc et la VTA, qui sera discutée dans la suite de ce manuscrit.

Le NAc reçoit également des afférences excitatrices glutamatergiques en provenance de la BLA (sous-région de l'Amg), de l'hippocampe ou encore du PFC (Floresco, 2015). Chacune de ces régions est spécialisée dans le traitement d'informations spécifiques et peut à son tour avoir un impact sur les comportements soutenus par le NAc. La BLA joue un rôle dans l'association entre des stimuli neutres et un résultat aversif ou appétitif, ainsi que dans la perception de la valeur d'un stimulus et la saillance affective (Everitt et al., 1991; Fernando et al., 2013 ; voir partie suivante IV.b.ii. pour plus de détails sur l'amygdale). L'hippocampe est quant à lui nécessaire dans la navigation spatiale, le rappel d'un contexte particulier ou encore le traitement de la nouveauté (Ito et al., 2008). Enfin le PFC est impliqué dans l'attention sélective, la flexibilité et la mémoire de travail (Christakou et al., 2004; Floresco et al., 1999). Ce dernier joue également un rôle dans l'évaluation du coût et du bénéfice d'une action, et peut influencer le NAc à produire ou non une action.

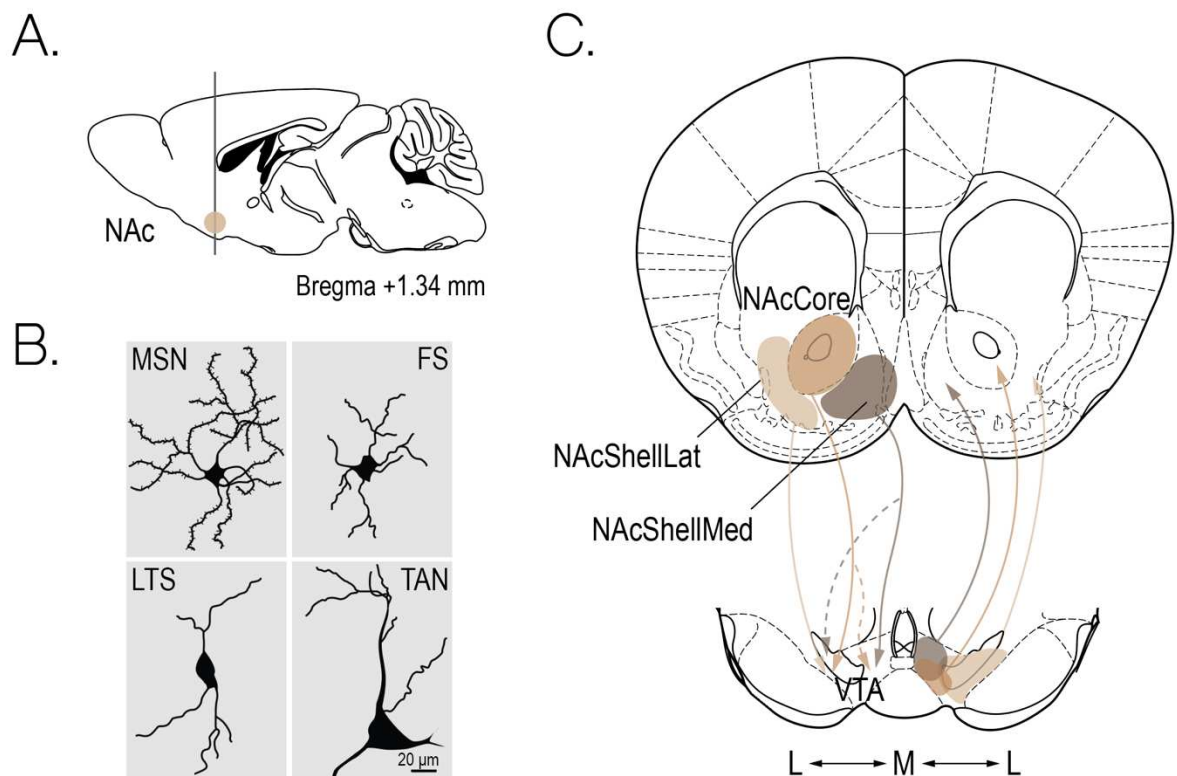


Figure 2.7. Neuroanatomie du NAc et connectivité avec la VTA | A. Localisation du NAc en coupe sagittale, situé à +1.34 mm en avant du bregma. B. Morphologie des types cellulaires retrouvés au sein du NAc chez le rongeur. Représentations schématisques d'un neurone striatal épineux (MSN), d'un interneurone à décharge rapide (FS), d'un interneurone à bas seuil de décharge (LTS) et d'un interneurone cholinergique à activité tonique (TAN). *Adapté de Kreitzer et al. 2009.* C. Schéma de la connectivité réciproque entre les sous-régions du NAc (NAc shell latéral, NAc core, NAc shell médial) et la VTA en fonction d'un axe médio-latéral. M : médial ; L : latéral. *Adapté de Lammel et al. 2008, Beier et al. 2015 & Yang et al. 2018.*

Le NAc est donc au centre de structures en lien avec l'évaluation de l'environnement et de l'état émotionnel d'un individu, ce qui lui permettrait d'intégrer ces informations afin d'évaluer la meilleure action pour atteindre un but.

3. Rôle physiologique

Après les travaux de Schultz et au vu de la forte innervation dopaminergique du NAc, cette région a été catégorisée comme le centre du plaisir impliqué dans tous les comportements liés à la récompense et les traitements associés. Toutefois, la réalité est un peu plus nuancée. Les recherches récentes suggèrent un rôle plus complexe du NAc, notamment dans la sélection de l'action ainsi que l'intégration cognitive et émotionnelle des informations pour guider un comportement. Les neurones des différents noyaux du NAc auraient donc des rôles fonctionnels différents, sous-tendus par leurs connectivités spécifiques.

Plusieurs études ont soulevé l'importance du NAc dans les comportements dirigés vers un but ou induits par des stimuli prédictifs de récompense, et attribué des fonctions différentes au core et au shell (Blaiss & Janak, 2009; Saunders & Robinson, 2012). Une fois le conditionnement établi, le NAc core apparaît nécessaire pour l'expression de l'association avec le stimulus non conditionné alors que le NAc shell permettrait l'inhibition du comportement d'approche lorsque le stimulus conditionné n'est pas présenté (Blaiss & Janak, 2009). La DA libérée au niveau du NAc core permettrait donc l'attribution d'une saillance incitatrice à un indice visuel ou sonore. Le stimulus conditionné serait ainsi transformé en un indice incitateur et motivationnel fort (Saunders & Robinson, 2012). Des différences entre shell et core ont également été montrées dans des tâches de flexibilité comportementale, dans lesquelles les animaux devaient abandonner une réponse acquise afin de modifier leur stratégie pour obtenir la nourriture (Floresco et al., 2006). L'inactivation du NAc core perturbait les changements de stratégie alors que l'inactivation du NAc shell améliorerait l'acquisition de nouvelles réponses comportementales. Le NAc core serait alors impliqué dans la sélection d'une action et l'initiation d'un comportement dirigé vers un but, tandis que le shell jouerait plutôt un rôle dans la suppression des actions inappropriées qui pourraient interférer avec l'objectif à atteindre.

Le NAc contribue donc à la discrimination et au comportement d'approche, mais il joue également un rôle dans la médiation des réponses aux stimuli aversifs. Ainsi, une inactivation du NAc impacte l'acquisition et l'expression d'un évitement conditionné (Floresco, 2015). Le NAc pourrait alors permettre d'initier des comportements vers des stimuli jugés sûrs

alors qu'il initierait des comportements d'évitements pour des stimuli associés à des événements aversifs.

Des sous-circuits mésolimbiques VTA-NAc spécifiques, ont été impliqués dans le traitement des stimuli renforçants et aversifs. Lors d'un apprentissage associatif récompensant, les dynamiques de libération de DA dans le NAc core et dans le NAc shell latéral, concordent avec un encodage de la valeur et de la RPE (Day et al., 2007; de Jong et al., 2019). Dans ces régions, on constate en effet une augmentation de la libération de DA au moment de la récompense ou de l'indice prédictif de cette récompense, et une moindre libération dans le cas d'omission de la récompense. Par ailleurs, la libération de DA provoquée par un indice prédictif dans le NAc core reflète sa valeur motivationnelle, en fonction de la future récompense. En effet, des augmentations plus importantes de DA y étaient observées chez des animaux « privés » de nourriture pour qui les récompenses attendues (sucrose, pellet) avaient alors une plus grande valeur (Aitken et al., 2016). En revanche, la libération de DA dans le NAc shell medial ne semble pas encoder la RPE ou la valeur mais pourrait, dans le cadre d'un conditionnement aversif, refléter la saillance des stimuli aversifs et leur indice prédictif (de Jong et al., 2019 ; voir *Chapitre 3, partie III.a., concernant les stimuli aversifs*).

Il existe également des données suggérant l'existence de sous-circuits GABAergiques au sein d'un même noyau du NAc, ayant des rôles différents dans les comportements motivés et affectifs. Ainsi, l'inactivation du NAc shell médial en partie rostrale provoque un comportement alimentaire alors que l'inactivation du NAc shell médial en partie caudale provoque un comportement de défense et de peur (Reynolds & Berridge, 2002). Ces résultats suggèrent que les MSN du NAc shell médial peuvent appartenir à des circuits différents en fonction de leurs afférences et de leurs projections. Dans cette idée, il a récemment été montré que les neurones du NAc shell medial recevant des afférences de la BLA ou du PVT constituent deux sous-populations fonctionnelles distinctes, projetant de manières différentes sur la VTA et le LH (Zhou et al., 2022). Ainsi, l'activation des MSN du medial shell appartenant à la voie BLA-NAc-VTA est récompensante et induit une préférence de place en désinhibant les neurones dopaminergiques. A l'inverse, l'activation des MSN de la voie PVT-NAc-LH est aversive et induit un évitement.

Enfin, comme abordé plus haut, des rôles spécifiques ont longtemps été attribués aux D1-MSN et D2-MSN. Les D1-MSN auraient un rôle prépondérant dans la signalisation des récompenses et l'apprentissage associatif positif alors que les D2-MSN interviendraient au contraire dans la médiation des stimuli aversifs et l'apprentissage associatif négatif. Des études récentes démontrent cependant que ces rôles sont loin d'être aussi tranchés. Par

exemple, des stimulations optogénétiques de courte durée (1s) des D1-MSN et D2-MSN du NAc core induisent un renforcement positif alors que des stimulations plus longues (60s) induisent un effet aversif. Les effets des stimulations prolongées pourraient impliquer les récepteurs aux opioïdes dans des circuits différents vers la VTA : soit direct via les D1-MSN, soit indirect via les D2-MSN (relai au niveau du pallidum ventral ; Soares-Cunha et al., 2020). De même, l'activation optogénétique des D2-MSN du NAc core au moment de l'indice prédictif de récompense augmente la motivation durant un comportement opérant, mais la réduit lorsque la stimulation est délivrée au moment de la récompense (Soares-Cunha et al., 2022). Par ailleurs, une récente étude d'imagerie calcique dans le NAc core durant un conditionnement positif opérant, a montré que les profils de réponses des D1-MSN et des D2-MSN en fonction de la RPE, formaient des « clusters » d'activité de différents types. Ces résultats vont à l'encontre de l'idée d'un codage homogène de la RPE par les MSN et reflèteraient l'existence de sous-populations fonctionnelles distinctes au sein de ces deux types neuronaux (Nishioka et al., 2023).

ii. L'amygdale

L'amygdale (Amg) est une région importante dans le traitement des émotions et des réponses comportementales en réponse à des stimuli comme une menace ou de la nourriture. C'est une région clef des comportements de peur et d'anxiété, et est considérée comme un médiateur de l'impact des émotions négatives sur la mémoire.

1. Neuroanatomie

L'Amg se divise en sous-noyaux répondant à des caractéristiques et des comportements distincts. Il semblerait que l'on puisse diviser l'Amg en 13 sous-noyaux différents (McDonald, 2003; Sah et al., 2003). Parmi les principaux et les plus étudiés, on peut nommer : i) le complexe basolatéral (BLA) formé de l'amygdale latérale (LA), basale (BA) et basomédiale (BM), ii) le noyau central (CeA) regroupant la division latérale (CeL) et médiale (CeM), ainsi que iii) l'amygdale médiale (MeA ; Zhang et al., 2021). Un autre ensemble composé de noyaux inhibiteurs se situe à l'interface entre la BLA et la CeA et est connu sous le nom de « cluster de cellules intercalées » (*intercalated cell clusters*).

Au sein de la BLA, on retrouve majoritairement des neurones glutamatergiques nommés « principaux » ainsi que des interneurones GABAergiques inhibiteurs (**Figure 2.8-AB**).

La majorité des neurones de la BLA est constituée de cellules dites *principales* : pyramidales épineuses ou classe I. Ces dernières représentent 90% des neurones de la BLA (chez la

souris) et sont des cellules de projection (Sah et al., 2003; Washburn & Moises, 1992). Ces cellules pyramidales présentent une large AHP après une bouffée de PA, responsable d'une adaptation caractéristique de la fréquence de décharge (Washburn & Moises, 1992). Les enregistrements *in vivo* et *ex vivo* n'ont montré que très peu d'activité spontanée au sein de la BLA, bien qu'en partie basale des neurones émettent des bouffées de PA au repos. On peut noter deux types de cellules pyramidales : les cellules burstantes et celles à décharge régulière (*repetitive*). Les cellules burstantes déclenchent des trains de PA avant de cesser de décharger alors que les cellules à décharge régulière ne présentent que peu d'adaptation de leur fréquence (Sah et al., 2003). Parmi les cellules pyramidales, on retrouve également des neurones nommés *late-firing*, en raison de leur délai à émettre un PA à la suite d'un courant dépolarisant. Ce délai serait dû à la présence du courant inactivateur potassique I_D (Washburn & Moises, 1992).

Parmi les 10% restants des neurones de la BLA, on retrouve des interneurones GABAergiques ou neurones de classe II. Ces interneurones expriment des marqueurs comme la parvalbumine, la somatostatine, la calbindine, la cholecystokinine, la calretinine ou encore le neuropeptide Y (Beyeler & Dabrowska, 2020; Capogna, 2014). On note des interneurones présentant des durées de PA très courtes et pouvant décharger à haute fréquence (*fast-firing*) sans adaptation à la suite d'une injection de courant dépolarisant (Washburn & Moises, 1992). Contrairement aux cellules pyramidales, les interneurones GABAergiques sont actifs spontanément *in vivo* avec une fréquence de décharge comprises entre 10 et 15 Hz (Sah et al., 2003). Les propriétés de ces neurones sont très similaires aux neurones inhibiteurs retrouvés au niveau du cortex et de l'hippocampe. Certains de ces interneurones entourent le soma des cellules pyramidales, exerçant un fort contrôle inhibiteur sur la sortie de ces cellules (Capogna, 2014).

Au sein de la CeA, on retrouve majoritairement des neurones inhibiteurs. Les neurones en plus grande proportion au sein des sous-divisions de la CeA sont des MSN. Ces neurones épineux sont des neurones GABAergiques de projection, semblables à ceux décrits au niveau du NAc (*voir partie IV.b.i.1.*; McDonald, 1982). D'un point de vue électrophysiologique, il semblerait y avoir trois types de cellules distinctes : les neurones à bas seuil de décharge, les neurones à décharge régulière et les neurones *late-firing* (Sah et al., 2003).

En résumé, la BLA possède une architecture *cortical-like* avec des neurones glutamatergiques et des interneurones inhibiteurs, tandis que la CeA est plutôt *striatal-like* avec majoritairement des neurones inhibiteurs.

2. Connectivité

La BLA est généralement considérée comme la principale entrée de l'Amg où l'information est traitée puis ensuite transmise à la CeA afin de générer des réponses appropriées en condition de peur ou d'anxiété. Elle intègre des informations en provenance d'une multitude de régions. Au sein de la BLA, la partie latérale (LA) reçoit des informations du thalamus, des cortex associatifs et du tronc cérébral, ensuite transmises à la partie basale (BA) où des informations contextuelles en provenance du PFC et de l'hippocampe convergent également (Zhang et al., 2021). De plus, la BLA est la cible d'une importante neuromodulation des régions de la VTA, du raphé dorsal et du locus coeruleus. Additionné à cela, une importante interconnexion est présente entre la BLA et le PFC. En effet, la BLA envoie des efférences glutamatergiques au niveau du PFC qui envoie en retour des projections également glutamatergiques (Liu et al., 2020). Enfin, la BLA envoie des efférences glutamatergiques au niveau du NAc qui seraient impliquées dans le renforcement positif (Zhou et al., 2022).

La CeA, quant à elle, est considérée comme une des principales sorties de la BLA. En plus des afférences glutamatergiques en provenance de la BLA, la CeA reçoit également des projections d'autres régions. Les connexions avec le cortex insulaire sont impliquées dans la régulation de la prise de nourriture, celles avec le noyau paraventriculaire du thalamus dans la régulation de la mémoire de peur, et celles avec l'hippocampe dans la récupération des comportements de peur en fonction du contexte (Zhang et al., 2021). La CeA projette à son tour vers la VTA, la substance grise periaqueducatale, l'hypothalamus et le tronc cérébral. Le BNST, faisant partie de « l'extension amygdalaire » est également très connecté avec la CeA.

Au sein de la voie mésolimbique, la VTA envoie des efférences vers le NAc, mais également au niveau de la BLA et de la CeA (De la Mora et al., 2010). Les afférences dopaminergiques de la VTA vers les sous-noyaux de l'Amg rejoignent en majorité le sillon du MFB (Swanson, 1982). Aussi, la BLA reçoit une forte innervation dopaminergique en provenance des neurones situés en partie médio-dorsale de la VTA (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008). Une importante proportion de D1R et D2R est retrouvée au sein des noyaux de l'Amg, dans des populations de neurones n'exprimant pas les deux à la fois. Réciproquement, la VTA reçoit des efférences GABAergiques en provenance de la CeA (Zhang et al., 2021; **Figure 2.8-C**).

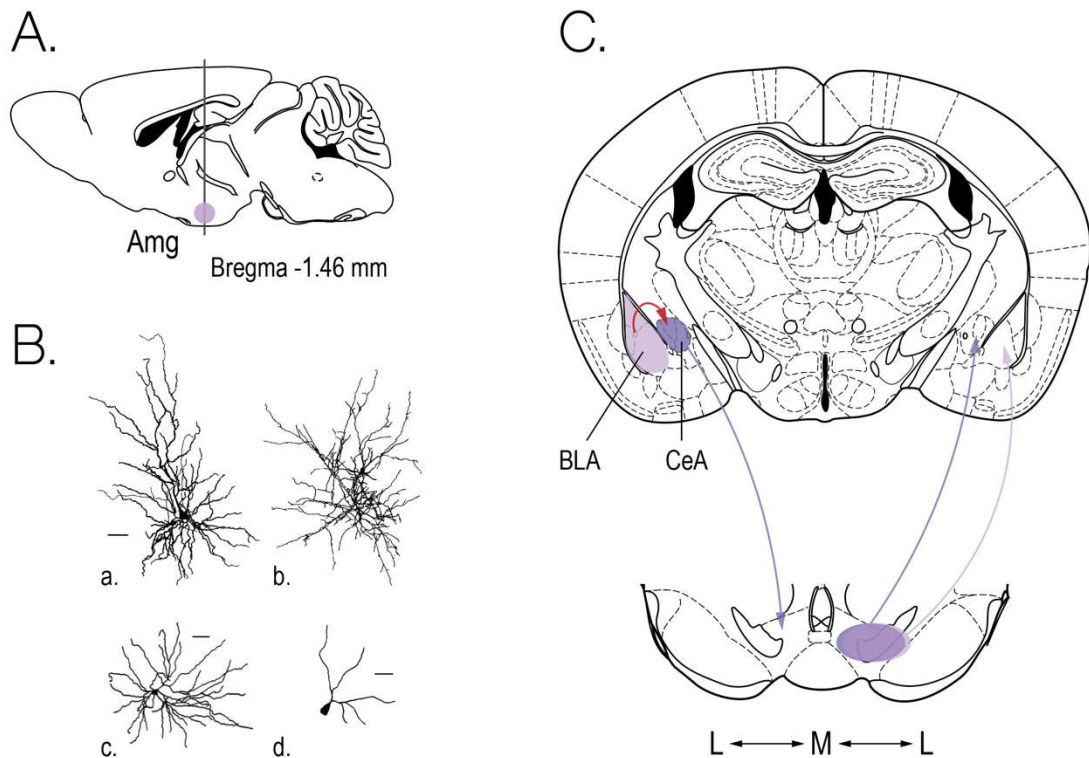


Figure 2.8. Neuroanatomie de l'Amg et connectivité avec la VTA | **A.** Localisation de l'Amg en coupe sagittale, située à -1.46 mm en arrière du bregma. **B.** Morphologie des types cellulaires retrouvés au sein de l'Amg chez le rongeur. Reconstitutions de neurones retrouvés au sein de la BLA chez le rat: a. cellule pyramidale épineuse de projection; b. interneurone non pyramidal; c. cellule pyramidale *late-firing*; d. interneurone *fast-firing* non épineux. Adapté de Washburn et al. 1982 & McDonald 2003. **C.** Schéma de la connectivité réciproque entre l'Amg (BLA/CeA) et la VTA en fonction d'un axe médio-latéral. M: médial; L: latéral. Adapté de Beier et al. 2015 & Zhang et al. 2021.

3. Rôle physiologique

L'Amg a un rôle prédominant dans les états aversifs tels que l'anxiété et les comportements liés à la récompense, ainsi que dans les processus en lien avec la mémoire émotionnelle. Un des principaux rôles de l'amygdale repose sur la consolidation de l'apprentissage et de la mémoire. En effet, une expérience vécue va recruter l'hippocampe qui stocke les informations spatiales et contextuelles, mais également les glandes surrénales si cette expérience est liée à de l'affect, aboutissant à une libération de noradrénaline et de glucocorticoïdes au sein de la BLA. Cette activité dans la BLA, liée au stress de l'environnement, va ainsi impacter en retour la plasticité d'autres régions comme l'hippocampe où elle projette (McGaugh, 2000 ; Roozendaal et al., 2009).

L'Amg est importante pour le traitement des émotions et il a été montré son rôle dans les comportements liés à l'anxiété (Janak & Tye, 2015; Kalin et al., 2004; Liu et al., 2020; Roozendaal et al., 2009; Zhang et al., 2021). En effet, il a été observé une augmentation de l'activité des neurones de la BLA après un choc à la patte chez des chats (Pelletier et al., 2005). La décharge des neurones augmentait progressivement après le choc, avec un maximum d'activité 30 à 50 minutes après le choc et revenant à un niveau de base après 2 heures. Durant cette longue période d'activité, il a été observé une synchronisation plus importante qu'au repos (Pelletier et al., 2005). Ainsi, un stimulus aversif produit bien un changement d'activité durable dans le temps au niveau de la BLA, qui pourrait ainsi avoir des conséquences dans la consolidation de la mémoire via les structures cibles.

La signalisation dopaminergique dans l'Amg joue également un rôle prédominant dans les états liés à l'anxiété (*voir Chapitres Résultats et Discussion*). En effet, l'infusion dans l'Amg d'agonistes ou d'antagonistes D1 provoque respectivement des effets anxiogènes ou anxiolytiques (De la Mora et al., 2010; Zarrindast & Khakpai, 2015). En conditions dites normales, l'activité de la BLA est sous l'influence inhibitrice du PFC qui supprime son activité spontanée et sensorielle, alors qu'en conditions stressantes, la DA en provenance de la VTA libère la BLA de cette inhibition (Zarrindast & Khakpai, 2015). Cette inhibition de la BLA par le PFC est médiée par l'excitation des interneurons GABAergiques de la BLA (Grace & Rosenkranz, 2002). L'activation des récepteurs dopaminergiques atténue cette action inhibitrice du PFC en augmentant l'excitabilité postsynaptique des neurones de projection de la BLA. Une activation des récepteurs dopaminergiques au sein de la BLA va donc permettre une réponse de cette région aux stimuli sensoriels (Grace & Rosenkranz, 2002). Il a donc été proposé que, lors d'une libération phasique de DA associée à un stimulus affectif ou saillant, la réponse des neurones de la BLA aux afférences sensorielles liées à ce stimulus est potentiée, au détriment d'autres entrées sensorielles (Rosenkranz & Grace, 1999). En accord avec cette idée, l'inhibition de la voie VTA-BLA au moment d'un stimulus aversif réduit la force de la mémoire de peur acquise après un conditionnement aversif (Tang et al., 2020). De plus, l'atténuation de la réponse des neurones dopaminergiques aux stimuli aversifs, chez des souris mutantes où le récepteur NMDA est inactivé, entraîne une altération de l'association entre l'indice prédictif et le stimulus aversif. Cette altération associative est accompagnée d'un état d'anxiété généralisé (Zweifel et al., 2011). Enfin, l'activation optogénétique des neurones dopaminergiques de la voie VTA-CeA durant un stimulus associé à un événement aversif, prévient la généralisation des réponses de peur à des stimuli neutres, observée dans une tâche de conditionnement à la peur en condition d'incertitude (Yong et al., 2018). À l'inverse, l'infusion d'antagonistes des D2R ou une augmentation de la signalisation AMPc-PKA dans la CeA promeut une peur

généralisée après conditionnement (De Bundel et al., 2016; Ghosh & Chattarji, 2015). Ces données suggèrent un rôle de la DA dans le filtrage des informations traitées par l'Amg afin d'acquies une réponse de peur appropriée pour un stimulus menaçant. Un déficit dans ce filtrage entraînerait alors une mauvaise discrimination des stimuli neutres, induisant un état d'anxiété et de peur généralisé. En accord avec cette idée, un stress social chronique diminue durablement l'activité des neurones dopaminergiques projetant vers la BLA, et la compensation de cet effet par une activation optogénétique diminue l'état d'anxiété induit par ce stress social (Morel et al., 2022).

Par ailleurs, l'activation spécifique des projections glutamatergiques de la BLA vers la CeA induit un effet anxiolytique réversible alors que leur inhibition a des conséquences anxiogènes (Tye et al., 2011). De manière intéressante, un contrôle optogénétique au niveau du soma des pyramides de la BLA, sans cibler spécifiquement la projection vers la CeA, n'induit pas les mêmes effets. Ces résultats indiquent que la voie BLA-CeA exerce un contrôle sur les états liés à l'anxiété.

L'Amg, et notamment le complexe BLA-CeA, a largement été impliquée dans les processus d'apprentissage et de conditionnement à la peur (Ehrlich et al., 2009). L'activité des neurones de la CeA se révèle indispensable à l'acquisition et à l'expression de la réponse de peur induite par un stimulus menaçant (Ciocchi et al., 2010). De même, les neurones de la BLA répondent aux stimuli menaçants (Wolff et al., 2014) et développent une plasticité au cours d'un conditionnement de peur (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Namburi et al., 2015). Cette activité est cruciale car une inhibition des neurones principaux de la BLA durant un stimulus aversif perturbe l'apprentissage d'une réponse de peur (Namburi et al., 2015; Wolff et al., 2014) alors qu'une activation la renforce (Johansen et al., 2010).

Outre son lien avec des émotions négatives, l'Amg joue également un rôle dans l'attribution d'une valeur à un stimulus notamment dans le cadre du renforcement (Baxter & Murray, 2002). En effet, la BLA attribue une valeur émotionnelle à des événements ou des indices de l'environnement notamment ceux prédictifs d'une récompense. Des enregistrements électrophysiologiques ont permis de montrer le rôle de la BLA dans l'encodage des propriétés motivationnelles et renforçantes d'une récompense (Tye & Janak, 2007). En effet, deux groupes de rats ont été entraînés à obtenir du sucrose, soit dans un cas prédit par un indice visuel soit dans un autre cas l'indice était présenté de façon aléatoire. Après la période de conditionnement, il a été effectué une période d'extinction puis de réintégration de l'indice. Les auteurs ont ainsi montré qu'une population de neurones codait pour la motivation incitatrice car elle s'activait au moment où l'indice visuel apparaissait, alors qu'une

autre population maintenait son activité pendant toute la durée de la réponse conditionnée (Tye & Janak, 2007). Dans ce cas, l'indice visuel peut donc agir comme un motivateur en agissant sur l'état motivé pour atteindre une récompense ou alors comme un renforçateur pour soutenir une réponse instrumentale. L'Amg apparaît ainsi comme un lieu d'encodage pour des comportements dirigés vers une récompense. De plus, il a été montré que l'activation des neurones de la BLA au moment d'un stimulus prédictif d'une récompense, facilite la recherche de récompense en excitant les neurones du NAc via des connections glutamatergiques directes (Ambroggi et al., 2008). Dans une tâche d'autostimulation, l'activation de cette voie par optogénétique établit un renforcement positif, nécessitant la signalisation dopaminergique des D1R dans le NAc (Stuber et al., 2011). Ces résultats démontrent que la VTA, l'Amg et le NAc, agissent de manière coordonnée pour établir un renforcement positif. Ceci pourrait suggérer l'existence d'un codage de la valeur prédictive et de la RPE au sein de l'Amg, comme observé au niveau de la VTA et du NAc. Bien qu'un tel codage n'ait pas encore été démontré, il existe cependant des neurones dans l'Amg, appartenant à des circuits distincts, qui sont impliqués dans le codage de la valence positive ou négative. Les neurones encodant les valences positives et négatives seraient distribués selon un axe dorso-ventral au sein de la BLA. Ainsi, on retrouve majoritairement les neurones répondant à des stimuli aversifs en partie dorsale et ceux répondant à des stimuli renforçants en partie ventrale de la BLA (Beyeler et al., 2018). Enfin, les neurones de la voie BLA-CeA aurait un rôle dans le codage de la valence négative des indices prédictifs aversifs, alors que la voie BLA-NAc coderait préférentiellement la valence positive des stimuli prédictifs de récompense (Beyeler et al., 2016; Namburi et al., 2015). Il convient également de souligner que les neurones dopaminergiques de la voie VTA-BLA s'activent à la fois aux récompenses et aux stimuli aversifs ainsi qu'à leur indice prédictif. Ceci indique que la BLA pourrait intégrer la saillance des stimuli ; les saillances aversives ou incitatrices étant encodées par l'activité de neurones différents (Lutas et al., 2019).

La voie VTA-Amg semble ainsi coder pour des stimuli et des comportements sensiblement différents de ceux intégrés par le NAc. Aussi, les effets parfois opposés, médiés par ces deux voies de projection, seront abordés plus en détails lors des résultats de mes travaux de thèse, notamment sous le prisme d'action des drogues d'abus.

V. Effet des drogues sur la neurotransmission dopaminergique

Le système dopaminergique mésolimbique est la cible de drogues d'abus et joue un rôle prépondérant dans l'acquisition des comportements renforcés par ces drogues addictives. La mise en place de la dépendance est expliquée par l'action initiale des drogues au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA (Ikemoto et al., 2006; Juarez & Han, 2016; Lüscher, 2016; Morel et al., 2019; Pascoli et al., 2015; Volkow & Morales, 2015). En effet, les drogues addictives favorisent le renforcement en augmentant la libération de DA notamment au niveau du NAc (Di Chiara & Imperato, 1988) et y altère la plasticité synaptique glutamatergique (Allichon et al., 2021; Lüscher, 2016).

Néanmoins, toutes les drogues d'abus ne vont pas cibler les neurones dopaminergiques de la même manière. En effet, on peut classer les drogues d'abus en trois catégories en fonction de leur mode d'action : i) les drogues dépolarisant directement les neurones dopaminergiques au niveau somatique, ii) les drogues désinhibant les neurones dopaminergiques, ou iii) les drogues agissant au niveau terminal dans les structures de projection.

La nicotine est connue pour être une drogue ciblant directement le soma des neurones dopaminergiques et GABAergiques de la VTA, en se fixant spécifiquement sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR), ionotropes, qui vont avoir pour conséquence la dépolarisation directe du neurone (Maskos et al., 2005 ; *le renforcement à la nicotine sera abordé dans le chapitre suivant*). L'alcool est également présumé agir directement au niveau somatique, bien que son action sur un type précis de récepteur ne soit pas avérée. L'alcool agirait sur une multitude de récepteurs comme les GABA_A, les récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA, les GIRK métabotropes, les VGCC ou encore les nAChR (Morel et al., 2019; Narahashi et al., 1999). Il a été montré, dans l'équipe, que la consommation d'alcool était modifiée chez des souris délétées de la sous-unité nicotinique $\beta 4$ dans un paradigme comportemental de choix à deux bouteilles (Tolu et al., 2017). Toutefois, les cibles moléculaires de l'alcool étant variées, une autre hypothèse d'action de l'éthanol consisterait en une désinhibition des neurones dopaminergiques, via une action préférentielle sur les neurones GABAergiques de la VTA (Xiao & Ye, 2008).

D'autres drogues sont connues pour entraîner une désinhibition des neurones dopaminergiques. On peut nommer les opioïdes – dont la morphine – qui hyperpolarisent les neurones GABAergiques via les récepteurs μ (Johnson & North, 1992); les benzodiazépines qui inhibent les neurones GABAergiques via les récepteurs GABA_A (Tan

et al., 2010) ; ainsi que le GHB qui médie son action via les récepteurs GABA_B couplés au GIRK spécifiquement dans les neurones GABAergiques (Cruz et al., 2004).

Une autre catégorie des drogues d'abus n'agit pas directement au niveau de la VTA mais au niveau des terminaisons axonales, spécifiquement au niveau du NAc. Parmi les drogues interférant avec les processus de libération ou de recapture, on peut citer la cocaïne, les amphétamines et l'ectasy qui vont agir sur le transporteur DAT, inhibant la recapture de DA (Kuhar et al., 1991; Lüscher & Malenka, 2011). Cette troisième catégorie de drogues d'abus a également un effet sur la synthèse de la DA et le transporteur VMAT2 (Reith & Gnegy, 2020).

Les drogues d'abus vont donc déclencher, à chaque prise, des libérations massives de DA dans des régions telles que le NAc et l'Amg. Ces dernières sont impliquées dans l'évaluation des récompenses et des stimuli aversifs, les processus de renforcement positif et négatif, l'expression de comportements d'approche et d'évitement, ainsi que dans les états anxieux ou hédoniques. Ces régions peuvent induire des effets synergiques ou opposés, reflétant la complexité des processus régissant l'addiction. De plus, la balance entre les effets positifs ou négatifs des drogues peut varier d'une substance à l'autre, selon leur mode d'action spécifique sur les différents éléments du circuit de la récompense. Le chapitre suivant sera consacré à la nicotine et plus particulièrement au renforcement à cette drogue ainsi qu'aux effets négatifs associés.

Chapitre 3 : Renforcement à la nicotine & effets négatifs associés

Il est admis que les drogues addictives telles que la nicotine détournent les mécanismes d'apprentissage par renforcement, ce qui entraîne une surévaluation de la récompense matérialisée par la drogue au détriment des récompenses naturelles. Nous avons précédemment décrit le système de la récompense et comment, au sein de ce dernier, la DA est impliquée dans les différents dérèglements menant à l'addiction. Nous allons à présent détailler le renforcement dans le cadre spécifique de la prise de nicotine. La nicotine agit spécifiquement au niveau des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine pour médier des effets qui peuvent conduire, certes, à un renforcement et à une dépendance, mais qui peuvent également engendrer un lot de conséquences indésirables liées à une consommation prolongée.

I. Transmission nicotinique des neurones dopaminergiques

a. L'acétylcholine

La découverte de l'acétylcholine par Henry Dale en 1913 a permis des progrès considérables dans la compréhension de la neurotransmission chimique. Dale montre que l'acétylcholine reproduit les effets de la muscarine et de la nicotine sur des cellules ganglionnaires du système parasympathique, les terminaisons de fibres nerveuses musculaires ainsi que sur les terminaisons périphériques de nerfs volontaires crâniens (Tansey, 2006). En 1921, Otto Loewi va réaliser une expérience qui deviendra incontournable dans les années à venir. Il observe alors que la stimulation électrique du nerf vague d'un cœur isolé de grenouille, perfusé par un liquide physiologique, entraîne une baisse des battements cardiaques. Lorsqu'il transfère le liquide recueilli à un second cœur privé de nerfs, il constate que ce dernier se met également à ralentir. Ces travaux signent la preuve d'une transmission chimique et non seulement électrique au niveau des synapses, à la fois au niveau du système parasympathique mais aussi du système nerveux central. Le prix Nobel de physiologie et de médecine est ainsi attribué en 1936 à Henry Dale et Otto Loewi pour leur découverte du rôle de l'acétylcholine dans la transmission chimique de l'influx nerveux.

L'acétylcholine est synthétisée par la choline acétyltransférase (ChAT) au niveau du cytosol des neurones cholinergiques, qui permet le transfert de l'acétyl-coenzyme A (Acétyl CoA)

sur la choline (**Figure 3.1**). L'Acétyl CoA est présent au niveau des mitochondries et résulte de la dégradation du glucose en pyruvate. En effet, l'enzyme mitochondriale nommée pyruvate déshydrogénase, va transformer le pyruvate en Acétyl CoA. Une fois l'acétylcholine (ACh) produite, elle est transportée et stockée dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT). Une fois l'ACh libérée dans l'espace extracellulaire, cette dernière va se fixer sur des récepteurs cholinergiques situés en post-synaptiques (**Figure 3.1**). L'ACh sera ensuite dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE) en choline, qui sera à son tour recapturée au niveau des terminaisons pré-synaptiques par le transporteur de la choline (ChT). Cette dégradation de l'ACh permet de réguler sa concentration dans l'espace extrasynaptique.

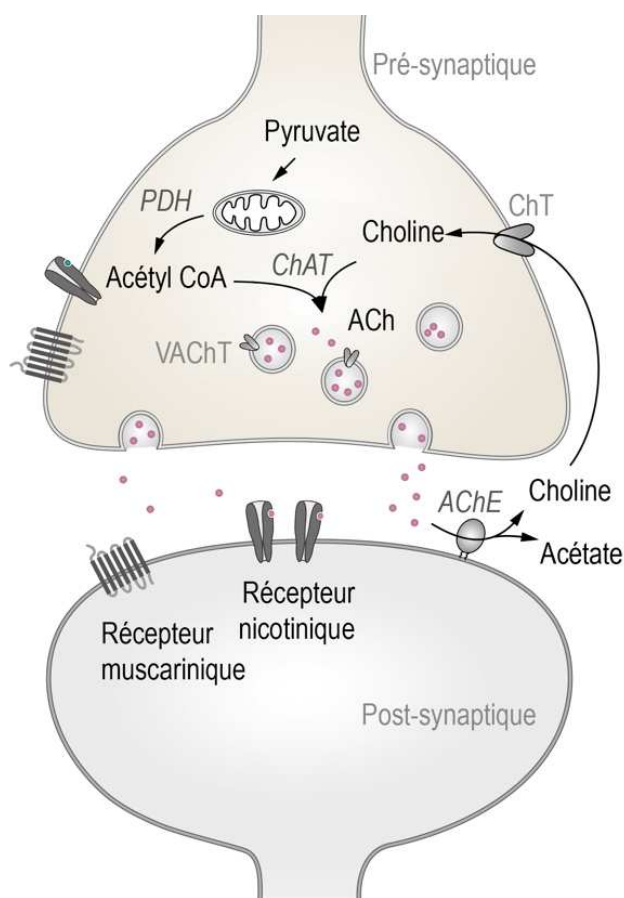


Figure 3.1. Synthèse et régulation cholinergique | A. Schéma de la synthèse de l'ACh au niveau présynaptique d'un neurone cholinergique. L'ACh est synthétisée à partir de Choline et d'Acétyl CoA. Elle est ensuite accumulée dans des vésicules via l'action du transporteur VACHT. Une fois libérée dans l'espace extrasynaptique, l'ACh va se fixer sur des récepteurs nicotiniques ou muscariniques. L'excédent d'ACh sera dégradé par l'AChE en Choline, recapturée ensuite par son transporteur (ChT) situé au niveau de la terminaison présynaptique.

Tout comme dans le cas de la DA, l'existence d'une transmission synaptique cholinergique fait débat. Il a longtemps été admis que le mode de libération de l'ACh reposait sur une transmission volumique, avec la présence de nombreuses récepteurs extra-synaptiques (Mrzljak et al., 1993; Sarter et al., 2009). Cependant, bien que son rôle de neuromodulateur soit préféré (Picciotto et al., 2012), il a été montré l'existence de transmissions synaptiques rapides (Sarter et al., 2009; Turrini et al., 2001). L'ACh, une fois libérée par le neurone présynaptique, va agir sur deux types de récepteurs : i) les récepteurs nicotiniques, ionotropes et liant la nicotine, et ii) les récepteurs muscariniques, métabotropes et liant la

muscarine. Dans ce chapitre, j'aborderai uniquement les récepteurs nicotiniques de l'ACh, sur lesquels mes travaux de thèse se sont basés.

Par ailleurs, les neurones cholinergiques sont regroupés dans des régions spécifiques du système nerveux central comme les noyaux du pons (PPTg et LDTg), l'habénula médiale et le télencéphale basal. On compte également quelques interneurons cholinergiques (TAN) au niveau du striatum (*voir Chapitre 2, partie IV.b.i.1.*) et du cortex. Ces neurones cholinergiques envoient des efférences vers de nombreuses régions du cerveau et sont notamment impliqués dans la régulation des fonctions métaboliques et l'alimentation, le sommeil ou encore l'intégration de la récompense (Picciotto et al., 2012). Un détournement de cette signalisation cholinergique peut conduire à des pathologies comme l'addiction, point qui sera développé dans les parties suivantes (*partie II-a. et II-c.*).

b. Les récepteurs nicotiniques au sein du circuit de la récompense

i. Structure générale

Les récepteurs nicotiniques (nAChR) sont des récepteurs ionotropes, c'est à dire des canaux constitués de protéines membranaires, dont l'activation permet le passage d'ions à travers la membrane plasmique. Ce sont des récepteurs cationiques perméables au sodium, potassium et parfois au calcium (Taly et al., 2009). Il existe deux grandes classes de récepteurs : les récepteurs nicotiniques musculaires, impliqués dans la transmission électrique à l'origine de la contraction musculaire, et les récepteurs nicotiniques neuronaux, à l'origine de la transmission électrique au sein du système nerveux central. Les sous-unités des nAChR diffèrent en fonction de la localisation. En effet, on dénombre cinq sous-unités $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ et ϵ dans le muscle alors qu'on en compte douze au sein des neurones, neufs α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) et trois β ($\beta 2$ - $\beta 4$). On note également la présence de nAChR au sein de cellules du système immunitaire, dont les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ et $\alpha 10$ (Fujii et al., 2017).

Les nAChR appartiennent à la famille des *cys-loop*, possédant une boucle cystéine caractéristique. Dans cette superfamille, on retrouve d'autres récepteurs comme les GABA_A, les récepteurs de la sérotonine (5HT₃) et ceux de la glycine. Les récepteurs *cys-loop* possèdent un large domaine extracellulaire (N-terminal), 4 domaines transmembranaires (M1-M4) qui forment le canal ionique et un domaine intracellulaire entre les domaines M3 et M4 (Albuquerque et al., 2009; Changeux, 2010 ; **Figure 3.2-B**). Le domaine M4 est relié à une partie carboxy-terminale extracellulaire. La boucle située dans le premier domaine

extracellulaire est caractérisée chez les mammifères par la présence notamment de 13 acides aminés bordés par deux cystéines formant un pont disulfure (Albuquerque et al., 2009). Cette paire de cystéines constitue une partie du site de liaison agoniste – acétylcholine ou nicotine – et caractérise ce que l'on appelle les sous-unités α , « composant principal » des nAChR (Albuquerque et al., 2009; Taly et al., 2009). Les sous-unités β sont le second type de sous-unités nicotiques et constituent les « composants complémentaires » du site de liaison de l'acétylcholine (Taly et al., 2009 ; **Figure 3.2-A**).

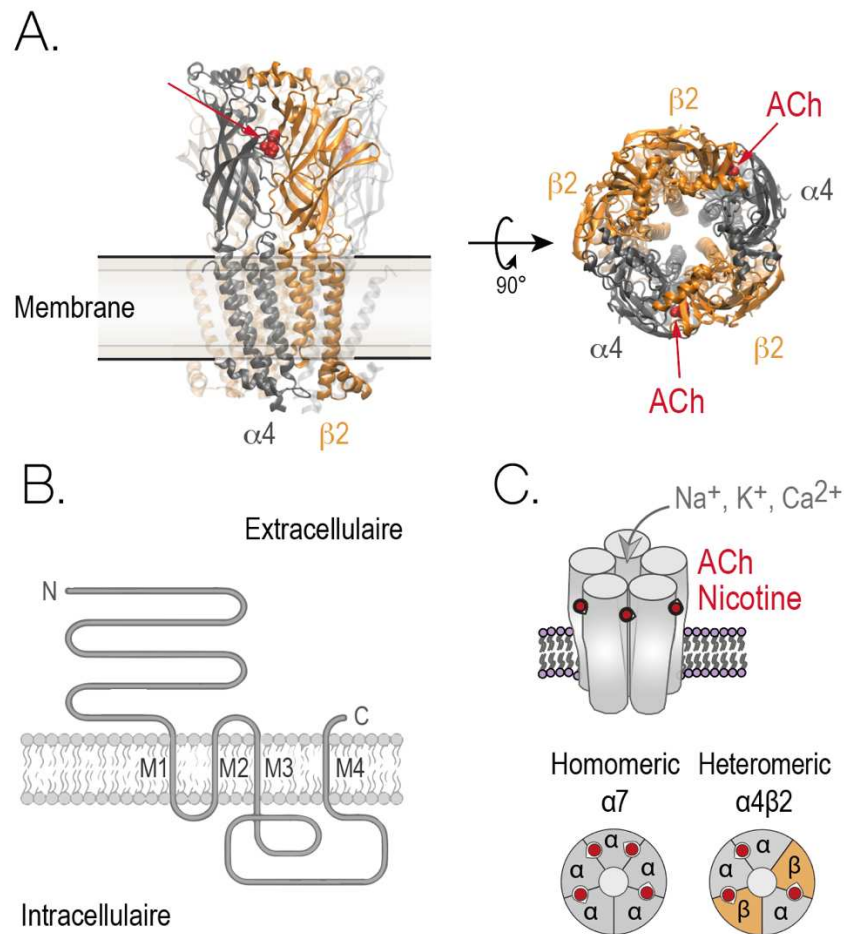


Figure 3.2. Structure et diversité des nAChR | **A.** Structure tridimensionnelle aux rayons X du récepteur nicotinique $\alpha 4 \beta 2$, en vue de profil (droite) et du dessus (gauche). Les sous-unités $\alpha 4$ sont représentées en gris et les sous-unités $\beta 2$ en orange. Le site de liaison de l'ACh est le même pour la nicotine. **B.** Représentation schématique d'une sous-unité nicotinique. Chaque sous-unité possède un large domaine extracellulaire, quatre domaines transmembranaires (M1-M4) et un domaine intracellulaire entre les domaines M3 et M4. **C.** Schéma d'un nAChR perméable aux cations, qui peut être constitué uniquement de sous-unités α (homopentamérique) ou de sous-unités α et β (hétéropentamérique). Adapté de Taly et al. 2009, Changeux 2010 & Durand-de-Cuttoli et al. 2017.

Les nAChR sont des récepteurs pentamériques, c'est-à-dire constitués de 5 sous-unités, organisés en rosette perpendiculaire à la membrane plasmique. Ils peuvent être i) homopentamériques, constitués uniquement de sous-unités α , ou ii) hétéropentamériques, constitués à la fois de sous-unités α et β (**Figure 3.2-C**). De ce fait, le site de liaison de l'ACh, et de la nicotine, se situe à la jonction entre les sous-unités soit α/α soit α/β . Dans le cas des récepteurs homopentamériques, constitués uniquement d' α_7 ou α_9 , ces sous-unités portent à la fois les composants « principaux » et « complémentaires » pour lier l'agoniste. Des exceptions subsistent avec les sous-unités α_5 et β_3 qui ne présentent ni partie principale ni partie complémentaire. Ces sous-unités accessoires ne participent donc pas directement à la liaison d'un agoniste mais peuvent modifier les propriétés du récepteur.

ii. Allostérie

Le nombre de sites de liaison de l'ACh ou de la nicotine varie en fonction de la composition en sous-unités d'un récepteur et permet à l'agoniste de stabiliser ou non un état ouvert du canal selon un principe d'allostérie. Avant d'avoir été étendue à d'autres protéines, l'allostérie fait à l'origine référence au mode de régulation de l'activité d'une enzyme par des molécules effectrices (Changeux & Edelstein, 1998; Changeux & Taly, 2008; Zoli et al., 2015). Une protéine ou un canal peut présenter ce que l'on appelle un site orthostérique, c'est-à-dire le site actif où un ligand agoniste peut modifier directement l'état de la protéine, comme l'ACh ou la nicotine sur les nAChR. Toutefois, on compte également la présence de sites allostériques, c'est-à-dire de sites de liaison non compétitifs où des molécules peuvent moduler positivement ou négativement l'état du récepteur. Ces modulateurs ont un effet seulement si le récepteur a déjà lié son agoniste au niveau du site orthostérique.

Il existe donc plusieurs conformations de nAChR, sous l'influence de la fixation de molécules effectrices qui se fixent sur des sites dits allostériques. Tout d'abord, en l'absence d'agoniste, le récepteur est dans un état de repos où le canal est fermé et non conducteur. Ensuite, la liaison d'un ligand agoniste endogène (ACh) ou exogène (nicotine) va permettre de stabiliser la conformation protéique du récepteur dans un état ouvert. En effet, c'est la liaison de l'agoniste au niveau du site de liaison qui provoque l'ouverture du canal et ainsi le passage des ions selon un gradient électrochimique (état activé). La présence prolongée d'agonistes va donc activer le récepteur (cinétique rapide) puis entraîner par la suite ce que l'on appelle une désensibilisation du récepteur (cinétique lente ; Katz & Thesleff, 1957; Quick & Lester, 2002). Dans ce troisième état, l'agoniste reste lié au récepteur mais le canal ionique est fermé et le récepteur inactif (état désensibilisé). Selon le modèle allostérique de Monod-Wyman-Changeux décrit en 1965 (Monod et al., 1965), le récepteur nicotinique va

donc exister sous 3 états conformationnels : i) un état actif où le canal ionique est ouvert, ii) un état de repos ou inactif, où le canal est fermé, et iii) un état désensibilisé, où l'agoniste est présent mais le canal est lui fermé (Changeux, 2012 ; **Figure 3.3-A**). Aussi, en l'absence de ligand l'état de repos est majoritaire, alors qu'en présence d'agonistes l'état ouvert et la transition vers l'état désensibilisé sont prédominants, bien que les transitions entre états soient possibles.

Dans le cadre d'une transmission synaptique endogène, environ 1 mM d'ACh est relâché dans la fente synaptique ce qui entraîne l'activation synchronisée des nAChR en l'espace d'une milliseconde puis l'élimination rapide du neurotransmetteur par l'acétylcholinestérase (Dani et al., 2001). Cette libération transitoire et rapide d'ACh permet de limiter la désensibilisation. Toutefois, la nicotine – ligand exogène des nAChR dont la demi-vie est de longue durée (environ 2 heures chez l'humain et 6-7 minutes chez la souris) – n'est pas éliminée par l'acétylcholinestérase et va en conséquence excéder la signalisation cholinergique physiologique, aboutissant à une importante désensibilisation des récepteurs. Aussi, une consommation importante de nicotine va participer à maintenir les nAChR dans un état désensibilisé et va venir perturber la transmission cholinergique endogène.

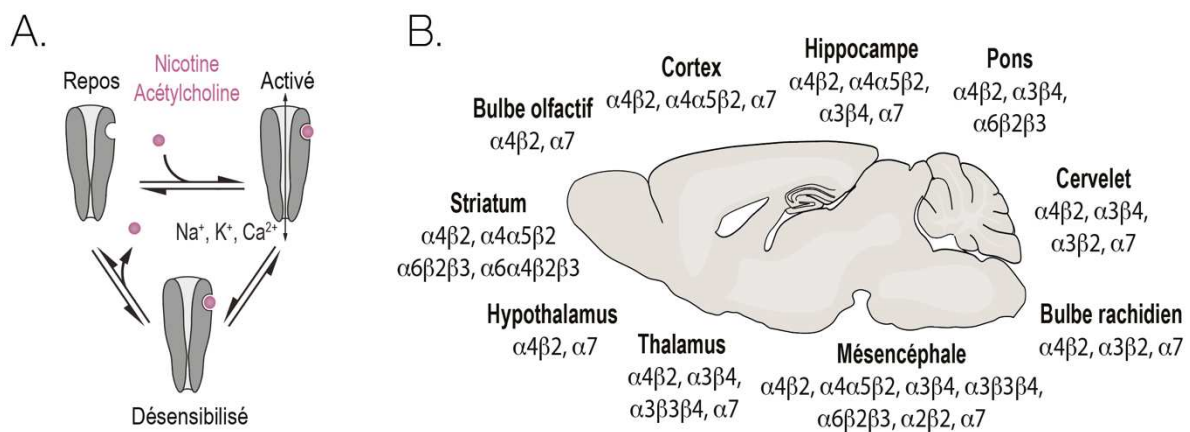


Figure 3.3. Allostérie et localisation des nAChR | **A.** Représentation des trois états conformationnels du nAChR : au repos, activé et désensibilisé. **B.** Localisation et répartition des sous-unités nicotiques en fonction des régions du cerveau. *Adapté de Durand-de-Cuttoli et al. 2017.*

iii. Localisation des récepteurs nicotiniques au sein du système nerveux central

Afin de détecter la présence des nAChR au sein du système nerveux central, différentes méthodes de localisation reposent sur l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre des sous-unités particulières. Les techniques d'immunohistologie, d'immunoblot ainsi que de liaison de ligand (*ligand binding assay*) ont permis de définir où étaient situés les récepteurs cholinergiques (Moser et al., 2007). Il a été montré que les nAChR sont présents à la fois au niveau du soma, des terminaisons présynaptiques mais également sur les boutons postsynaptiques. Cette large répartition des récepteurs leur confère de nombreuses fonctions à des niveaux de signalisations post- mais aussi pré-synaptiques (Dani et al., 2001; Laviolette & Van Der Kooy, 2004).

Une particularité des nAChR est qu'ils peuvent être activés à des potentiels négatifs et ainsi permettre l'entrée de cations dans le neurone pour augmenter son excitabilité. Les courants calciques engendrés par l'ouverture des nAChR sont donc différents de ceux médiés par les canaux voltage-dépendants. Ces flux calciques dépendent de la localisation des récepteurs sur les compartiments du neurone, et jouent un rôle important dans les processus de plasticité synaptique (Dani et al., 2001). Les récepteurs situés au niveau présynaptique, comme par exemple les récepteurs $\alpha 7$ dans la VTA sur les axones en provenance du LDTg, vont participer à réguler la libération de glutamate. Une augmentation de libération de glutamate va activer des récepteurs NMDA postsynaptiques, engendrant une potentialisation à long-terme des synapses glutamatergiques au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA (Dani et al., 2001).

Au sein du système nerveux central, les expressions des sous-unités varient en fonction des régions d'intérêt (**Figure 3.3-B**). Toutefois, l'expression des sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 6$ et $\alpha 5$ va de pair avec celle de la sous-unité $\beta 2$ alors que les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ sont souvent coexprimées avec $\beta 4$. Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ sont majoritaires dans de nombreuses régions dont en particulier la voie mésolimbique tandis que les récepteurs $\alpha 3\beta 4$ sont retrouvés en plus forte proportion au niveau du système nerveux périphérique ou plus spécifiquement au niveau de la voie habénulo-interpédonculaire (Zoli et al., 2015).

iv. Rôles fonctionnels de la neuromodulation nicotinique

En fonction du type de nAChR, les cinétiques d'activation et de désensibilisation varient. Si l'on compare les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$, deux sous-types nicotiniques très représentés au

sein de la voie mésolimbique, on constate qu'ils se distinguent par plusieurs différences biophysiques et pharmacologiques.

Les récepteurs homopentamériques $\alpha 7$ présentent une forte perméabilité au calcium, une faible affinité pour la nicotine et une cinétique de désensibilisation plus rapide par rapport aux autres types de récepteurs (Corradi & Bouzat, 2016). Concernant les hétéropentamères, les sous-unités $\alpha 4$ ont une plus forte affinité pour la nicotine que les récepteurs $\alpha 3$, une quantité d'agoniste plus faible sera donc capable de les activer. En effet, les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\beta 4$ présentent une affinité plus forte ($EC_{50} \sim 10 \mu M$) comparé aux récepteurs $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 3\beta 4$ ($EC_{50} \sim 60$ et $120 \mu M$ respectivement). Bien que leur sensibilité à l'ACh et à la nicotine soit plus élevée, les hétéropentamères présentent une cinétique de désensibilisation plus lente en comparaison aux récepteurs $\alpha 7$.

Parmi les hétéropentamères, la nicotine induit une importante désensibilisation des récepteurs nicotiniques neuronaux $\alpha 4\beta 2$ (Paradiso & Steinbach, 2003). C'est généralement la sous unité α , essentielle à la formation du site agoniste, qui détermine la sensibilité du récepteur. La sous-unité β , quant à elle, ajuste les propriétés de désensibilisation du récepteur (C. P. Fenster et al., 1997). En effet, pour de faibles concentrations de nicotine, les nAChR contenant la sous-unité $\beta 2$ atteignent une désensibilisation quasi-maximale plus vite que les récepteurs contenant $\beta 4$. La sous-unité α influence également la « récupération » post-désensibilisation du récepteur (Fenster 1997). Dans le cas d'une exposition prolongée à la nicotine, les nAChR $\alpha 4\beta 2$ peuvent rester dans un état désensibilisé pouvant durer de plusieurs minutes à plusieurs heures (Gentry et al., 2003). Même de faibles doses de nicotine sont capables d'induire une désensibilisation des nAChR qui s'accroît à mesure que l'exposition à la nicotine augmente (Pidoplichko et al., 1997).

Ainsi, la composition en sous-unités des nAChR a une grande importance dans les cinétiques d'activation, de réponse et de sensibilité aux agonistes, et joue un rôle prépondérant dans les réponses cellulaires et comportementales notamment à la nicotine dans un contexte d'addiction.

II. Neurophysiologie du renforcement à la nicotine

L'accroissement mondial des maladies liées au tabac est un problème majeur de santé publique. En effet, la cigarette apparait dans les trois principaux facteurs de risque dans l'apparition de cancers (Tran et al., 2022). La nicotine, principale substance addictive de la cigarette, est issue de la plante du tabac et utilisée comme psychotrope via notamment l'inhalation de la fumée de tabac. Comprendre les mécanismes cellulaires et la séquence

des événements neuronaux qui conduisent à la dépendance est nécessaire pour développer, d'une part, des produits novateurs pouvant aider au sevrage et, d'autre part, définir des politiques de prévention efficaces. Grâce à ces approches, il a pu être montré que la mise en place de la dépendance est expliquée par l'action initiale des drogues sur les neurones dopaminergiques du système de la récompense. La nicotine, tout comme les drogues d'abus, détourne ce système qui est impliqué dans les processus de motivation, de prise de décision et d'apprentissage par renforcement.

a. Action aiguë de la nicotine sur la VTA

La nicotine se lie donc aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) présents en grande quantité dans la VTA, avec une expression variée de sous-unités (Azam et al., 2002; Champtiaux et al., 2003; Klink et al., 2001). La nicotine possède ainsi plusieurs cibles d'action dans la VTA, et les conséquences de sa liaison aux nAChR vont dépendre de leur localisation et de leur composition.

Dans un premier temps, il a été montré que ce sont les neurones dopaminergiques de la VTA qui soutiennent les effets renforçants de la nicotine (Balfour et al., 1998; Watkins et al., 2000). En effet, on retrouve des nAChR au niveau somatique des neurones dopaminergiques mais également en post-synaptique au niveau de leurs terminaisons axonales dans le NAc. La nicotine peut donc avoir une action directement au niveau du soma des neurones dopaminergiques, en se liant notamment aux récepteurs $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$ ou $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ (avec parfois la présence de la sous-unité $\alpha 5$ dans certains sous-types; Changeux, 2010). Des expériences en patch-clamp avec application (puff) d'ACh ou de nicotine couplée à de la *single-cell* RT PCR, ont notamment permis de déterminer les sous-unités nicotiniques associées à un courant donné (Klink et al., 2001). Il a été montré sur des neurones en tranches que la présence de nicotine dans le bain provoque un plus grand nombre de PA à la suite d'un puff d'ACh en comparaison à un même puff sans la présence de nicotine dans le bain (Pidoplichko et al., 1997). Ces expériences suggèrent une augmentation de l'excitabilité des neurones en présence de nicotine. Des expériences *in vivo* ont confirmé ces résultats avec une augmentation de l'activité en bouffées des neurones dopaminergiques à la suite d'une injection intraveineuse de nicotine (Exley et al., 2011; Mameli-Engvall et al., 2006; Marti et al., 2011; Tolu et al., 2013). Cette activation persiste une dizaine de minutes, ce qui est compatible avec la demi-vie de la nicotine qui est d'environ 6-7 minutes chez le rongeur (Petersen & Norris, 1984). Cette transition brusque d'une activité tonique vers une activité phasique synchrone, s'accompagne d'une importante libération phasique de DA au niveau du NAc (Di Chiara & Imperato, 1988;

Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013). De plus, une action combinée de la nicotine sur les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ situés au niveau axonal entraîne une augmentation de l'excitabilité des terminaisons dopaminergiques et donc favorise la probabilité de libération de DA par les vésicules (Cachope et al., 2012; Exley et al., 2011).

Toutefois, les nAChR ne sont pas retrouvés uniquement sur les neurones dopaminergiques. En effet, les neurones GABAergiques de la VTA en présentent également une forte proportion, avec une expression préférentielle des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ au niveau somatique. Il a été montré *ex vivo* l'augmentation des courants post-synaptiques inhibiteurs sur les neurones dopaminergiques, illustrant bien l'activation directe des neurones GABAergiques par la nicotine (Mansvelder et al., 2002). La nicotine a donc pour conséquence d'augmenter la transmission GABAergique au sein de la VTA. Cet effet inhibiteur de la nicotine et sa capacité à rapidement désensibiliser les nAChR a longtemps entretenu l'idée que l'activation des neurones dopaminergiques résulterait d'une désinhibition. Il a été proposé que les nAChR présents sur les interneurones GABAergiques désensibiliseraient plus vite que ceux des neurones dopaminergiques, entraînant ainsi une diminution du tonus GABAergique et une activation des neurones dopaminergiques. Cette hypothèse de désinhibition a cependant été remise en cause car il a été montré *in vivo* que l'expression des nAChR de type $\beta 2$ dans les neurones dopaminergiques était nécessaire et suffisante pour l'activation de ces neurones en réponse à une injection de nicotine. La même étude démontre également qu'une injection de nicotine active les neurones GABAergiques de la VTA qui inhibent en retour les neurones dopaminergiques (Tolu et al., 2013). Il est désormais admis que l'activation des neurones dopaminergiques résulte principalement de la liaison de la nicotine sur des nAChR somatiques de ces derniers.

Enfin, la nicotine agit sur les terminaisons glutamatergiques présentes au sein de la VTA. En effet, on retrouve l'expression de récepteurs $\alpha 7$ en présynaptique notamment sur les axones en provenance du PPTg et du PFC (Changeux, 2010). L'activation des nAChR induit une augmentation des entrées glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Mansvelder & McGehee, 2000). Les récepteurs $\alpha 7$ sont nécessaires pour induire une plasticité à court mais également à long-terme et pourraient expliquer l'activation prolongée des régions du circuit de la récompense malgré une exposition aiguë à la nicotine (M. Gao et al., 2010). Par ailleurs, en présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs $\alpha 7$ (méthyllycaconitine, MLA), les neurones dopaminergiques augmentent leur fréquence de décharge mais pas leur décharge en bouffées à la suite d'une injection intraveineuse de nicotine (Schilström et al., 2003). Au contraire, le blocage des récepteurs non- $\alpha 7$ (DH β E) induit une augmentation de la décharge en bouffées mais pas de la fréquence de décharge

après injection de nicotine. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle des récepteurs de type $\alpha 4\beta 2$ dans l'augmentation de la fréquence de décharge, avec une stimulation présynaptique des récepteurs $\alpha 7$ sur les terminaisons glutamatergiques qui jouerait dans le contrôle de l'activité en bouffées. Cependant, d'autres expériences *in vivo* challengent cette hypothèse. En effet, des expériences chez des souris délétées de la sous-unité $\alpha 7$ montrent la présence de décharges en bouffées (Mameli-Engvall et al., 2006) ainsi qu'un maintien de la préférence conditionnée pour la nicotine (Walters et al., 2006).

b. Implication de la sous-unité $\beta 2$ dans le renforcement à la nicotine

Les effets renforçants de la nicotine ont pu être démontrés par des expériences d'auto-administration volontaire de la drogue. Comme dans le cas des expériences d'Olds et Milner (voir *Chapitre 1, partie II.a.*), où les rats s'administraient des stimulations électriques au niveau du MFB, la nicotine va cibler la voie mésolimbique aboutissant à un fort relargage de DA notamment au niveau du NAc. Ces expériences d'auto-administration de nicotine peuvent être : i) systémiques, par injection intraveineuse ou dans l'eau de boisson, ou ii) locales, avec l'infusion de la drogue directement au niveau de la VTA (Changeux, 2010). Les expériences d'infusion locale au niveau de la VTA ont permis de bien identifier cette structure comme essentielle au renforcement à la nicotine (Maskos et al., 2005).

Plus de 80% des neurones dopaminergiques de la VTA expriment les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ainsi que $\beta 2$, $\beta 3$, et 50% d'entre eux expriment les ARN messagers des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 7$ (Azam et al., 2002, 2007; Champtiaux et al., 2003; Klink et al., 2001). L'utilisation de souris que l'on appelle *knock-out* (KO), c'est-à-dire délétées pour un gène d'intérêt rendu inopérant, a permis d'approfondir notre compréhension du renforcement à la nicotine ainsi que le rôle des sous-unités nicotiques et des différents types cellulaires les exprimant. Ces souris KO permettent d'étudier le rôle d'une sous-unité spécifique de nAChR en observant les conséquences d'une délétion totale sur le comportement, par exemple d'auto-administration à la nicotine. Il est également possible de réexprimer spécifiquement dans une région d'intérêt (comme la VTA) la sous-unité délétée, via des vecteurs viraux, afin d'en disséquer le rôle. Ces techniques ont permis de confirmer la spécificité d'action de la nicotine sur les nAChR ainsi que leur rôle dans l'activation des neurones dopaminergiques à la drogue, à l'origine du renforcement addictif.

Nous l'avons vu, la délétion de la sous-unité $\alpha 7$ n'impacte pas les propriétés renforçantes de la nicotine (Walters et al., 2006). Toutefois, la sous-unité $\beta 2$ apparaît quant à elle essentielle dans ce renforcement, puisque : i) les souris KO pour cette sous-unité ne

présentent plus de renforcement à la nicotine et ii) sa réexpression spécifiquement au niveau de la VTA d'un animal KO permet de restaurer l'auto-administration à la nicotine (**Figure 3.4-A** ; Maskos et al., 2005). Sur ces mêmes souris KO, on observe également une absence de réponse des neurones dopaminergiques à la nicotine ainsi qu'une absence de libération de DA au niveau du NAc. Une réexpression de la sous-unité $\beta 2$ uniquement dans les neurones dopaminergiques de la VTA restaure l'augmentation de fréquence des PA induite par la nicotine, comme observée chez l'animal sauvage (**Figure 3.4-B**). Toutefois, cela ne restaure ni le patron de décharge en bouffées de cette réponse ni la libération de DA au niveau du NAc (Tolu et al., 2013). Au contraire, la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ dans les neurones GABAergiques induit une inhibition des neurones dopaminergiques en réponse à la nicotine, associée à un évitement de la nicotine (Tolu et al., 2013). Enfin, la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ à la fois sur les neurones GABAergiques et dopaminergiques de la VTA, permet de restaurer la réponse en bouffées des neurones dopaminergiques (**Figure 3.4-B**), la libération de DA dans le NAc et le renforcement positif induit par la nicotine (Morozova et al., 2020; Tolu et al., 2013). Ces expériences de délétion/réexpression ainsi que la modélisation du microcircuit de la VTA, ont permis de disséquer les mécanismes sous-tendant la réponse des neurones de la VTA à l'ACh et à la nicotine, ainsi que de mieux comprendre la balance excitation/inhibition qui les régit. Lorsque la sous-unité $\beta 2$ est réexprimée uniquement dans les neurones GABAergiques, l'ACh et la nicotine ont des effets opposés sur l'activité des neurones dopaminergiques. La décharge est augmentée en fréquence et en bouffées en conditions basales alors que l'injection de nicotine a pour conséquence une diminution de l'activité en bouffées (Morozova et al., 2020; Tolu et al., 2013). Le modèle énoncé repose alors sur la différence de temporalité entre l'agoniste endogène et l'exogène. Les entrées cholinergiques sont dites « pulsatiles » (cinétique d'action courte) alors que la nicotine a une action continue sur du plus long terme (cinétique d'action longue ; Morozova et al., 2020). Une inhibition pulsatile des neurones dopaminergiques pourrait ainsi augmenter leur probabilité de décharge en bouffées par une synchronisation de l'activité des neurones GABAergiques (Morozova et al., 2016). L'ACh et la nicotine agissent donc sur les mêmes récepteurs nicotiniques contenant la sous-unité $\beta 2$, mais leur temporalité d'action différente permet d'expliquer les différences observées dans les expériences de réexpression.

Les résultats obtenus sur ces souris KO montrent bien l'effet direct de la nicotine sur des nAChR somatiques des neurones dopaminergiques ainsi que l'importance de la sous-unité $\beta 2$ dans un contexte de prise de nicotine. Par ailleurs, une étude récente de l'équipe utilisant des techniques d'optopharmacologie a montré que le tonus cholinergique joue un rôle prépondérant sur la décharge en fréquence et en bouffées des neurones dopaminergiques,

via les récepteurs contenant la sous-unité $\beta 2$ (Durand-de-Cuttoli et al., 2018). Une photo-antagonisation locale dans la VTA de ces récepteurs est suffisante pour activer et désactiver de manière réversible une préférence de place conditionnée pour la nicotine (Durand-de-Cuttoli et al., 2018). La sous-unité $\beta 2$ apparaît donc nécessaire aux mécanismes d'action de la nicotine, qui seront discutés à la suite de mes travaux de thèse.

De plus, les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ peuvent être coexprimées avec la sous-unité $\beta 2$. Une délétion de la sous-unité $\alpha 4$ impacte l'activité en bursts et les comportements d'auto-administration intracrâniale à la nicotine, restaurés après réexpression de la sous-unité dans la VTA (Exley et al., 2011). La coexpression des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 6$ joue quant à elle un rôle au niveau terminal sur le relargage de DA au niveau du NAc (Exley et al., 2011). Les récepteurs contenant la sous-unité $\alpha 5$ sont impliqués dans la sensibilité des réponses à la nicotine et apparaissent comme des modulateurs déterminant la dose minimale nécessaire pour l'activation des neurones dopaminergiques et donc importants dans le renforcement à la nicotine (Morel et al., 2014).

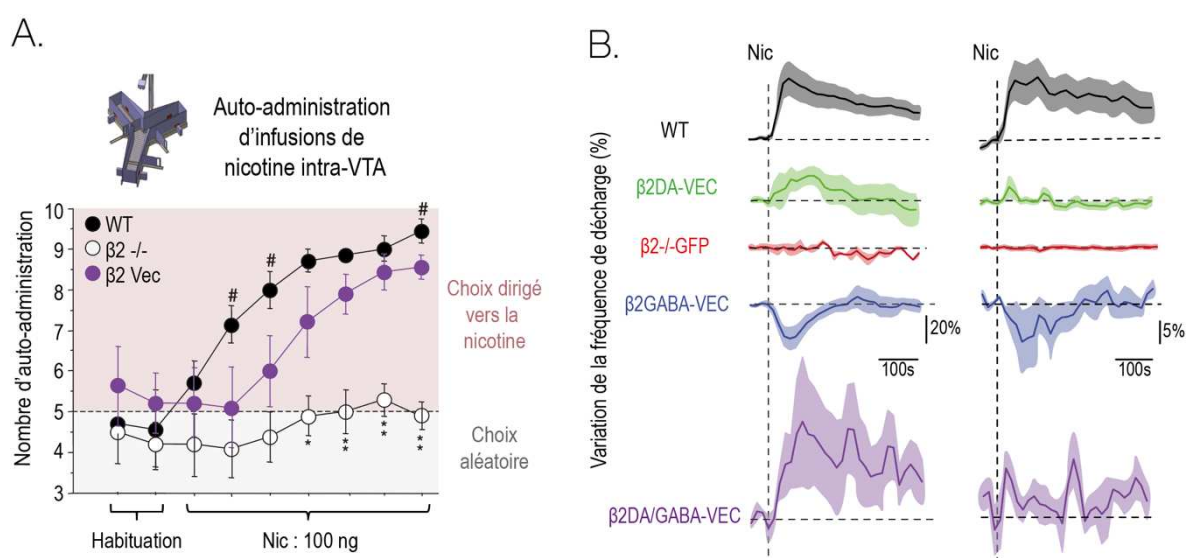


Figure 3.4. Implication de la sous-unité $\beta 2$ au sein de la VTA : dans le renforcement et les réponses *in vivo* à la nicotine | A. Auto-administration intra-VTA de nicotine chez des souris i) au phénotype sauvage (WT), ii) délétées pour la sous-unité $\beta 2$ ($\beta 2^{-/-}$), ou iii) avec réexpression de la sous-unité spécifiquement dans la VTA ($\beta 2^{Vec}$). Les souris ont accès à un labyrinthe en Y avec un bras où elles reçoivent de la nicotine intra-VTA et un bras où elles ne reçoivent aucune injection. *Adapté de Maskos et al. 2005.* B. Enregistrements juxtacellulaires *in vivo* sur souris anesthésiées avant et après injection intraveineuse de nicotine. Réponses moyennes en fréquence (gauche) et en bursts (droite) chez des souris i) WT, ii) $\beta 2^{-/-}$ avec réexpression uniquement dans les neurones dopaminergiques de la VTA, iii) $\beta 2^{-/-}$ avec réexpression d'un rapporteur GFP dans la VTA (contrôle, équivalent à des souris $\beta 2^{-/-}$), iv) $\beta 2^{-/-}$ avec réexpression uniquement dans les neurones GABAergiques de la VTA, et v) $\beta 2^{-/-}$ avec réexpression dans les neurones dopaminergiques et GABAergiques de la VTA. *Adapté de Tolu et al. 2013.*

c. Effets d'une exposition chronique à la nicotine et conséquences

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur la réponse des neurones dopaminergiques à une action aiguë de la nicotine. De ce fait, je vais aborder brièvement les effets d'une exposition chronique à la nicotine et comment une libération phasique de DA au niveau du NAc peut mener à une dépendance à la drogue puis à l'addiction. L'exposition aiguë induit une série de mécanismes passant par l'activation puis la désensibilisation des nAChR et touche tous les types cellulaires présents au sein de la VTA. Ces mécanismes, s'ils sont maintenus de manière chronique, engendrent des modifications à long terme. En effet, dans un comportement d'auto-administration, la prise répétée de nicotine constitue une exposition chronique pouvant intervenir dans l'établissement du renforcement et, si elle se prolonge, engendrer une addiction (Caggiula et al., 2001; Garcia-Rivas et al., 2017; Garcia-Rivas & Deroche-Gamonet, 2019). L'accumulation des doses obtenues va entraîner des modifications du comportement, de l'activité des neurones dopaminergiques et de la plasticité synaptique au sein du circuit de la récompense, conduisant à des comportements de consommation de la drogue aberrants et compulsifs.

Une augmentation de l'activité tonique et en bursts des neurones dopaminergiques est observée dans la VTA dans le cadre d'une auto-administration volontaire de nicotine mais pas dans le cas d'une exposition passive, où des animaux reçoivent des injections de nicotine sans lien avec un stimulus ou une action, ou via des mini-pompes osmotiques (Caillé et al., 2009; Besson et al., 2007). Ceci suggère que les modifications d'activité des neurones dopaminergiques résultent de potentialisations synaptiques d'entrées sensorielles ou corticales mises en jeu de manière répétée au moment de chaque prise de nicotine. Nous l'avons vu, une exposition aiguë (non volontaire) est déjà capable d'induire une plasticité à long terme des synapses excitatrices persistant jusqu'à 72h après l'injection (Gao et al., 2010). Toutefois, cette augmentation de la transmission glutamatergique persiste jusqu'à 8 jours après l'arrêt de 7 jours d'injections répétées de nicotine (Gao et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc qu'une action aiguë de la nicotine suffit pour initier une plasticité synaptique glutamatergique sur les neurones dopaminergiques mais que des expositions répétées à la nicotine, même de façon non volontaire, produisent un effet plus persistant. Ces mêmes effets d'augmentation d'activité des neurones dopaminergiques et de leur signalisation glutamatergique, ont d'ailleurs été observés dans différents travaux de notre laboratoire hors contexte de conditionnement opérant, dans des paradigmes où la nicotine était délivrée par mini-pompes osmotiques (Tolu et al., 2017) ou dans l'eau de boisson (Morel et al., 2019).

La nicotine peut donc engendrer des modifications durables par sa simple liaison aux nAChR. Comme mentionné précédemment (voir sous-partie I.b.iv), les nAChR désensibilisent d'autant plus que l'exposition à la nicotine est répétée et prolongée. Une exposition chronique à la nicotine va stabiliser les nAChR dans un état désensibilisé. Si cette exposition se prolonge, des mécanismes dits *d'up-regulation* vont se mettre en place. Il va alors y avoir une augmentation de la quantité de nAChR exprimés à la surface des neurones, dans le but de compenser la désensibilisation des récepteurs et donc de revenir à une signalisation cholinergique endogène « normale ». Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ sont les plus sensibles aux phénomènes *d'up-régulation* (Corringer et al., 2006; Fenster et al., 1999). La nicotine agit sur la maturation précoce des récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique, en favorisant la maturation d'un précurseur oligomérique qui serait, en temps normal, dégradé (Corringer et al., 2006). Également, la nicotine est capable de traverser les membranes plasmiques lorsqu'elle est non chargée et ainsi d'agir comme molécule chaperonne sur les nAChR de haute affinité, diminuant leur taux de *turnover* et les laissant exprimés à la membrane (Corringer et al., 2006; Govind et al., 2009). En effet, il a été révélé une quantité plus importante de nAChR dans le cerveau de fumeurs (Benwell et al., 1988), additionné au fait que le tabagisme sature les récepteurs nicotiniques $\alpha 4\beta 2$ (Brody et al., 2006). Il semblerait qu'une grande disponibilité des nAChR contenant la sous-unité $\beta 2$ persiste jusqu'à un mois d'abstinence et se normalise à des taux similaires à des personnes non-fumeuses seulement après 6 voire 12 semaines (Cosgrove et al., 2009). Cette persistance des effets de la nicotine, même après son arrêt complet, contribue aux effets de manque liés au sevrage. En effet, pendant une période d'abstinence, les nAChR ne sont plus dans un état désensibilisé mais les conséquences de *l'up-regulation* sont toujours présentes. Cette surexpression des nAChR à la membrane des neurones provoque une « hypercholinergie », c'est-à-dire une suractivation de la transmission cholinergique nicotinique. Une exposition chronique induit donc une réorganisation des nAChR au sein de la VTA et modifie leurs propriétés. En effet, chez des souris $\beta 2^{KO}$ exposées de façon chronique à la nicotine, il a été montré que les récepteurs $\alpha 7$ participent à retrouver une activité dopaminergique proche des conditions physiologiques. Dans le cas d'une exposition prolongée à la nicotine, la désensibilisation des récepteurs contenant la sous-unité $\beta 2$ pourrait alors être compensée par les récepteurs $\alpha 7$ (Besson et al., 2007). Cela s'expliquerait par une potentialisation de la signalisation cholinergique ou glutamatergique en provenance des terminaisons du PPTg et du LDTg où les récepteurs $\alpha 7$ sont fortement exprimés (Besson et al., 2007). De la même manière, une exposition chronique à la nicotine augmente l'activité basale des neurones dopaminergiques mais diminue de manière notable leur réponse à une injection aiguë de nicotine (Morel et al., 2019).

Les mécanismes de désensibilisation et d'*up-régulation* sont donc clefs dans la régulation de la consommation de nicotine. La tolérance aux effets appétitifs aigus de la nicotine pourrait ainsi être médiée par la désensibilisation des récepteurs à l'origine des propriétés renforçantes de la drogue ; l'état désensibilisé du nAChR entraînant une baisse de l'augmentation de l'activité dopaminergique induite par une nouvelle prise de nicotine. Cela pourrait expliquer pourquoi la première cigarette de la journée (ou une cigarette ponctuelle) engendre une sensation plaisante qui va diminuer à mesure que les prises sont rapprochées. Une exposition prolongée à la nicotine va toutefois engendrer des mécanismes aboutissant à une augmentation de l'expression de récepteurs à haute affinité dans la VTA, avec un important taux de désensibilisation. Cela placerait ainsi l'individu dans un état où la prise d'une seule cigarette ne suffirait plus à induire une libération de DA suffisante pour ressentir l'effet recherché. Ces mécanismes vont donc mener à une consommation plus importante de la drogue, pouvant aboutir à une consommation compulsive définissant l'addiction.

III. Balance des effets positifs et négatifs dans la prise de drogue

La nicotine est considérée comme particulièrement addictive car plus de 30% des fumeurs réguliers développent une addiction, caractérisée par une consommation compulsive en dépit des conséquences néfastes à court et long terme. Chez les fumeurs, l'usage occasionnel est minoritaire en comparaison à l'usage journalier, suggérant que l'usage purement récréatif laisse vite place à un usage habituel ou à un arrêt définitif (Henrikus et al., 1996). Cela suppose l'installation d'une dépendance sévère une fois la consommation habituelle initiée.

La première expérience semble déterminante dans la trajectoire d'un fumeur vers la dépendance. En effet, la première expérience du tabac est associée à un nombre plus important d'effets négatifs que positifs chez la majorité des fumeurs. Un ressenti globalement positif chez un individu est corrélé à une consommation qui devient régulière, tandis qu'une expérience ressentie globalement comme négative s'accompagne majoritairement d'un arrêt de la consommation dès les premières expériences ou d'un sevrage plus rapide (Buchmann et al., 2013; Delorme et al., 2003). Une des causes de ces observations pourrait être que la balance entre les effets positifs et négatifs ressentis lors des premières expériences, influence le renforcement positif induit par une prise aiguë de nicotine.

Ainsi, certaines personnes ne vont pas avoir une expérience plaisante au moment de leur première cigarette. Cet événement sera plutôt jugé désagréable dès la première prise et pourrait empêcher une dépendance de s'installer. Au contraire, si la première consommation

de nicotine apparaît très plaisante, cela poussera certainement l'individu à en reconsommer pour obtenir à nouveau cette récompense sans effort. C'est après ce type d'expérience que la prise va devenir chronique, entraînant tous les phénomènes adaptatifs vu précédemment (voir II-c.). Aussi, le ressenti vécu lors de la première consommation de nicotine pourrait jouer un rôle dans le développement d'une susceptibilité à la dépendance. Les effets négatifs induits par la drogue sont de deux types : i) liés à la prise aiguë, dès le premier ressenti, ou ii) liés aux effets de manque, lors d'une période d'abstinence même courte comme la nuit. En effet, dans le développement de l'addiction, les effets liés à une prise aiguë laissent vite place aux effets engendrés par le renforcement négatif. Dans la mise en place de la dépendance, l'individu n'aime pas de plus en plus la nicotine, il va être de plus en plus motivé à l'obtenir pour masquer les effets désagréables du sevrage, menant à la compulsion. A l'inverse d'une vision purement hédonique du système de récompense, la théorie des « processus opposants » (encore appelée « allostasie hédonique ») repose sur l'idée que l'activation des neurones dopaminergiques qui entraîne des sensations de « plaisir » est associée à des processus de neuro-adaptations qui viendraient contrer cette stimulation. Le système est ainsi régulé à la baisse et va finir par atteindre un nouvel état d'équilibre, plus bas qu'à l'origine, qui serait responsable du mal-être et de l'état émotionnel négatif engendré par un sevrage (Naassila, 2018).

J'aborderai ici le rôle des neurones dopaminergiques dans la signalisation de la saillance notamment au moment d'évènements alarmants ou menaçants, des effets aversifs liés à la consommation prolongée de nicotine et/ou au manque ainsi que d'autres effets émotionnels engendrés par la nicotine comme l'anxiété.

a. Rôle de la dopamine dans la signalisation de signaux aversifs

Comme nous l'avons vu, la nicotine agit sur les neurones dopaminergiques, et la DA issue de la voie mésolimbique joue un rôle clef dans les comportements comme le conditionnement, le renforcement, la motivation, la prise de décision ou encore l'attention (voir *Chapitre 1, partie II.b*). Les neurones dopaminergiques encodent des stimuli appétitifs mais également d'autres types de signaux saillants comme des évènements aversifs ou alarmants (Bromberg-Martin et al., 2010; Mirenowicz & Schultz, 1996; Schultz, 2006). On sait par exemple qu'une activation globale par optogénétique des neurones dopaminergiques de la VTA suffit à induire une préférence de place conditionnée (Tsai et al., 2009) ou un renforcement dans un paradigme d'auto-administration (Pascoli et al., 2015), tandis qu'une inhibition des mêmes neurones induit un évitement du compartiment stimulé (Tan et al., 2012). Toutefois, nous avons souligné la présence d'une diversité de neurones dopaminergiques au sein de la VTA (voir *Chapitre 2, partie I.a*), au niveau

moléculaire mais également en termes de connectivité. Cette diversité apparaît également jouer un rôle au niveau comportemental, et une activation ou inhibition massive des neurones dopaminergiques ne reproduit pas les effets d'une prise de drogue.

Il a été proposé qu'une population de neurones dopaminergiques encode la valeur motivationnelle d'une action, activée par des événements appétitifs et au contraire inhibée par des événements aversifs. Cette première population de neurones serait impliquée dans les comportements dirigés vers un but, l'évaluation d'un résultat ou l'apprentissage d'une valeur. Une seconde population de neurones encoderait la saillance motivationnelle d'une action, activée à la fois par des événements appétitifs et aversifs. Elle serait quant à elle impliquée dans le traitement cognitif et la motivation (*drive motivationnel*; Bromberg-Martin et al., 2010). Ainsi, en plus de leur capacité d'encodage de la valeur ou de la saillance, ces deux populations sont capables de transmettre des signaux d'alertes, déclenchés par des indices sensoriels jugés d'une importance potentielle.

Couramment, dans une recherche hédonique, nous visons à trouver des récompenses et leur attribuons une valeur positive, tandis que nous évitons les événements aversifs et leur attribuons une valeur négative. Ces événements, positifs ou négatifs, sont donc traités de la même manière c'est-à-dire en fonction de leur saillance, impliquant des processus attentionnels et un traitement cognitif adéquat. Chez le modèle rongeur, les événements aversifs sont matérialisés par la délivrance d'une bouffée d'air (*airpuff*) ou bien par un plancher électrifié délivrant de courtes décharges électriques (*footshock*). Il a été montré que les événements aversifs induisent différents patterns dopaminergiques : dans certains cas, on observe une augmentation de libération de DA et, dans d'autres, une diminution. Cela repose en réalité sur des populations distinctes de neurones dopaminergiques au sein de la VTA. En effet, plusieurs études ont montré qu'une population de neurones dopaminergiques pouvait s'activer en réponse à des stimuli aversifs alors qu'une autre s'inhibait (Brischoux et al., 2009; Eddine et al., 2015; Gao et al., 1990; Schultz & Romo, 1987). Ces activités opposées ont des conséquences au niveau comportemental. Par exemple, dans le cas d'un conditionnement de type pavlovien, on note une population dopaminergique inhibée par une bouffée d'air ou par des indices prédictifs de ces bouffées d'air (comme attendu par le modèle de RPE) alors qu'une autre population est activée par les deux types de stimulus prédictif (appétitif et aversif; Matsumoto & Hikosaka, 2009).

La présence de populations dopaminergiques distinctes, encodant des saillances d'événements appétitifs ou aversifs, a ainsi été démontrée en fonction notamment des voies de projection. Par exemple, les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc shell

médial sont activés par un évènement aversif et les indices le prédisant, alors que les neurones projetant au niveau du NAc shell latéral voient, eux, leur activité inhibée (de Jong et al., 2019). Au contraire, l'activation des neurones dopaminergiques en réponse à un indice prédictif de récompense était prédominant au niveau du NAc latéral en comparaison aux neurones projetant en partie médiale du NAc (de Jong et al., 2019). Cette même étude a suggéré un rôle des neurones glutamatergiques en provenance de l'hypothalamus latéral dans la saillance d'un évènement aversif, région dont nous avons mentionné l'importance de ses efférences sur la VTA (*voir Chapitre, sous partie II.a.*).

Par ailleurs, une connectivité différente a pu être isolée au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA, qui constitueraient des micro-réseaux parallèles impliqués plutôt dans les effets récompensants ou plutôt dans les effets aversifs en fonction du contexte. Le LDTg forme des synapses excitatrices préférentiellement sur les neurones dopaminergiques projetant au niveau du NAc latéral et l'activation optogénétique de cette voie entraîne une préférence de place conditionnée (Lammel et al., 2012). Au contraire, les neurones glutamatergiques de la LHb ciblent préférentiellement les neurones dopaminergiques projetant au niveau du PFC et les neurones GABAergique du RMTg. L'activation optogénétique de cette voie entraîne cette fois un évitement pour le compartiment stimulé (Lammel et al., 2012). Ces résultats sont en accord avec des expériences menées *ex vivo* qui ont montré que les neurones dopaminergiques projetant vers le PFC présentaient une plasticité synaptique accrue en réponse à un stimulus aversif (Lammel et al., 2011). On a donc bien différentes populations de neurones dopaminergiques avec des propriétés moléculaires distinctes, comme ici avec les voies VTA-NAc et VTA-PFC respectivement qui, en fonction de leur connectivité, codent pour des stimuli jugés appétits ou aversifs. En effet, Olds avait déjà montré en 1960 qu'en fonction des régions stimulées, cela provoquait des effets aversifs ou encore parfois pas d'effets du tout (neutre ; Olds et al., 1960), reflet d'une connectivité dopaminergique organisée en sous-réseaux.

Par ailleurs, une modification de l'activité dopaminergique a également été impliquée dans des états dits négatifs comme un stress chronique ou des phénotypes dépressifs. Chez des souris exposées à des protocoles de défaite sociale et présentant un phénotype de susceptibilité au stress chronique, on observe une augmentation de l'activité dopaminergique (Anstrom et al., 2009; Chaudhury et al., 2013; Morel et al., 2018; Razzoli et al., 2011). Cette hyperactivité serait une conséquence d'une hypercholinergie (Fernandez et al., 2018) ainsi que d'une hausse de la signalisation glutamatergique (Saal et al., 2003).

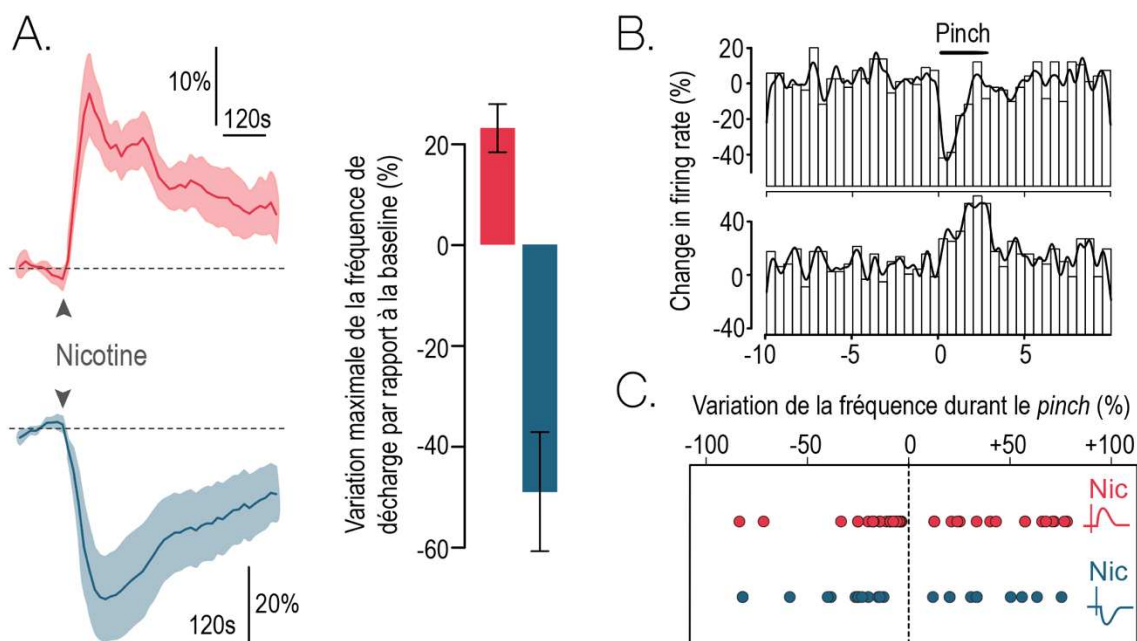


Figure 3.5. Réponses électrophysiologiques des neurones dopaminergiques en réponse à la nicotine et à des stimuli aversifs | A. Réponses moyennes de neurones dopaminergiques de la VTA à la suite d'une injection intraveineuse de nicotine par rapport à la baseline, d'après des enregistrements juxtacellulaire *in vivo* sur souris anesthésiées. Une population de neurones est activée (rouge) par la nicotine alors qu'une autre est inhibée (bleu). **B.** Histogramme de la moyenne d'activité sur une population de neurones dopaminergiques activés (haut) ou inhibés (bas) à la suite d'un *pinch* (pincement de la queue). **C.** Fréquence de variation de neurones dopaminergiques par rapport à la baseline durant le *pinch*, représentée par rapport à leur réponse à la nicotine. Les réponses des neurones activés (rouge) et inhibés (bleu) par la nicotine ne corréleront pas avec leurs réponses au *pinch*. Adapté de Eddine et al. 2015.

D'un point de vue des réponses aux drogues, il existe également une diversité de réponses des neurones dopaminergiques. Il a longtemps été admis que les drogues d'abus, dont la nicotine, avaient pour conséquence une augmentation de l'activité dopaminergique conduisant à une libération de DA dans le NAc à l'origine du renforcement. Toutefois, ce propos est à nuancer. En effet, il a été montré qu'une sous-population de la VTA est inhibée *in vivo* en réponse à une injection intraveineuse de nicotine (Eddine et al., 2015; **Figure 3.5- A**). Cette inhibition d'une partie des neurones dopaminergiques de la VTA est vraie quelle que soit la dose utilisée, ce qui montre bien que l'effet n'est pas dose-dépendant et que l'on a bien affaire à une population à part entière répondant différemment à la drogue. Cette population est ségréguée spatialement de celle activée par la nicotine : celle inhibée étant située au niveau médial alors que celle activée est située en partie latérale de la VTA (Eddine et al., 2015). Ces deux populations de neurones en réponse à la nicotine ne sont cependant pas corrélées à celles retrouvées en réponse à des stimuli aversifs (*pinch*, pincement de la queue, **Figure 3.5-B**). Des neurones inhibés par une injection

intraveineuse de nicotine peuvent être indifféremment activés ou inhibés par un pincement de la queue de l'animal (Eddine et al., 2015 ; **Figure 3.5-C**). Les réponses opposées aux stimuli nociceptifs aversifs sont ségréguées sur un plan dorso-ventral au sein de la VTA, suggérant probablement d'autres sous-populations de neurones dopaminergiques impliquées, en comparaison aux réponses à la nicotine réparties, quant à elles, sur un plan médio-latéral. De plus, il a été montré que des drogues comme la nicotine, l'alcool et la morphine, augmentaient la libération de DA au niveau du NAc mais pas du PFC alors que des drogues jugées aversives comme le pentylentetrazole ou la picrotoxine augmentaient, inversement, la libération de DA au niveau du PFC mais pas du NAc. Aussi, différents sous-réseaux dopaminergiques semblent bien être mis en jeu dans la réponse à des stimuli jugés appétitifs ou aversifs (Bassareo et al., 1996).

b. Contrôle de la consommation par les effets aversifs de la nicotine

La prise de nicotine peut provoquer des effets désagréables dès la première expérience, de façon aiguë, ou provoquer des effets aversifs sur le long-terme liés au manque. La découverte d'une variation allélique au niveau du cluster de gènes des sous-unités nicotiques $\beta 4/\alpha 3/\alpha 5$ (Chrnb4-Chrna3-Chrna5) sur la région chromosomique 15q25, a permis de montrer un risque accru de dépendance au tabac pour les porteurs de cette mutation (Berrettini et al., 2008; Fowler et al., 2011). De plus, un polymorphisme au niveau du gène codant pour la sous-unité $\alpha 5$ augmente également la vulnérabilité à l'addiction (Fowler et al., 2011; Morel et al., 2014).

La voie habénulo-interpédonculaire, constituée du noyau interpédonculaire (IPN) et de l'habénula médiale (MHb), exprime ces sous-unités nicotiques en forte proportion et a donc été impliquée dans la régulation de la consommation de nicotine (Fowler & Kenny, 2012; Salas et al., 2009).

Nous avons déjà mentionné le rôle de la VTA dans les effets renforçants de la nicotine. En effet, il a été montré une sensibilité diminuée des neurones dopaminergiques de la VTA pour la nicotine chez des souris $\alpha 5^{KO}$. Une réexpression de la sous-unité $\alpha 5$ dans la VTA chez des souris KO a permis de montrer qu'elle constituait un modulateur déterminant la dose minimale nécessaire pour induire un renforcement à la nicotine (Morel et al., 2014).

Toutefois, c'est la voie MHb-IPN qui est mise en jeu concernant la balance aversive du renforcement. Chez des souris KO pour la sous-unité $\alpha 5$, il a été observé une consommation accrue de nicotine, qui était régulée par la réexpression de la sous-unité au

niveau de la MHb (Fowler et al., 2011). La suppression de cette sous-unité spécifiquement dans la MHb n'altérerait pas les propriétés renforçantes de la nicotine mais seulement les effets négatifs induits par des doses élevées, censées limiter la consommation (Fowler et al., 2011). De plus, de fortes doses de nicotine jugées aversives, induisent une augmentation de l'activité *cfos*, un facteur de transcription immédiat précoce révélateur de l'activité neuronale, au niveau de l'IPN. Une perturbation de l'IPN ou de la MHb, par la lidocaïne ou des antagonistes des récepteurs NMDA, a pour conséquence d'augmenter la consommation de nicotine chez des rats (Fowler et al., 2011).

Notre équipe a récemment montré que la sous-unité $\beta 4$ au niveau de l'IPN apparaît essentielle dans la régulation de l'aversion à la nicotine. Les souris $\beta 4^{KO}$ continuent de consommer de la nicotine, même à de fortes doses jugées aversives, ce qui est rétabli par une réexpression de la sous-unité $\beta 4$ au niveau de l'IPN (Mondoloni et al., 2023).

De la même façon, chez des souris surexprimant la sous-unité $\beta 4$ (*TABAC mice*, souris transgénique pour le cluster de gènes *Chrb4-Chrna3-Chrna5*), il a été observé une consommation de nicotine altérée et une forte aversion pour la drogue. Ces effets pouvaient être contrebalancés par la réexpression du variant de la sous-unité $\alpha 5$ associé au tabagisme dans la MHb (Frahm et al., 2011). Les récepteurs nicotiniques $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ semblent donc être clefs au niveau de la MHb dans la régulation des circuits sous-tendant la consommation de nicotine (Frahm et al., 2011).

De plus, une diminution du renforcement à la nicotine est observée chez les souris $\beta 4^{KO}$, ainsi qu'une sensibilité accrue des neurones dopaminergiques de la VTA aux faibles doses et une augmentation de libération de DA au niveau du NAc (Harrington et al., 2016). Une réexpression de $\beta 4$ au niveau de l'IPN restaure le renforcement à la nicotine et atténue la sensibilité des neurones dopaminergiques à la nicotine (Harrington et al., 2016). Il semble donc y avoir un lien entre l'expression des récepteurs $\beta 4$ au niveau de l'IPN et les neurones dopaminergiques de la VTA. De plus, une inhibition optogénétique des connexions de l'IPN sur le LDTg bloque l'aversion médiée par des fortes doses de nicotine (Wolfman et al., 2018). Le LDTg, envoyant à son tour des projections sur la VTA, pourrait avoir un rôle clef dans la balance des effets renforçants ou aversifs médiés respectivement par les voies mésolimbique et habénulo-interpédonculaire. En effet, il a été montré qu'une dose élevée et aversive de nicotine induit une inhibition des neurones dopaminergiques projetant vers le NAc shell latéral, qui serait médiée par les neurones GABAergiques du LDTg (C. Liu et al., 2022). Ainsi, une désinhibition des neurones GABAergiques du LDTg par les neurones de l'IPN pourrait être à l'origine de cette inhibition dopaminergique dans la VTA, à des doses aversives de nicotine.

Par ailleurs, des symptômes de manque peuvent apparaître après un arrêt brutal de consommation de nicotine. Des symptômes de manque ont été observés chez des souris injectées avec un antagoniste des nAChR au niveau de la MHB et de l'IPN (Salas et al., 2009; Zhao-Shea et al., 2013). Ces symptômes n'ont pas été retrouvés pour un blocage des nAChR au niveau du cortex, de la VTA ou de l'hippocampe (Salas et al., 2009). Cela suggère un rôle des nAChR dans la mise en place de symptômes de manque. Le manque induit également une augmentation du marquage *cfos* au niveau des neurones de l'IPN, montrant bien une implication de cette région durant le sevrage (Zhao-Shea et al., 2013). Ceci a été confirmé par une étude montrant que les symptômes de manque provoqués par un blocage des nAChR via la mécamylamine étaient corrélés à une augmentation d'activité des neurones de l'IPN (Klenowski et al., 2022). Durant le sevrage, il a également été noté une activité augmentée de l'IPN dans un test visant à étudier l'anxiété (Klenowski et al., 2022). Une activation optogénétique des neurones GABAergiques de l'IPN précipite les symptômes de manque alors que leur inhibition durant la période de sevrage en atténue les symptômes (Klenowski et al., 2022; Zhao-Shea et al., 2013). De plus, les souris $\beta 4^{KO}$ présentent une diminution des symptômes de manque physiques à la nicotine (Stoker et al., 2012), et l'infusion d'un antagoniste spécifique des récepteurs $\alpha 3\beta 4$ dans l'IPN suite à une exposition à la nicotine induit des symptômes de manque (Zhao-Shea et al., 2013).

Une altération des nAChR de la voie MHB-IPN, apparaissant au niveau du cluster de gènes *Chrb4-Chrna3-Chrna5*, semble réduire l'aversion à la nicotine et conduire à une consommation de doses beaucoup plus élevées. Ceci serait à l'origine de la dépendance. Aussi, la voie MHB-IPN est impliquée dans les effets aversifs aigus induits par une prise de nicotine, limitant la consommation, mais elle semble également jouer un rôle majeur dans l'expression des symptômes de manque, incitant les individus à reconsommer toujours davantage de drogue pour masquer les effets indésirables.

c. L'anxiété induite par une prise de nicotine

L'anxiété est provoquée par des menaces peu prédictibles ou physiquement et psychologiquement distantes de l'individu. C'est un état d'esprit orienté vers l'avenir, activé par une menace lointaine et potentielle, associé à l'éveil et la vigilance (Davis et al., 2010). L'anxiété doit être distinguée de la peur qui est un état d'appréhension à une menace imminente, qui apparaît très rapidement mais disparaît dès que la menace s'arrête. L'anxiété peut donc être définie comme un état d'appréhension plus durable qui peut devenir pathologique s'il devient extrême. Elle peut être générée par des stimuli externes ou internes et est quantifiable par des tests comportementaux, physiologiques ou hormonaux (Tovote

et al., 2015). On note en effet un état accru de vigilance, du *freezing* (défini comme l'absence totale de mouvements corporels en réponse à un stimulus aversif inévitable (Brandão et al., 2008)) et/ou une hypoactivité, une fréquence cardiaque accélérée ainsi qu'une diminution de la consommation de nourriture (Lezak et al., 2017). L'anxiété est également à distinguer du stress qui se définit par des réactions de l'organisme tant émotionnelles que physiques à une situation particulière. Le stress et l'anxiété sont deux réactions différentes face à une situation difficile. Le stress est considéré comme une réponse immédiate et physique du corps face à une menace et disparaît comme dans le cas de la peur dès la dissipation du danger. Il permet de mobiliser les ressources nécessaires pour affronter une peur, qui est la réaction émotionnelle face à une menace réelle et concrète. Le stress est un facteur qui peut conduire à l'anxiété, impliquée dans la prédiction d'un danger et l'inconfort émotionnel associé.

Plusieurs tests comportementaux peuvent être utilisés sur le modèle murin pour étudier les troubles anxieux en laboratoire. On parle alors de comportements « *anxiety-like* » car nous n'avons aucune certitude que ce qui est interprété pour de l'anxiété chez le rongeur correspond aux troubles anxieux humains. Dans les paradigmes que je vais énoncer, on mesure le temps passé dans le compartiment jugé anxiogène, le nombre d'entrées ainsi que parfois le délai de transition d'un compartiment à un autre. Il est à noter que les rongeurs ont une tendance à préférer les endroits sombres ainsi que les endroits clos et protégés (Lezak et al., 2017; Rodgers & Dalvi, 1997; Tovote et al., 2015). Parmi ces tests visant à évaluer l'anxiété, il y a 1) l'*open field*: une boîte (en plexiglas par exemple) avec des murs, où l'on va mesurer le temps que passe l'animal au centre de la chambre – là où il est le plus vulnérable – par rapport au temps qu'il passe à longer les murs – là où il se considère à l'abri d'un prédateur éventuel –. Ce test est plutôt choisi pour évaluer la locomotion des rongeurs mais dans certains cas il reste utilisé pour évaluer les états anxieux. On compte également 2) la *dark-light box*, constituée de deux chambres: l'une très peu éclairée où les murs sont noirs, l'autre très éclairée avec des murs blancs. Sachant qu'une souris va préférer les endroits sombres et fermés, on va mesurer le temps passé dans le compartiment clair: si la souris y passe beaucoup de temps, cela signifie qu'elle ne semble pas anxieuse. Le 3) labyrinthe en croix surélevé (EPM, *elevated plus maze*) est composé de deux bras ouverts et deux bras fermés. On va alors mesurer le temps passé dans les bras ouverts et le nombre d'entrées dans chaque compartiment pour juger du niveau d'anxiété des rongeurs. Le 4) labyrinthe en O surélevé (*O-Maze*) est une variante de l'EPM mais de forme arrondie.

Certaines régions cérébrales semblent être impliquées à la fois dans les comportements anxieux et liés à la peur. Les états anxieux sont modifiés à la fois par des connexions locales et des projections dites à *longue portée*. Parmi ces régions mises en évidence dans les comportements liés à l'anxiété, on peut nommer : la VTA, l'Amg, l'hypothalamus, le BNST, l'hippocampe, le PFC et le septum latéral (Jo et al., 2018; Morel et al., 2022; Nguyen et al., 2021; Picciotto et al., 2002; Tovote et al., 2015). Chez l'Homme, les troubles anxieux ont été associés avec des modifications du volume des amygdales (Tovote et al., 2015). De nombreuses études ont montré le rôle des sous-circuits de l'Amg dans le traitement des émotions et dans les comportements liés à l'anxiété (*voir Chapitre 2, partie IV-b-ii-3.*). On peut en effet soulever le rôle de la signalisation dopaminergique au niveau de l'Amg dans les effets anxiogènes médiés par la nicotine (Sharp, 2019; Zarrindast et al., 2013).

Il a été montré une prévalence des troubles anxieux chez les fumeurs de cigarette. Chez les rongeurs, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence le lien entre anxiété et prise de nicotine. Les niveaux d'anxiété sont changés en fonction de la dose de nicotine injectée, du mode d'administration ainsi que de la phase de consommation (aiguë, chronique ou sevrage ; Picciotto et al., 2002). Dans un paradigme d'EPM, l'injection sous-cutanée de 0.1 mg/kg de nicotine chez des rats, 30 minutes avant le test, a montré un effet anxiogène aigu, avec un temps passé dans les bras ouverts diminué (Irvine et al., 2001). Cet effet anxiogène a également été retrouvé pour des doses plus élevées, toujours chez le rat (Ouagazzal et al., 1999). Cependant, une tolérance se développe au cours d'une semaine d'injections répétées car l'effet anxiogène n'est plus observé 30 minutes après l'administration. Au contraire, une semaine d'injections de nicotine a montré un effet anxiolytique de la nicotine si l'injection était faite 5 minutes avant le test alors que si le test était précédé de 24 heures de sevrage on retrouvait une augmentation de l'anxiété (Irvine et al., 2001). Il a été proposé que la dose de nicotine employée détermine les conséquences anxiogènes ou anxiolytiques, mais là encore les études se contredisent (Kutlu & Gould, 2015). Chez un modèle de souris, une faible dose de nicotine en intrapéritonéale a un effet anxiolytique (0.05 mg/kg) alors qu'une dose plus élevée (0.5 mg/kg) a montré un effet anxiogène (Anderson & Brunzell, 2015). Un antagoniste des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ permet de bloquer les effets anxiogènes de la nicotine dans un test de *dark-light*. Au contraire, un prétraitement avec une faible dose de nicotine va avoir un effet anxiolytique pour des fortes doses dans un paradigme d'EPM alors que cette même forte dose était, sans prétraitement, anxiogène (Anderson & Brunzell, 2015). Une faible dose de nicotine semble donc inhiber les nAChR à l'origine des effets anxiogènes, montrant qu'une inhibition ou une activation de ces récepteurs soutient respectivement les effets anxiolytiques et anxiogènes de la nicotine. Une inhibition des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ pourrait donc permettre

de soulager l'anxiété chez certains individus (Anderson & Brunzell, 2015). De plus, il a été montré que la sous-unité $\alpha 4$ était nécessaire pour médier les effets anxiolytiques de la nicotine dans un test d'EPM (McGranahan et al., 2011) alors qu'une mutation rendant cette sous-unité hypersensible induit une augmentation des comportements liés à l'anxiété (Labarca et al., 2001).

Il faut bien noter que le modèle rongeur utilisé a des conséquences sur les effets comportementaux observés, car les niveaux d'anxiété basale diffèrent entre les lignées ou les espèces (Kutlu & Gould, 2015; Picciotto et al., 2002). Il est très important de souligner que les effets comportementaux liés à l'anxiété sont dépendants du contexte et donc du paradigme utilisé. En effet, pour une même dose de nicotine chez une même lignée de souris, on observe des effets opposés sur le comportement en fonction du paradigme utilisé. Il a été démontré que dans un paradigme de préférence de place, on obtient un renforcement après une injection intrapéritonéale d'une dose de nicotine (Durand-de-Cuttoli et al., 2018; Walters et al., 2006) ayant des effets anxiogènes dans un paradigme d'EPM (Anderson & Brunzell, 2015; Balerio et al., 2006; Picciotto et al., 2002). Ceci suggère que les mécanismes impliqués dans les effets renforçant et anxiogène s'établissent en parallèle, mais que l'expression comportementale dépend du contexte et de la contingence dans lesquels la nicotine est donnée.

Par ailleurs, il a été montré que le stress induisait une hypoactivité des neurones dopaminergiques projetant vers la BLA, qui était corrélée avec une augmentation des niveaux d'anxiété (Morel et al., 2022). Cette étude a montré que l'activité calcique de la voie VTA-BLA était liée au temps passé dans les bras ouverts d'un EPM. En effet, plus les souris passaient du temps dans les bras ouverts et plus il y avait une activité de cette voie, suggérant un effet anxiolytique de la DA. De plus, une activation par optogénétique de la voie VTA-BLA induit une augmentation du temps passé dans les bras ouverts (effet anxiolytique) alors qu'une inhibition induit une diminution du temps passé dans ces mêmes bras (effet anxiogène; Morel et al., 2022 ; **Figure 3.6**).

La nicotine pourrait donc induire les effets anxiogènes ou anxiolytiques en modulant l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA projetant vers la BLA.

En conclusion, la consommation de drogue a pour conséquence un comportement compulsif de recherche et de consommation de cette dernière, avec des épisodes récurrents d'abstinence et de rechute et une perte de contrôle malgré les conséquences négatives. Les effets négatifs induits par une drogue et les adaptations dans le temps,

apparaissent donc être tout aussi importants que les effets renforçants dans le développement de l'addiction. L'étude des mécanismes cellulaires et la séquence des événements neuronaux qui participent à la balance entre effets positifs et négatifs de la nicotine, pourrait permettre une meilleure compréhension de la mise en place de la dépendance.

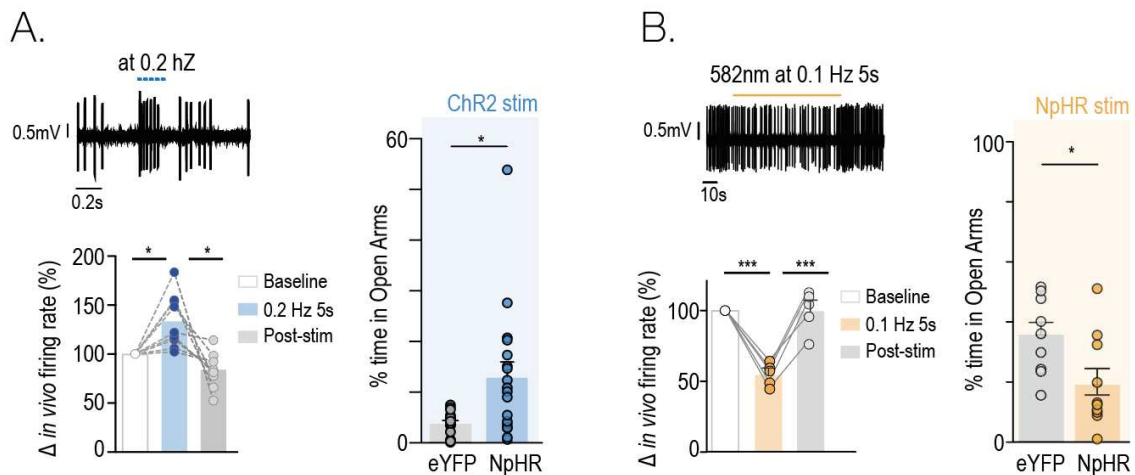


Figure 3.6. Les neurones dopaminergiques de la voie VTA-BLA contrôlent les comportements liés à l'anxiété | **A.** Trace exemple d'un enregistrement *in vivo* de neurone *photo-taggué* exprimant une opsine activatrice (ChR2; *gauche, haut*), avec l'augmentation moyenne de l'activité de décharge des neurones dopaminergiques après stimulation optogénétique de l'opsine (*gauche, bas*). Temps passé dans les bras ouverts d'un paradigme d'EPM (*elevated plus maze*) chez des souris contrôle et exprimant la ChR2, durant une stimulation optogénétique (*droite*). **B.** Trace exemple d'un enregistrement *in vivo* de neurone *photo-taggué* exprimant une opsine inhibitrice (NpHR; *gauche, haut*), avec la diminution moyenne de l'activité de décharge des neurones dopaminergiques après stimulation optogénétique de l'opsine (*gauche, bas*). Temps passé dans les bras ouverts d'un paradigme d'EPM (*elevated plus maze*) chez des souris contrôle et exprimant la NpHR, durant une stimulation optogénétique (*droite*). Adapté de Morel et al. 2022.

Résultats

Chapitre 4 : Première publication scientifique

Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety.

Nguyen C., Mondoloni S., **Le Borgne T.**, Centeno I., Come M., Jehl J., Solié C., Reynolds LM., Durand-de Cuttoli R., Tolu S., Valverde S., Didienne S., Hannedouche B., Fiancette JF., Pons S., Maskos U., Deroche-Gamonet V., Dalkara D., Hardelin JP., Mourot A., Marti F.*, Faure P.* (*co-last). **Neuron (2021).**

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale présentent une forte hétérogénéité sur le plan moléculaire, anatomique et fonctionnel. Il est alors tentant de décrire ce système dopaminergique comme un ensemble de sous-circuits, projetant chacun vers des régions différentes et étant impliqués dans des comportements distincts. Les neurones dopaminergiques de la VTA sont au cœur du système de la récompense et participent à l'encodage de stimuli renforçants mais également aversifs. La nicotine, drogue d'abus connue pour agir au niveau somatique des neurones dopaminergiques, est capable d'induire un renforcement tout comme elle peut engendrer des effets négatifs comme l'anxiété. Nos travaux antérieurs ont montré que la nicotine n'active pas seulement une population de neurones dopaminergiques de la VTA, comme cela est traditionnellement décrit, mais elle induit également l'inhibition d'une autre population de neurones dopaminergiques de la VTA (Eddine et al., 2015).

Cette première publication s'intègre donc dans une problématique de dissection fonctionnelle de l'action des drogues sur les circuits dopaminergiques de la VTA qui sous-tendent les processus d'addiction. Nous démontrons, au moyen de marquages rétrogrades et d'enregistrements électrophysiologiques juxtacellulaires *in vivo*, que les réponses d'activation et d'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA à la nicotine dépendent de circuits anatomiquement et fonctionnellement distincts, entraînant des réactions comportementales opposées face à la nicotine. Nous avons découvert que les neurones activés par la nicotine projettent vers le NAc alors que les neurones inhibés projettent vers l'Amg.

Nous avons ensuite cherché à comprendre les messages fonctionnels qui pourraient être médiés par ces deux réponses opposées. Dans une tâche évaluant les niveaux d'anxiété, nous avons montré que la nicotine, injectée en intrapéritonéale (0.5 mg/kg) ou en intracrâniale (100 ng), à des doses capables d'induire un renforcement, provoque un effet

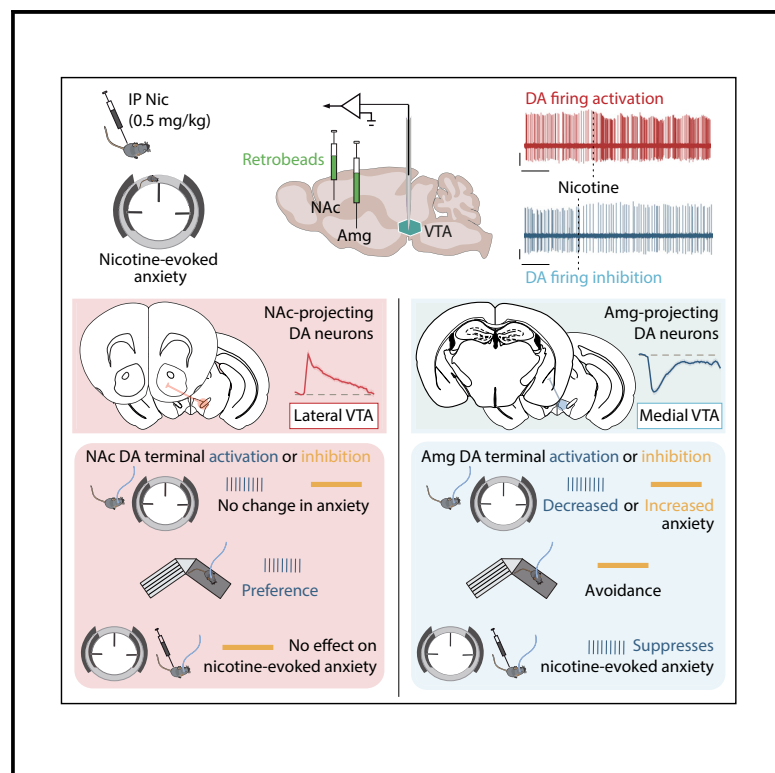
anxiogène et que son action est dépendante de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiques. En effet, chez des animaux délétés de la sous-unité $\beta 2$ ($\beta 2^{KO}$), les deux types de réponses à la nicotine ainsi que l'effet anxiogène sont abolis, mais peuvent être restaurés par la réexpression lentivirale de la sous-unité $\beta 2$ dans tous les neurones de la VTA. Ces résultats suggèrent donc que la nicotine exerce une action locale au niveau de la VTA, pour médier à la fois les réponses activées et inhibées des neurones dopaminergiques, ainsi que l'effet anxiogène.

Enfin, nous avons mimé l'action de la nicotine par optogénétique sur les deux sous-populations dopaminergiques mises en évidence – de façon indépendante, bidirectionnelle et sur des souris DAT-Cre – afin d'évaluer leurs implications dans les effets récompensants et anxiogènes de la nicotine. L'activation optogénétique de la voie VTADA-NAc induit une préférence de place, sans effet sur l'anxiété, alors que l'inhibition optogénétique de la voie VTADA-Amg provoque une aversion de place et une augmentation des niveaux d'anxiété. Au contraire, une activation de la voie VTADA-Amg prévient les effets anxiogènes médiés par la nicotine.

L'ensemble de ces résultats implique les neurones dopaminergiques de la VTA projetant vers l'Amg dans les comportements anxieux provoqués par la nicotine alors que les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc apparaissent impliqués dans les effets récompensants. Ces deux sous-populations de neurones dopaminergiques pourraient donc médier de manière différentielle, les effets antagonistes de la nicotine.

Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety

Graphical abstract



Authors

Claire Nguyen, Sarah Mondoloni, Tinaïg Le Borgne, ..., Alexandre Mourot, Fabio Marti, Philippe Faure

Correspondence

fabio.marti@upmc.fr (F.M.),
phfaure@gmail.com (P.F.)

In brief

Nicotine promotes anxiety in addition to its reinforcing properties. Nguyen et al. demonstrate that nicotine activates nucleus-accumbens-projecting dopamine neurons while concomitantly inhibiting amygdala-projecting ones. Bidirectionally manipulating these two pathways using optogenetics reveals that their opposing responses differentially drive the rewarding and anxiogenic effects of nicotine.

Highlights

- Nicotine injection activates or inhibits distinct VTA dopaminergic subpopulations
- NAc-projecting neurons are excited by nicotine, and their activation is reinforcing
- Amygdala-projecting neurons are inhibited by nicotine, and their silencing is anxiogenic
- Nicotine-mediated anxiety is prevented by activating VTA-amygdala DA neurons



Article

Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety

Claire Nguyen,^{1,2} Sarah Mondoloni,² Tinaïg Le Borgne,^{1,2} Ines Centeno,² Maxime Come,^{1,2} Joachim Jehl,^{1,2} Clément Solié,^{1,2} Lauren M. Reynolds,^{1,2} Romain Durand-de Cuttoli,² Stefania Tolu,² Sébastien Valverde,² Steve Didienne,^{1,2} Bernadette Hannesse,² Jean-François Fiancette,³ Stéphanie Pons,⁴ Uwe Maskos,⁴ Véronique Deroche-Gamonet,³ Deniz Dalkara,⁵ Jean-Pierre Hardelin,^{1,2} Alexandre Mourot,^{1,2} Fabio Marti,^{1,2,6,*} and Philippe Faure^{1,2,6,7,*}

¹ESPCI, Laboratoire de plasticité du cerveau UMR8249, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

²Sorbonne Université, Inserm, UMR8246 CNRS, Neuroscience Paris Seine – IBPS, 75005 Paris, France

³Neurocentre Magendie, Inserm U1215, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France

⁴Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Département de neuroscience, 75724 Paris Cedex, France

⁵Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France

⁶These authors contributed equally

⁷Lead contact

*Correspondence: fabio.marti@upmc.fr (F.M.), phfaure@gmail.com (P.F.)

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>

SUMMARY

Nicotine stimulates dopamine (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) to establish and maintain reinforcement. Nicotine also induces anxiety through an as yet unknown circuitry. We found that nicotine injection drives opposite functional responses of two distinct populations of VTA DA neurons with anatomically segregated projections: it activates neurons that project to the nucleus accumbens (NAc), whereas it inhibits neurons that project to the amygdala nuclei (Amg). We further show that nicotine mediates anxiety-like behavior by acting on $\beta 2$ -subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors of the VTA. Finally, using optogenetics, we bidirectionally manipulate the VTA-NAc and VTA-Amg pathways to dissociate their contributions to anxiety-like behavior. We show that inhibition of VTA-Amg DA neurons mediates anxiety-like behavior, while their activation prevents the anxiogenic effects of nicotine. These distinct subpopulations of VTA DA neurons with opposite responses to nicotine may differentially drive the anxiogenic and the reinforcing effects of nicotine.

INTRODUCTION

Nicotine is the principal addictive component that drives continued tobacco use. The initiation of addiction involves the mesocortico-limbic dopamine (DA) system, which contributes to the processing of rewarding stimuli during the overall shaping of successful behaviors (Schultz, 2007). Addictive drugs such as nicotine are assumed to hijack the mechanisms of reinforcement learning, leading to an overvaluation of the drug reward at the expense of natural rewards. Although drug-induced reinforcement learning generally involves an increase in extracellular DA concentration in the nucleus accumbens (NAc), the underlying molecular and cellular mechanisms are drug dependent (Changeux, 2010; Di Chiara and Imperato, 1988; Luscher, 2016). Nicotine exerts its reinforcing effects through the direct activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), a family of pentameric ligand-gated ion channels (Changeux et al., 1998), expressed on midbrain DA and GABA neurons, thus increasing the activity of both neuronal populations (Maskos et al., 2005; Morel et al., 2014; Tolu et al.,

2013). Cell-type-specific optogenetic manipulations have confirmed that DA cell activation is sufficient to drive the transition toward addiction and established causal links between DA neuron activation and drug-adaptive behaviors (Pascoli et al., 2015). However, such a view does not take into account the heterogeneity of midbrain DA neurons and the possibility that different messages can be transmitted in parallel from DA neurons of the ventral tegmental area (VTA). Indeed, VTA DA neurons belong to anatomically distinct circuits, differ in their molecular features, and show diverse responses to external stimuli (Lammel et al., 2008; Poulin et al., 2018). DA neurons transmit signals related not only to salience and reward but also to aversive stimuli (Brischoux et al., 2009; de Jong et al., 2019), including the “negative” effects of nicotine at high doses (Grieder et al., 2010, 2019). However, how DA neurons simultaneously drive opposite outcomes in response to the same stimuli remains unclear. Although the vast majority of research groups that have examined nicotine-evoked responses have reported homogeneous activation of DA neurons and an increase in DA release in their projection areas (Di Chiara and

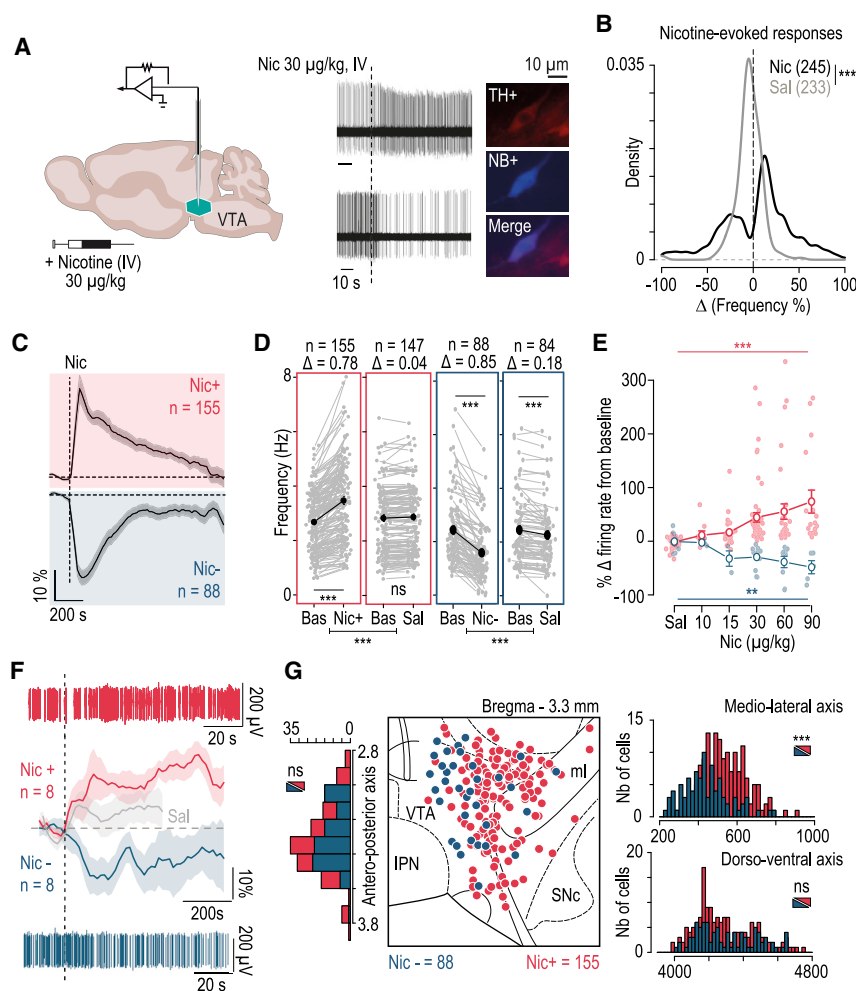


Figure 1. Nicotine injection evokes opposing responses in distinct VTA DA neuron populations

(A) Intravenous (i.v.) injections of nicotine (Nic; 30 µg/kg) induce activation or inhibition of distinct VTA DA neurons in anesthetized mice (representative recordings). Post-recording identification of Neurobiotin (NB)-labeled VTA DA neurons by immunofluorescence (TH, tyrosine hydroxylase; NB, streptavidin-AMCA against Neurobiotin).

(B) Response density after i.v. injection of either saline (Sal; gray, $n = 233$) or nicotine (Nic; black, $n = 245$) expressed as percentage of firing frequency variation induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, $***p < 0.001$).

(C) Time course for the average change in firing frequency upon nicotine injection for activated (Nic+ in red, $n = 155$, maximum variation $+33.75\% \pm 52.52\%$) and inhibited (Nic- in blue, $n = 88$, minimum variation $-35.43\% \pm 23.63\%$) VTA DA neurons.

(D) Firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by Nic or Sal injection in nicotine-activated and nicotine-inhibited DA neurons. Comparison between mean firing rate during baseline and maximal firing rate after injection for activated neurons and between mean firing rate during baseline and minimal firing rate after injection for inhibited neurons (paired Wilcoxon test: $***p < 0.001$; ns, $p > 0.05$) and comparisons between saline-induced and nicotine-induced firing rate variations (Wilcoxon test, $***p < 0.001$). Mean scores are represented in black and individual scores in gray.

(E) Dose-response curves in Nic+ (red) and Nic- (blue) DA neurons. Responses to different doses of nicotine (0, 10, 15, 30, 60, and 90 µg/kg, with $n = 48, 9, 27, 51, 33$, and 17 for activated neurons and $n = 11, 3, 3, 12, 9$, and 5 for inhibited neurons) are expressed as percentage of variation from baseline.

line. Neurons are classified as activated or inhibited on the basis of their response to the injection of at least 30 µg/kg nicotine (one-way ANOVA for dose effect: Nic+, $F_{[5, 179]} = 7.54$, $***p < 0.001$; Nic-, $F_{[5, 37]} = 4.78$, $**p = 0.002$).

(F) Time course for the average change in firing frequency upon saline (gray, $n = 16$) or nicotine injection for Nic+ (red, $n = 8$) and Nic- (blue, $n = 8$) VTA DA neurons recorded with tetrodes in freely moving mice with examples of traces for a Nic+ (red) and a Nic- (blue) neuron.

(G) Localization of NB-labeled, Nic+ and Nic- DA neurons ($n = 243$), positioned on the Paxinos atlas at bregma -3.3 mm. Nic- neurons had a more medial distribution within the VTA than Nic+ neurons (Wilcoxon test, $***p < 0.001$), but neither anteroposterior (Wilcoxon test, $p = 0.4$) nor dorsoventral (Wilcoxon test, $p = 0.56$) differences in their distribution were observed. Results are plotted as mean $\pm$ S.E.M.

Imperato, 1988; Grenhoff et al., 1986; Mansvelder and McGehee, 2000; Maskos et al., 2005; Picciotto et al., 1998; Zhao-Shea et al., 2011), other reports suggest that the responses of VTA DA neurons to nicotine are more heterogeneous than previously thought (Eddine et al., 2015; Mameli-Engvall et al., 2006; Zhao-Shea et al., 2011). Therefore, a key issue is how the multiple effects of nicotine map onto DA cell diversity and whether nAChR or other features can define different neuronal subpopulations that, through their response to nicotine, can influence specific behaviors.

RESULTS

Distinct VTA DA neuron populations show opposite responses to acute nicotine injection

We recorded the response of VTA DA neurons to an intravenous (i.v.) injection of nicotine using single-cell electrophysiological re-

cordings in anesthetized mice. We used a dose of nicotine (30 µg/kg) that has been shown to be reinforcing in the context of i.v. self-administration (Morel et al., 2014). These neurons were first identified during the recordings on the basis of their electrophysiological properties (i.e., firing rate and action potential width) (Mameli-Engvall et al., 2006; Ungless and Grace, 2012) and then filled with Neurobiotin (NB) by the juxtacellular labeling technique (Eddine et al., 2015; Pinault, 1996). All neurons were confirmed as DA neurons by post hoc immunofluorescence with co-labeling for tyrosine hydroxylase (TH) and NB (Figure 1A). Acute i.v. nicotine injections induced a significant variation of DA neuron firing rates, producing either an increase or a decrease in firing rate that was absent in control experiments with saline. Indeed, the variations in firing frequency had a unimodal distribution for saline injections ($n = 233$ neurons) but a bimodal distribution for nicotine injections ($n = 245$; Figure 1B, comparison of

distribution, Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.001$; see also [Figure S1](#)). Among the 245 identified DA neurons, some were activated (Nic+; $n = 155$) whereas others were inhibited (Nic–, $n = 88$) by nicotine injection ([Figure 1C](#)), in line with our previous findings ([Eddine et al., 2015](#)). Nicotine-induced increases or decreases in DA neuron firing rate were of similar amplitude (about 35% from baseline for a dose of 30 $\mu\text{g/kg}$) and were higher in amplitude than saline-evoked responses ([Figure 1D](#)). In addition, nicotine-induced changes in DA neuron firing rate were dose dependent and, importantly, maintained the polarity of their response (i.e., either an increase or decrease) at all doses tested ([Figure 1E](#)). Finally, to rule out potential confounding effects of anesthesia on the activity of VTA DA neurons, putative VTA DA neurons ($n = 16$) were recorded in freely moving mice ([Figures S2A–S2B](#)), and nicotine or saline was injected into the tail vein (30 $\mu\text{g/kg}$ i.v.; see [STAR Methods](#)). We observed VTA DA neurons that were either activated (Nic+; $n = 8$) or inhibited (Nic–; $n = 8$) by the nicotine injection ([Figure 1F](#)), replicating the results we found in anesthetized mice (comparisons between saline-induced and nicotine-induced firing rate variations by Student's *t* test with Bonferroni correction, $p = 0.02$ for activated neurons and $p < 0.001$ for inhibited neurons). Therefore, the nature of nicotine-evoked responses (i.e., activation or inhibition) constitutes a marker that allows the robust segregation of VTA DA neurons into two populations.

We then sought to determine whether the spontaneous activity of these two populations of DA neurons differ in anesthetized mice. The basal activity of VTA DA neurons is characterized by the firing rate and the percentage of spikes within a burst (% SWB) ([Mameli-Engvall et al., 2006](#)). Bursts are classically identified as discrete events consisting of a sequence of spikes with (1) a burst onset defined by two consecutive spikes within an interval of <80 ms and (2) the end of a burst defined by an inter-spike interval of >160 ms ([Grace and Bunney, 1984a](#); [Ungless and Grace, 2012](#)). We found that nicotine-activated and nicotine-inhibited DA neurons had similar firing rates ($\Delta = 0.26$ Hz, $p = 0.0506$) and bursting activities ($\Delta = 3.5\%$, $p = 0.064$) ([Figure S2C](#)). An analysis of the distribution of burst time intervals also highlighted different profiles in the distribution of inter-spike intervals depending on the burst length ([Figure S2C](#)). Other parameters describing cell spontaneous activity (e.g., coefficient of variation or bursting frequency) were analyzed, but none of them revealed a difference between nicotine-activated and nicotine-inhibited DA neurons. Finally, a multiple logistic regression was used to predict the probability of response type (inhibited/activated) on the basis of predictor variables (the firing frequency, the coefficient of variation, %SWB, and bursting frequency). Only the spontaneous firing frequency was statistically associated to the outcome ($p = 0.007$), and the classification prediction was very low (about 36%). Overall, differences between the two groups could be detected, yet nicotine-evoked responses could not be predicted on the basis of the sole analysis of spontaneous activity.

We next asked whether these two populations were anatomically segregated. NB-filled cell bodies of each responding neuron ($n = 243$) were positioned onto mouse brain atlas plates ([Paxinos and Franklin, 2004](#)) ([Figure S3](#)) to study their anatomical location. As illustrated by a single atlas plate schematic (bregma

– 3.3 mm), anatomical coordinates suggest that the inhibited neurons were located more medially within the VTA than the activated neurons, independently of their anteroposterior or dorso-ventral positions ([Figure 1G](#)).

Nicotine-activated VTA DA neurons project to the NAc, while nicotine-inhibited VTA DA neurons project to the amygdala

The DA system is heterogeneous and is increasingly thought about in terms of anatomically and functionally distinct sub-networks ([Watabe-Uchida et al., 2012](#)). DA neurons in the VTA have been reported to project to different terminal regions on the basis of their localization along the mediolateral axis ([Beier et al., 2015, 2019](#); [Lammel et al., 2008](#)). Therefore, we next investigated whether these two subpopulations belong to anatomically distinct DA circuits by probing nicotine-evoked responses of DA neurons with identified projection sites. To do so, we first targeted the NAc by simultaneously injecting green RetroBeads (RB), a retrograde tracer, in three sub-nuclei: the lateral shell (NAcLSh), the medial shell (NAcMSh), and the core ([Figure S4A](#)). Two weeks later, spontaneous and nicotine-evoked activities of VTA DA neurons were recorded *in vivo* in anesthetized mice, and neurons were then labeled with NB. Triple-labeling immunofluorescence allowed us to confirm post hoc the DA nature (TH+), projection site (RB+ or RB–), and position (NB+) of all recorded neurons ([Figure 2A](#); [Figure S4B](#)). We recorded and labeled 32 nicotine-activated and 17 nicotine-inhibited neurons in mice with RB injected in the NAc (all shell + core), among which 30 neurons were further identified as NAc-projecting (RB+, TH+) neurons. Among the NAc-projecting DA neurons, 93% (28 of 30) were activated by nicotine, while only 7% of neurons (2 of 30) were inhibited. In contrast, the remaining 19 DA neurons showed no evidence of projection to the NAc (RB–, TH+), and 79% of these neurons (15 of 19) were inhibited by a nicotine injection, while 21% (4 of 19) were activated ([Figures 2B and 2C](#)). The proportion of nicotine-activated neurons in NAc-projecting cells was thus significantly greater than what would be expected from the entire population of RB+ and RB– neurons (Pearson's chi-square test, $p < 0.001$). A similar analysis was carried out on mice with a single RB injection site of either the NAcMSh or the NAcLSh to examine whether this effect was driven by a specific NAc sub-nucleus. Analysis of the nicotine-evoked responses on NAcMSh-projecting DA neurons ($n = 14$ RB+, TH+; $n = 8$ RB–, TH+) and NAcLSh-projecting DA neurons ($n = 6$ RB+, TH+; $n = 6$ RB–, TH+) leads to the same conclusion that the majority of DA neurons that project to the NAc are activated by nicotine, regardless of the specific NAc sub-nucleus they project to ([Figure S5](#)).

In a second series of experiments, RB were injected in the amygdala nuclei (Amg), targeting both the basolateral amygdala (BLA) and central amygdala (CeA) ([Figure S4C](#)). All recorded neurons were once again labeled with NB and confirmed as DA post hoc by triple-labeling immunofluorescence (TH+, NB+, RB+/-; [Figure 2D](#); [Figure S4D](#)). We recorded and labeled 26 nicotine-activated and 26 nicotine-inhibited neurons in mice with RB injected in the Amg (BLA + CeA) ([Figures 2E and 2F](#)), among which 22 VTA DA neurons were confirmed as Amg-projecting (RB+, TH+) neurons. Among the Amg-projecting DA neurons, 86%

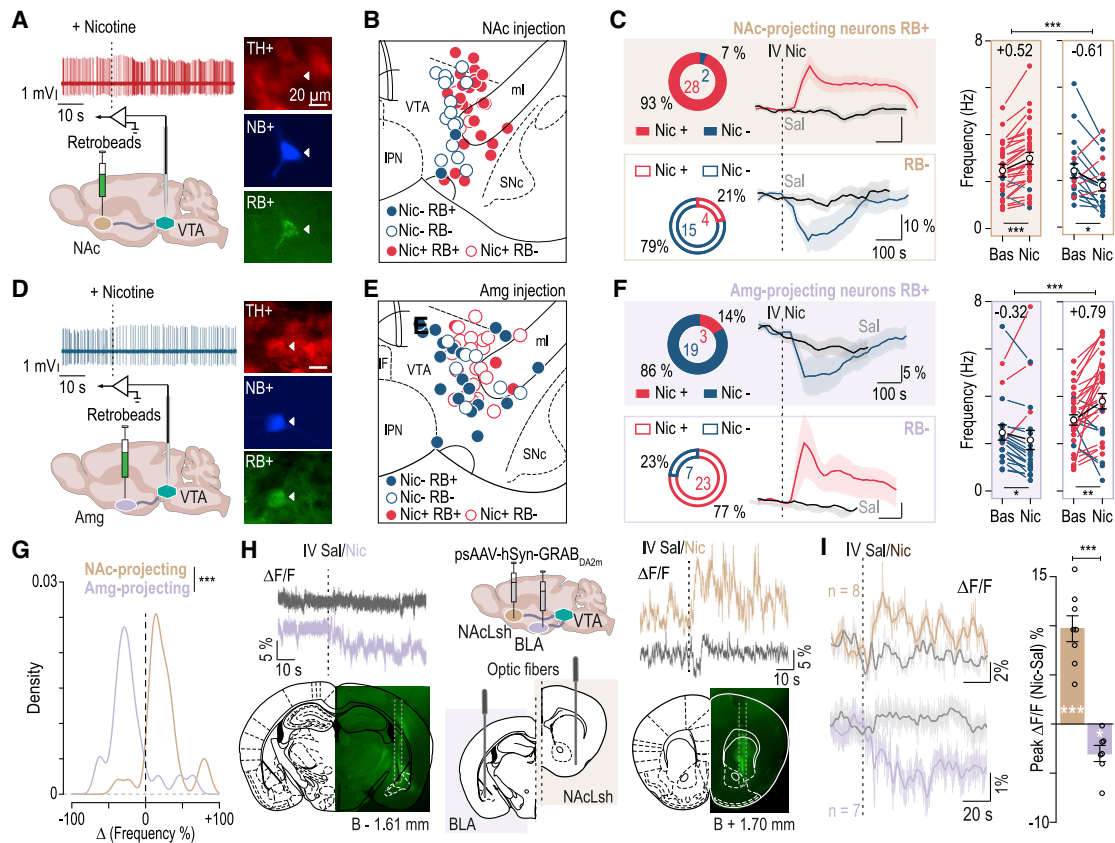


Figure 2. VTA DA neuron populations activated or inhibited by nicotine belong to anatomically segregated projection pathways

(A) RetroBeads (RB) were injected in the nucleus accumbens (NAC; injection in the lateral shell [LSH] + medial shell [MSH] + core), and *in vivo* recordings of VTA DA neuron responses to an i.v. nicotine injection were obtained in anesthetized mice. Post hoc identification of NAC-projecting DA neurons by immunofluorescent co-labeling of tyrosine hydroxylase (TH), Neurobiotin (NB), and RetroBeads (RB).

(B) Localization of NB-labeled DA neurons (NB+ TH+; $n = 49$) following RB injection (filled circles, RB+; open circles, RB-) into the NAC. Red and blue colors denote nicotine-activated (Nic+) and nicotine-inhibited (Nic-) neurons, respectively (RB+ Nic+, $n = 28$; RB+ Nic-, $n = 2$; RB- Nic+, $n = 4$; RB- Nic-, $n = 15$).

(C) Left: percentage and number of Nic+ (red) and Nic- (blue) cells among NAC-projecting DA neurons (RB+; top) or non-RB-labeled neurons (RB-; bottom), with mean change in firing frequency in response to i.v. injection of either nicotine (red or blue, 30 μ g/kg) or saline (black). Right: firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by nicotine (Nic) injection in RB+ (mean $\Delta = +0.52$ Hz) or RB- (mean $\Delta = -0.61$ Hz) or RB- DA neurons following RB injection into the NAC. Comparison between mean firing rate during baseline and maximum/minimum firing rate after injection: paired Wilcoxon test, *** $p < 0.001$ for RB+, * $p = 0.017$ for RB-; comparison between nicotine-induced firing rate variation evoked in RB+ and RB- DA neurons: Wilcoxon test, *** $p < 0.001$. Mean scores are represented in black, and individual scores in red or blue.

(D) Same as in (A) but with RB injected in the amygdala (Amg; injection in central nucleus [CeA] + basolateral amygdala [BLA]).

(E) Localization of NB-labeled DA neurons (NB+ TH+; $n = 52$) following RB injection into the Amg (RB+ Nic+, $n = 3$; RB+ Nic-, $n = 19$; RB- Nic+, $n = 23$; RB- Nic-, $n = 7$).

(F) Left: percentage and number of Nic+ (red) and Nic- (blue) cells among Amg-projecting DA neurons (RB+; top) or non-RB-labeled neurons (RB-; bottom). Right: firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by nicotine (Nic) injection in RB+ (mean $\Delta = -0.32$ Hz) or RB- (mean $\Delta = +0.79$ Hz) DA neurons following RB injection into the Amg. Comparison between mean firing rate during baseline and maximum/minimum firing rate after injection: paired Wilcoxon test, * $p = 0.027$ for RB+, ** $p = 0.002$ for RB-; comparison between nicotine-induced firing rate variation evoked in RB+ and RB- DA neurons: Wilcoxon test, *** $p < 0.001$).

(G) Density of responses evoked by nicotine in NAC-projecting (gold) and Amg-projecting (purple) DA neurons. Responses expressed as percentage of firing variation induced by nicotine (Kolmogorov-Smirnov test, *** $p < 0.001$).

(H) AAV-mediated delivery of the genetically encoded GPCR-activation-based-DA sensor (GRAB_{DA}) in the BLA and the NACLSH of wild-type (WT) mice. One optic fiber was implanted in the BLA of one brain hemisphere, and a second fiber was implanted in the NACLSH of the other hemisphere. Examples of fluorescence variation of GRAB_{DA} expression (as $\Delta F/F$) induced by i.v. Nic or Sal injection and fiber implantation sites (left) in the BLA and (right) in the NACLSH with post hoc verification of both implantations.

(I) Left: mean fluorescence variation of GRAB_{DA} (expressed as $\Delta F/F$; transparent curves, mean $\Delta F/F$; bold curves, kernel fit of $\Delta F/F$) induced by saline (gray) or nicotine i.v. injection (30 μ g/kg) in freely moving mice recorded by fiber photometry in the NACLSH (gold; $n = 8$ injections in six mice) and the BLA (purple; $n = 7$ injections in six mice). Right: difference in peak $\Delta F/F$ between nicotine and saline (paired Student's *t* test, * $p = 0.011$ and *** $p < 0.001$ for BLA and NACLSH; difference in $\Delta F/F$ [nicotine - saline] between NACLSH and BLA, Student's *t* test, *** $p < 0.001$). Results are plotted as mean $\pm$ S.E.M.

(19 of 22) were nicotine inhibited, while only 14% (3 of 22) were activated. In contrast, DA neurons without evidence of projection to the Amg (RB–, TH+) were mainly nicotine activated (77% [23 of 30]), with 23% of neurons (7 of 30) inhibited (Figures 2E and 2F). The proportion of inhibited neurons in Amg-projecting cells was thus significantly greater than what would be expected from the entire population of RB+ and RB– neurons (Pearson's chi-square test, $p < 0.001$). Analysis of the distribution of the nicotine-evoked variation in firing frequency for NAc-projecting ($n = 30$) and Amg-projecting ($n = 22$) neurons revealed two different distributions (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.001$) with opposite modes (i.e., positive and negative variations; Figure 2G). Overall, these results indicate that the majority of VTA DA neurons activated by an i.v. nicotine injection project to the NAc (core or shell), whereas the majority of nicotine-inhibited neurons project to the Amg (comparison of the percentages of inhibited and activated neurons in Amg-projecting neurons and NAc-projecting neurons by Pearson's chi-square test, $p < 0.001$). Notably, in line with previous reports (Lammel et al., 2008), further anatomical analysis of triple-labeled VTA sections revealed that Amg-projecting DA neurons are located more medially in the VTA than NAc-projecting DA neurons (Figure S4E). We found that NAc-projecting and Amg-projecting DA neurons had similar firing rates ($p = 0.8$), but Amg-projecting neurons tended to have higher bursting activity ($p = 0.28$), in line with what we had previously observed for nicotine-activated and nicotine-inhibited VTA DA neurons (Figure S4F; also see Figure S2C).

We then probed how these opposite changes in the firing of VTA DA neurons in response to nicotine injection translate into DA release in the NAc and Amg. Using *in vivo* fiber photometry and a genetically encoded DA sensor (GRAB_{DA2m}; Sun et al., 2018, 2020), we assessed the real-time dynamics of DA release in the NAcLSH and in the BLA after i.v. nicotine injection (30 μ g/kg) in the tail vein of freely moving mice (Figure 2H). We found that nicotine injection evoked an increase of DA release in the NAcLSH, whereas it produced a decrease of DA release in the BLA (Figure 2I), in agreement with our electrophysiological results at the cell body level. Together, these results confirm that nicotine drives opposite functional responses within two distinct DA pathways from the VTA.

Finally, we took advantage of the anatomical distinction between these two pathways to analyze the respective electrophysiological properties of their VTA DA neurons in *ex vivo* patch-clamp recordings. NAc-projecting (MSh + LSh + core) or Amg-projecting (BLA + CeA) DA neurons were labeled with RB (Figures S6A and S6B). Amg-projecting DA neurons showed higher excitability (Figures S6C and S6D) than NAc-projecting DA neurons, but no difference in nicotine-evoked currents was found between these two populations (Figures S6E and S6F). These results indicate that these two VTA DA cell populations have different membrane properties but do not markedly differ in the functional expression of somatodendritic nAChR.

The anxiogenic effect of nicotine requires $\beta 2$ -subunit-containing nAChR in the VTA

We next asked whether these two distinct DA sub-circuits are associated with different behavioral outcomes after an acute in-

jection of nicotine. Nicotine is known to have rewarding properties, which require the activation of VTA DA neurons (Durand-de Cuttoli et al., 2018; Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013). However, nicotine can also induce negative outcomes such as anxiety-like behaviors and stress-induced depressive-like states (Kutlu and Gould, 2015; Morel et al., 2018; Picciotto and Mineur, 2013), for which the underlying circuitry remains elusive. We hypothesized that the activation and inhibition of the different DA neuron pathways have distinct roles in nicotine-induced behavior. We first aimed to establish the role of the VTA in the anxiogenic effects of acute nicotine exposure. To this end, mice were placed in an elevated O maze (EOM) after an acute injection of either saline or nicotine (intraperitoneal [i.p.], 0.5 mg/kg, injected 1 min before the test), and we found that nicotine, but not saline, reduced exploration of the open arms over time (Figure 3A; see Figure S7A for individual data). Mice that received nicotine injections also showed fewer entries into the open arms (Figure S7A), and this anxiety-like phenotype was not related to a detectable effect of nicotine on locomotor activity in an open field (OF; Figure S7B). Next, to probe the specific role of the VTA in this anxiogenic effect, we locally infused nicotine into this brain region (Figure S7C) 1 min before the EOM test, using bilaterally implanted cannulas. As with i.p. injections, we found that the infusion of nicotine, but not saline, directly into the VTA decreased exploration of the EOM open arms over time (Figure 3B; see Figure S7D for individual data). Finally, we assessed the involvement of VTA $\beta 2$ subunit-containing nAChR ($\beta 2^*nAChR$) in the anxiogenic effect of nicotine, as nicotine-evoked responses have been shown to be mediated mainly by $\beta 2^*nAChR$ present on the soma of both DA and VTA GABA neurons (Tolu et al., 2013). *In vivo* juxtacellular recordings of VTA DA neurons in mutant mice lacking the $\beta 2$ subunit of nAChR ($\beta 2^{-/-}$ mice) demonstrated the absence of a response to nicotine injection (Figure 3C, left). Lentiviral re-expression of the $\beta 2$ subunit selectively in the VTA of $\beta 2^{-/-}$ mice ($\beta 2^{-/-}$ Vec mice) globally restored the response to nicotine injection (Figure 3C; Figure S8), allowing the reemergence of nicotine-induced increases or decreases in DA neuron firing (Figure 3C, left). Regarding behavior, $\beta 2^{-/-}$ mice were insensitive to the anxiogenic effect of nicotine injection in the EOM test, and lentiviral re-expression of $\beta 2$ in the VTA ($\beta 2^{-/-}$ Vec mice) restored this effect (Figure 3D; see Figure S7G for individual data). Together, these results indicate that the anxiogenic effect of an acute nicotine injection requires signaling through $\beta 2^*nAChR$ in the VTA but do not allow us to conclude whether the activation and/or inhibition of specific VTA DA neuron populations is required.

Manipulating the VTA-Amg DA pathway modulates basal and nicotine-induced anxiety

Ideally, dissociating whether nicotine-evoked activation or inhibition of VTA DA neurons is necessary for the behavioral effects of nicotine would require to isolate these responses in DA neurons, as well as in VTA GABA neurons, which also express nAChR (Grieder et al., 2019; Tolu et al., 2013). However, because nicotine-induced activation and inhibition of DA neurons are concomitant and inextricably linked to one another (as nicotine cannot directly inhibit neurons), and because the responses of VTA DA and GABA neurons to nicotine are also tightly linked

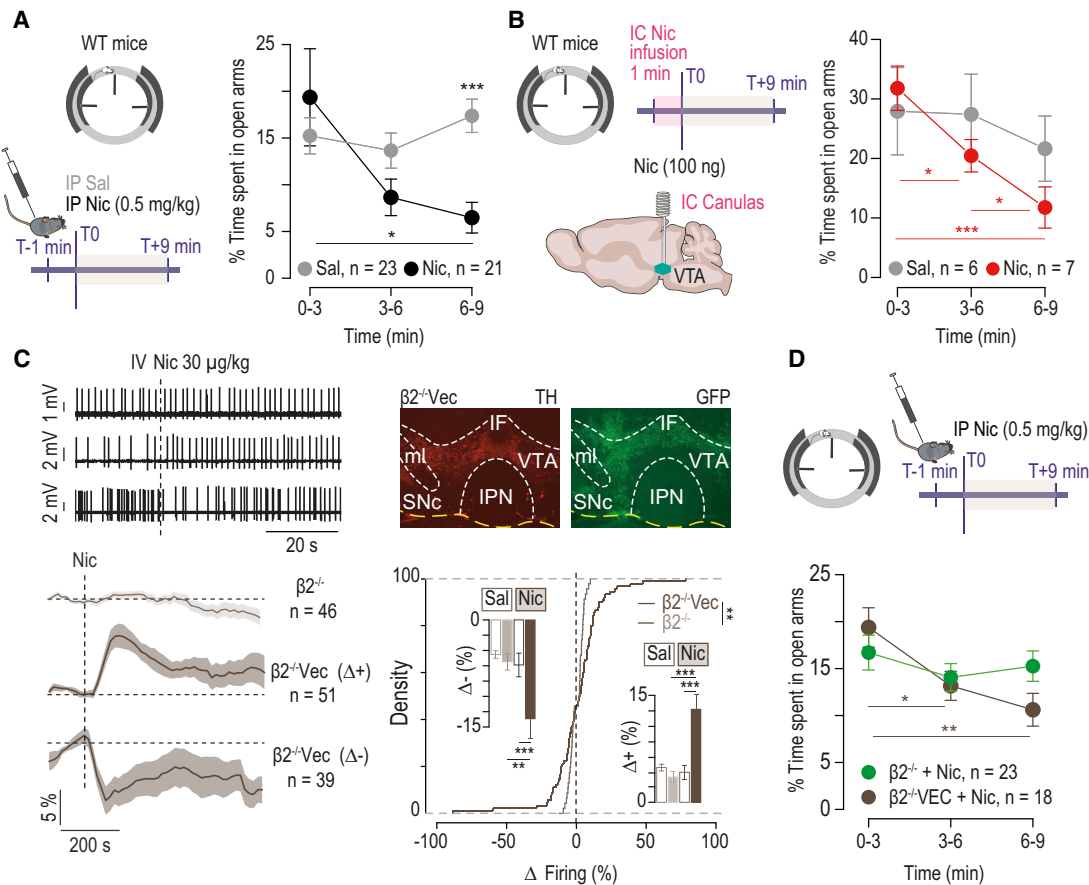


Figure 3. $\beta 2$ -subunit-containing nAChRs mediate VTA DA neuron responses to nicotine injection and nicotine-induced anxiety-like behavior

(A) Nicotine (Nic; 0.5 mg/kg) or saline (Sal) was injected intraperitoneally (i.p.) 1 min before the 9 min elevated O maze (EOM) test. Nic injection in a group of wild-type (WT) mice ($n = 21$) decreased the time they spent in the open arms of the EOM compared with the group injected with Sal ($n = 23$) (two-way repeated-measures [RM] ANOVA: treatment $\times$ time interaction, $F_{[2, 84]} = 5.37$, $^{**}p = 0.006$; main effect of time, $F_{[2, 84]} = 3.84$, $^{*}p = 0.025$; post hoc Wilcoxon test with Bonferroni corrections: $^{*}p = 0.03$ for 3 versus 9 min, $p = 0.1$ for 3 versus 6 min, $p = 0.2$ for 6 versus 9 min; post hoc Wilcoxon test: Sal versus Nic at 9 min, $^{***}p < 0.001$).

(B) Mice implanted with intracranial (IC) bilateral guide cannulas were injected either with Sal or with Nic (100 ng in 100 nL infusion) over 1 min before the 9 min EOM test. The Nic-injected mice ($n = 7$) spent less time in the open arms over time, but not the control mice ($n = 6$) (two-way RM ANOVA: treatment $\times$ time interaction, $F_{[2, 22]} = 9.66$, $^{***}p < 0.001$; main effect of time, $^{***}p < 0.001$; post hoc Student's t test with Bonferroni corrections: $^{***}p < 0.001$ for 3 versus 9 min, $^{*}p = 0.025$ for 3 versus 6 min, $^{*}p = 0.02$ for 6 versus 9 min; post hoc Student's t test: Sal versus Nic at 9 min, $p = 0.054$).

(C) Top left: representative juxtacellular recording traces of VTA DA neurons in mice lacking the $\beta 2$ nAChR subunit ($\beta 2^{-/-}$) and in $\beta 2^{-/-}$ -vectorized mice, in which the $\beta 2$ subunit has been virally re-expressed together with a GFP marker in the VTA ($\beta 2^{-/-}$ Vec). Bottom left: individual and mean responses (expressed as percentage of firing frequency variation) indicate that there were no Nic-evoked responses in VTA DA neurons of $\beta 2^{-/-}$ mice ($n = 46$ cells from 12 mice) and that both Nic-evoked activation ($n = 51$ cells from 18 mice) and inhibition ($n = 39$ cells from 19 mice) of VTA DA neurons were restored in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice. Top right: immunofluorescence for TH and GFP on $\beta 2^{-/-}$ Vec mice. Bottom right: cumulative distribution of Nic-evoked response amplitude of VTA DA neurons in $\beta 2^{-/-}$ mice ($n = 46$ cells from 12 mice; gray) and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice ($n = 90$ cells from 24 mice; black) (Kolmogorov-Smirnov test, $^{**}p = 0.008$). Bar plots show the maximum firing variation induced by Nic (filled bars) and saline (unfilled bars) in the two groups. Nic injection did not alter the firing frequency of VTA DA neurons in $\beta 2^{-/-}$ mice, but it induced a significant increase (mean 12.45 ± 13.37) or decrease (mean -13.16 ± 16.31) in the firing frequency of VTA DA neurons in $\beta 2$ Vec mice compared with saline ($^{***}p < 0.001$, $^{***}p < 0.001$ or $^{***}p < 0.001$, $^{**}p = 0.005$; Wilcoxon paired test with Bonferroni corrections).

(D) EOM test after i.p. Nic injection (0.5 mg/kg) in a control group of $\beta 2^{-/-}$ mice, some of which were sham-transduced with GFP in the VTA (see STAR Methods; $\beta 2^{-/-}$, $n = 23$) and in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice ($n = 18$). Re-expression of $\beta 2$ subunit in the VTA ($\beta 2^{-/-}$ Vec) restored the nicotine-evoked anxiogenic effects in the EOM test, which was absent in the $\beta 2^{-/-}$ mice (two-way RM ANOVA: treatment $\times$ time interaction, $F_{[2, 78]} = 3.43$, $^{*}p = 0.04$; main time effect, $F_{[2, 78]} = 6.87$, $^{**}p = 0.002$; post hoc Student's t test with Bonferroni corrections: $^{*}p = 0.003$ for 3 versus 9 min, $^{*}p = 0.03$ for 3 versus 6 min, $p = 0.2$ for 6 versus 9 min; post hoc Student's t test: $\beta 2^{-/-}$ and $\beta 2^{-/-}$ -GFP versus $\beta 2^{-/-}$ Vec mice at 9 min, $p = 0.06$). Results are plotted as mean $\pm$ S.E.M.

(Tolu et al., 2013), we decided to manipulate the two populations of DA neurons independently, using optogenetics. DAT-Cre mice expressing CatCh, Jaws (Figure S9), or YFP with no opsin (Figures S10A and S10B) were implanted in the BLA (Fig-

ure S10C) or in the NAcLSh (Figure S10D) to restrict the effects of the optogenetic stimulation to DA terminals within that region.

We first examined the effect of optogenetic manipulations of DA terminals in the amygdala. Compared with YFP

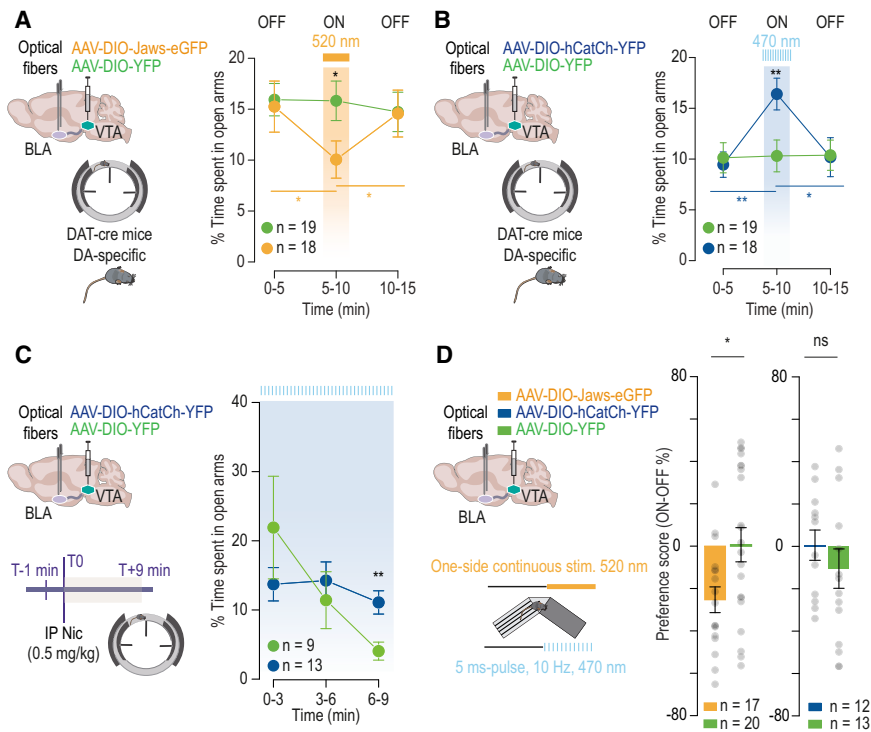


Figure 4. Inhibition of BLA-projecting DA neurons drives anxiety-like behavior but not place preference

(A) Left: AAVs for Cre-dependent expression of Jaws (orange; n = 18) or YFP (green; n = 19) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the BLA. Right: percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated continuously at 520 nm over a 5 min period (ON) in the BLA (two-way RM ANOVA: time $\times$ opsin interaction, $F_{[2, 70]} = 3.32$, $p = 0.04$; post hoc Student's t test for Jaws versus YFP mice: $p = 0.04$ for ON; post hoc Student's t test with Bonferroni corrections for Jaws mice: $p = 0.01$ for 5 versus 10 min, $p = 0.02$ for 10 versus 15 min).

(B) Left: AAVs for Cre-dependent expression of CatCh (blue; n = 18) or YFP (green; n = 19) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the BLA. Right: percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated continuously at 470 nm over a 5 min period (ON) at 10 Hz, 5 ms pulses in the BLA (two-way RM ANOVA: main effect of time, $F_{[2, 70]} = 4.41$, $p = 0.02$; time $\times$ opsin interaction, $F_{[2, 70]} = 4.43$, $p = 0.015$; post hoc Student's t test for CatCh versus YFP mice: $p = 0.009$ for ON; post hoc Student's t test with Bonferroni corrections for CatCh mice: $p = 0.001$ for 5 versus 10 min; $p = 0.01$ for 10 versus 15 min).

(C) Left: AAVs for Cre-dependent expression of

controls, photo-inhibiting DA neuron terminals in the BLA of Jaws-expressing mice reduced the percentage of time spent in the open arms of the EOM (Figure 4A; see Figure S11A for individual data). There were also no detectable effects of the light stimulation on the number of entries in the open arms (Figures S11A and S11B) or on locomotor activity (Figure S11C). Conversely, photo-activating DA terminals in the BLA of CatCh-expressing mice increased the percentage of time spent in the open arms of the EOM in comparison with mice expressing YFP (Figure 4B; see Figure S11B for individual data). Moreover, we also noticed that the position of the animal at the onset of the stimulation did not affect any of the behavior observed in the EOM (Figures S11A and S11B). To determine whether the anxiogenic effect observed during inhibition of DA neuron terminals in the BLA was specific to the BLA nucleus, we used another group of wild-type (WT) mice injected with either Jaws or GFP in the VTA and implanted bilateral optical fibers either in the BLA or in the CeA (Figures S12A and S12B). We found that optogenetically inhibiting VTA neuron terminals in Jaws-expressing WT mice decreased the percentage of time spent in the open arms of the EOM when optical fibers were implanted in the BLA, but not when they were implanted in the CeA (Figures S12C and S12D). There was not a detectable effect of stimulation on lo-

comotor activity in an OF (Figures S12E and S12F). We next asked whether optogenetically activating the terminals of BLA-projecting VTA DA neurons could prevent the anxiogenic effect of nicotine injection. DAT-Cre mice expressing CatCh or YFP only in the VTA received an i.p. injection of nicotine 1 min before the EOM test and received light stimulation in the BLA throughout the 9 min test. Indeed, we found that the light-evoked activation of BLA terminals of DA neurons during the EOM test abolished the anxiogenic effect of the nicotine injection, as the percentage of time spent by CatCh-expressing mice in the EOM open arms did not decrease during the test and was significantly higher in these mice than in YFP-expressing controls during the last 3 min period of the test (Figure 4C). We next explored the behavioral outcome of manipulating the terminals of BLA-projecting VTA DA neurons on motivational valence by using a real-time place preference (RTTPP) paradigm. Photo-inhibiting DA terminals in the BLA resulted in a significant avoidance for the compartment where animals were photo-stimulated, in keeping with our previous findings that inhibition of this pathway produces an anxiogenic effect in the EOM test, while photo-activating these terminals had no behavioral effect (Figure 4D). Inhibition of BLA-projecting VTA DA neurons therefore plays a central role in mediating the anxiogenic effect of nicotine.

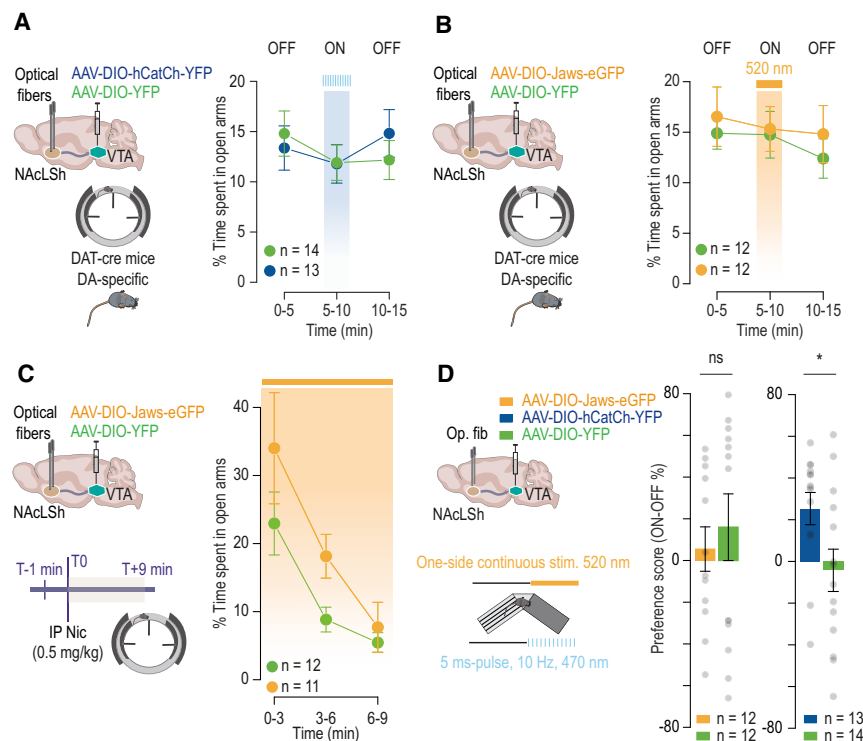


Figure 5. Activation of NAcLSh-projecting VTA DA neurons drives real-time place preference behavior but has no effect on anxiety-like behavior

(A) Left: AAVs for Cre-dependent expression of CatCh (blue; $n = 13$) or YFP (green; $n = 14$) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the NAcLSh. Right: percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated at 470 nm over a 5 min period (ON) at 10 Hz, 5 ms pulses in the NAcLSh (two-way RM ANOVA: no time or opsin effect or interaction, $F_{[2, 50]} = 0.8$, $p = 0.5$).

(B) Left: AAVs for Cre-dependent expression of Jaws (orange; $n = 12$) or YFP (green; $n = 12$) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the NAcLSh. Right: percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated continuously at 520 nm over a 5 min period (ON) in the NAcLSh (two-way RM ANOVA: no time or opsin effect or interaction, $F_{[2, 44]} = 0.16$, $p = 0.8$).

(C) Left: AAVs for Cre-dependent expression of Jaws (orange; $n = 11$) or YFP (green; $n = 12$) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the NAcLSh. Nicotine (Nic; 0.5 mg/kg) was injected intraperitoneally (i.p.) 1 min before the 9 min elevated O maze (EOM) test. Right: Percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated continuously at 470 nm over a 5 min period (ON) in the NAcLSh (two-way RM ANOVA: no time or opsin effect or interaction, $F_{[2, 42]} = 12.6$, $***p < 0.001$; opsin effect, $F_{[1, 21]} = 5.08$, $*p = 0.03$; no interaction, $F_{[2, 42]} = 0.55$, $p = 0.6$).

in the NAcLSh throughout the test after i.p. nicotine injection (two-way RM ANOVA: main time effect, $F_{[2, 42]} = 12.6$, $***p < 0.001$; opsin effect, $F_{[1, 21]} = 5.08$, $*p = 0.03$; no interaction, $F_{[2, 42]} = 0.55$, $p = 0.6$).

(D) Preference score in a 20 min RTPP test defined by the percentage of time spent in the compartment in which animals are photo-stimulated compared with the compartment where they are not (ON-OFF). Mice with optical inhibition of the VTA-NAcLSh pathway (orange; $n = 12$) did not display any difference compared with the control mice (YFP; green, $n = 12$) (Student's t test, $p = 0.5$). Optical activation of the VTA-NAcLSh pathway (blue; $n = 13$) induced online place preference compared with the control mice (YFP, green; $n = 14$) (Student's t test, $*p = 0.04$). Results are plotted as mean $\pm$ S.E.M.

The VTA-Nac DA pathway is not involved in nicotine-induced anxiety-like behavior

DA in the Nac has been suggested to be involved in the modulation of anxiety-like behavior (Radke and Gewirtz, 2012; Zarrindast et al., 2012). We thus next assessed whether NAc-projecting neurons also participate in the anxiogenic effects of acute nicotine administration. We examined the behavioral outcome of optogenetic manipulations of DA neuron terminals in the Nac during the EOM test. Light-evoked activation (CatCh-expressing mice; Figure 5A) or inhibition (Jaws-expressing mice; Figure 5B) of DA neuron terminals in the NAcLSh had no effect on the time spent in the open arms of the EOM (see Figures S13A and S13B for individual data). There was also no detectable effect of the light stimulation on the number of entries in the open arms (Figures S13A and S13B) or on locomotor activity (Figure S13C). Moreover, the position of the animal at the onset of the stimulation did not reveal any impact on the behavior observed in the EOM (Figures S13A and S13B). Selectively inhibiting NAcLSh DA terminals using Jaws produced a slight change in basal anxiety levels but, more important, did not attenuate the anxiogenic effect of nicotine in the EOM test, as the drug reduced the exploration of the open arms over time in both control and opsin group (Figure 5C). NAcLSh-projecting VTA DA neurons are therefore not involved in mediating the anxiogenic effect of nicotine. In contrast, activation of DA neuron terminals

in the NAcLSh induced significant place preference in the RTPP protocol, indicating that stimulating this pathway is rewarding (Figure 5D). Because medial and lateral Nac areas have different functional roles (de Jong et al., 2019), we further investigated the effect of optogenetic modulation of VTA neuron terminals in the NAcMSh in a separate group of WT mice (Figure S14A). Stimulating these terminals produced an increased number of entries and time spent in the EOM open arms, but this likely results from an increase of locomotor activity, as the distance traveled in an OF was likewise increased (Figures S14B and S14C). Inhibiting these terminals produced a slight decrease in basal anxiety levels but did not induce behavioral change in the EOM test nor prevented the reduction of time spent in open arms over time induced by nicotine (Figures S14B and S14D). Finally, we did not observe a significant effect of activating or inhibiting these terminals on the place preference score in the RTPP (Figure S14E). Our results thus demonstrate that NAcMSh and NAcLSh projections of VTA DA neurons are not involved in the nicotine-induced anxiety-like behavior observed in the EOM test.

DISCUSSION

The VTA has long been perceived as a structure that broadly disseminates DA in the brain, with the different time courses of DA

release providing a phenomenological account for the functional involvement of DA neurons in different behavioral processes (Schultz, 2007). This temporal account of DA neuron function was gradually replaced or extended by the notion that the DA system, in particular the VTA, is divided into subpopulations of DA neurons, each associated with distinct appetitive, aversive, or attentional behaviors (Lammel et al., 2012). However, we are only beginning to appreciate how the functional activation and inhibition dynamics within these subpopulations affect behavioral processes. Here, we show that (1) activation and inhibition of VTA DA neurons appear concurrently as a consequence of nicotine injection, and (2) they correspond to two anatomically and functionally distinct circuits, which mediate contrasting behavioral effects. Our results argue for a functional dissociation of VTA-to-Amg and VTA-to-NAc DA pathways: inhibition of Amg-projecting VTA DA neurons is anxiogenic, while activation of NAcSh-projecting VTA DA neurons is rewarding. We cannot completely rule out the possibility that optogenetic excitation of axon terminals produces backpropagation of action potentials and activation of other pathways. However, as the VTA projections to the NAc and Amg are anatomically segregated (i.e., neurons do not send collaterals to these two regions; Beier et al., 2015), it is unlikely that this would directly affect the functional dissociation between the two pathways studied in this work. Furthermore, the fact that photoactivation of NAcSh terminals is reinforcing, but not those of the NAcMSh or BLA, argues against this possibility.

VTA DA neurons are known to be heterogeneous in their axonal projections, electrophysiological properties, and in several molecular features. For example, they show striking differences in their expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN), of the DA transporter (DAT), of the DA receptor D2R, and vesicular glutamate transporters (VGLUTs) (Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008; Morales and Margolis, 2017). However, the functional consequences of this heterogeneity on behavior remain poorly understood. Here, we demonstrate that nicotine injection evokes opposite responses in two distinct subpopulations of VTA DA neurons: a large majority of those with axons projecting to the NAc are activated, while a large majority of those with axons projecting to the Amg are inhibited. In addition to their functional and anatomical segregation, we found that these subpopulations display different excitabilities *in vitro* and different bursting activities *in vivo*. However, they cannot be distinguished solely on the basis of their spontaneous firing pattern in anesthetized mice. Are there specific intrinsic differences between these two neuronal populations, besides their projection sites, that would underlie their opposing responses to nicotine injection? NAcMSh-projecting VTA DA neurons exhibit smaller I_h currents than BLA-projecting VTA DA neurons, but both have similar input resistances and capacitances (Ford et al., 2006), and NAc core- and BLA-projecting neurons have similar expressions of DAT, D2R, and TH (Su et al., 2019). We have previously reported that nicotine-activated and nicotine-inhibited VTA DA cells react similarly to D2R agonist or antagonist injection *in vivo*, in agreement with similar D2R expression levels in the two neuronal populations (Eddine et al., 2015). Finally, there is no clear variation in nicotine-evoked currents in Amg-projecting or NAc-projecting

VTA neurons, suggesting that nAChR expression does not differ markedly between these populations.

Although intrinsic differences may still exist, it is also possible that the emergence of either nicotine-evoked activation or inhibition of these neurons by nicotine arises from network dynamics. Nicotine's primary action is to activate nAChR, which are well-characterized ligand-gated cation channels and cause neuronal depolarization. Within the VTA, nicotine directly activates both DA and GABA neurons, which both express nAChR (Klink et al., 2001; Tolu et al., 2013). In particular, $\beta 2^*$ nAChR of the VTA neurons are key mediators of the reinforcement effects of nicotine, as previously shown by re-expressing the $\beta 2$ subunit of nAChR locally in the VTA of $\beta 2^{-/-}$ mice (Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013) or by rendering $\beta 2^*$ nAChR insensitive to nicotine using light (Durand-de Cuttoli et al., 2018). Here, we show that $\beta 2^*$ nAChR of VTA neurons are also required to evoke, after systemic nicotine injection, the anxiogenic properties of nicotine as well as the inhibition of the subpopulation of DA neurons projecting to Amg. Therefore, nicotine acting through $\beta 2^*$ nAChR activates VTA GABAergic interneurons and DA neurons projecting to the NAc, while concurrently inhibiting DA neurons projecting to the Amg. The inhibitory effect of nicotine may be mediated by inhibition through local DA release (Eddine et al., 2015), although no difference in D2R-mediated inhibitory postsynaptic currents or in DA reuptake between NAcMSh-projecting and BLA-projecting DA neurons has been reported (Ford et al., 2006). Alternatively, it could involve either local (interneurons) or long-range GABAergic inhibition of the Amg-projecting DA neuron subpopulation primarily, which is compatible with the recent demonstration of distinct inhibitory networks resulting in specific feedback loops between VTA and NAc sub-regions (Yang et al., 2018).

Nicotine is highly reinforcing, but also produces aversive and anxiogenic effects at various doses (Balerio et al., 2006; Kutlu and Gould, 2015; Picciotto and Mineur, 2013; Wolfman et al., 2018). Importantly, as the doses of nicotine used in this study are known to be rewarding in different paradigms in mice, an effect attributable to VTA DA neuron activation (Durand-de Cuttoli et al., 2018; Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013), we demonstrate that the same dose of nicotine can concurrently induce a rewarding effect by activating the VTA to NAc DA pathway, and a "negative" emotional state by inhibiting the VTA to Amg DA pathway. Yet we find that neither the activating effects nor the inhibiting effects of nicotine injection on VTA DA neurons can override each other; that is to say that both types of responses occur at each dose of nicotine along the dose-response curve, with neither response taking precedence at any specific dose. Thus, depending on the context, the exact same dose of nicotine can trigger anxiety or reinforcement. Aversion for high doses of nicotine and anxiety associated with nicotine withdrawal have been attributed to nicotinic and glutamatergic signaling in the habenulo-interpeduncular axis (Fowler et al., 2011; Frahm et al., 2011; Molas et al., 2017; Zhao-Shea et al., 2013). There is also evidence that nAChR of neurons located in the Amg modulate depressive-like states (Mineur et al., 2016). However, a role for DA in aversion to nicotine has also been proposed. D1R and D2R antagonists prevent conditioned-place aversion induced by an acute high-dose nicotine injection

(Grieder et al., 2012), and $\beta 2^*$ nAChR have been shown to be necessary for both the aversive and rewarding effects of nicotine by a strategy of $\beta 2$ subunit re-expression in DA and GABAergic neurons of the VTA in $\beta 2^{-/-}$ mice (Grieder et al., 2019). However, the mechanism underlying these opposite effects of the drug has not yet been established. Here, we show that activation of $\beta 2^*$ nAChR of VTA neurons is necessary for nicotine to inhibit Amg-projecting DA neurons and induce anxiety-like behavior. This indicates that VTA signaling is critically involved in the acute anxiogenic effect of nicotine and suggests that it could also mediate aversion to nicotine. Our experiments also demonstrate that inhibition of the VTA to Amg DA pathway allows the expression of anxiety-like behavior and that a reduction of this inhibition relieves nicotine-induced anxiety-like behavior. These experiments strongly suggest a driving role for the inhibition of this pathway in nicotine-induced anxiety behavior, yet they do not exclude the possibility that other pathways also transmit the anxiogenic effect of nicotine.

Our findings emphasize the complex role of the DA system in not only positive but also negative motivational processes, proposing a more nuanced view of the effects of reinforcing doses of nicotine on VTA DA neurons. Opposing responses of DA neurons to drug exposure have also been observed with cocaine (Mejias-Aponte et al., 2015), ethanol (Doyon et al., 2013), and morphine (Margolis et al., 2014). Notably, the inhibition of VTA DA neurons induced by opioids differs according to their NAc or BLA projection zone (Ford et al., 2006), suggesting that the behavioral effects of opioid drugs could also result from a specific pattern of inhibition in these two pathways. As our results demonstrate that both rewarding and anxiogenic messages occur simultaneously upon nicotine exposure and are conveyed by distinct subpopulations of VTA DA neurons, the question then arises as to how the concurrent engagement of two circuits with opposing messages could compete to produce nicotine reinforcement and whether an imbalance between the two could lead to addiction. Indeed, this question may prove critical when it comes to medical strategies aimed at smoking cessation. Although the optogenetic strategies used in this study are well suited to mimic the individual effects of a drug that also produces strong and synchronized neuronal activity, the translational value of these effects is perhaps not to be sought in the specific activation or inhibition of a given neuronal pathway but rather in the functional imbalance this creates between the target structures of VTA neurons. Nevertheless, a detailed understanding of the multiple pathways engaged in nicotine-evoked responses and of their respective behavioral contributions can still help us understand the mechanisms leading to nicotine addiction. In this respect, the activation and inhibition processes that appear in VTA DA neurons as a consequence of systemic nicotine injection call for further mechanistic studies, as they correspond to discrete neuronal circuits and mediate distinct behavioral effects, both of which are relevant to the understanding of addiction.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **RESOURCE AVAILABILITY**
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
- **METHOD DETAILS**
 - Viral production
 - Drugs
 - Stereotaxic surgeries
 - Retrobead injection
 - Intracranial infusion
 - Virus injection and optogenetic experiments
 - Fiber photometry experiments
 - *In vivo* electrophysiology on anesthetized mice
 - *In vivo* electrophysiology on freely moving animals
 - *Ex vivo* patch-clamp recordings
 - Immunostaining
 - Image acquisition
 - Elevated O-maze test
 - Real-time place preference test
 - Open field paradigm
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Measurements of neuronal activity
 - Method for classifying VTA DA neurons subpopulations in response to nicotine injection
 - Quantification of neuronal responses to nicotine injection
 - Quantification of juxtacellularly labeled neurons
 - Quantification of fluorescence
 - Statistics: figure by figure

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to France Lam and the imaging platform facility (Institut de Biologie Paris-Seine [IBPS]), the animal facilities (IBPS), Victor Gorgievski for behavioral data acquisition, and Jérémie Naudé for technical and statistical advice. We are grateful to the Yulong Li laboratory (Peking University) for providing us with GRAB_{DA} sensor plasmids. We are grateful to Mélissa Desrosiers, Camille Robert, and the AAV production facility of Paris Vision Institute for viral production and purification. This work was supported by Centre national de la recherche scientifique (CNRS; UMR 8246), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm; U1130), Fondation pour la recherche médicale (FRM; DEQ2013326488 to P.F., FDT201904008060 to S.M., ECO201806006688 to J.J., and SPF202005011922 to C.S.), French National Cancer Institute grants TABAC-16-022 and TABAC-19-020 (to P.F.), French state funds managed by Agence Nationale de la Recherche (ANR-16 Nicostress to P.F., ANR-19 Vampire to F.M.), and LabEx Bio-Psy (to P.F. and a doctoral fellowship to C.N.). L.M.R. was supported by a National Institute on Drug Abuse (NIDA)-Inserm Postdoctoral Drug Abuse Research Fellowship. P.F. and U.M. are members of LabEx Bio-Psy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.N., F.M., and P.F. designed the study. C.N., F.M., and P.F. analyzed the data. C.N. and F.M. performed *in vivo* electrophysiological recordings. L.M.R., S.T., and S.V. contributed to *in vivo* electrophysiological recordings.

T.L.B. contributed to *in vivo* electrophysiological data analyses. S.M. designed, performed, and analyzed *ex vivo* patch-clamp recordings. C.N. performed stereotaxic injections (with contributions from S.M. and T.L.B.), fiber, cannula, and catheter implantations, and behavioral experiments. C.N., S.M., T.L.B., I.C., and F.M. performed immunostaining experiments. M.C., C.S., and S.D. designed and performed tetrode implantation and signal analysis for *in vivo* recordings on freely moving animals. S.M., T.L.B., I.C., M.C., J.J., C.S., and B.H. contributed to behavioral experiments. J.J. performed signal treatment and analysis for fiber photometry experiments. R.D.C. and A.M. contributed to optogenetic experiments. D.D., S.P., and U.M. provided viruses. U.M. provided ACNB2-knockout (KO) mice. J.-F.F. and V.D.-G. contributed to behavioral experiments and to design protocols. C.N., L.M.R., J.P.H., A.M., F.M., and P.F. wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: August 27, 2020

Revised: March 27, 2021

Accepted: June 9, 2021

Published: July 8, 2021

REFERENCES

- Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., and Baiker, A. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 18–28.
- Balerio, G.N., Aso, E., and Maldonado, R. (2006). Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 504–513.
- Beier, K.T., Steinberg, E.E., DeLoach, K.E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X.J., Kremer, E.J., Malenka, R.C., and Luo, L. (2015). Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *Cell* 162, 622–634.
- Beier, K.T., Gao, X.J., Xie, S., DeLoach, K.E., Malenka, R.C., and Luo, L. (2019). Topological organization of ventral tegmental area connectivity revealed by viral-genetic dissection of input-output relations. *Cell Rep.* 26, 159–167.e6.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 4894–4899.
- Changeux, J.-P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 389–401.
- Changeux, J.-P., Bertrand, D., Corringer, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Léna, C., Le Novère, N., Marubio, L., Picciotto, M., and Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 198–216.
- Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A., and Samulski, R.J. (2007). Production of recombinant adeno-associated viral vectors. *Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 12*, Unit 12.9.
- Chuong, A.S., Miri, M.L., Busskamp, V., Matthews, G.A.C., Acker, L.C., Sorensen, A.T., Young, A., Klapoetke, N.C., Henninger, M.A., Kodandaramaiah, S.B., et al. (2014). Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat. Neurosci.* 17, 1123–1129.
- de Jong, J.W., Afjei, S.A., Pollak Dorocic, I., Peck, J.R., Liu, C., Kim, C.K., Tian, L., Deisseroth, K., and Lammel, S. (2019). A neural circuit mechanism for encoding aversive stimuli in the mesolimbic dopamine system. *Neuron* 101, 133–151.e7.
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 5274–5278.
- Doyon, W.M., Dong, Y., Ostroumov, A., Thomas, A.M., Zhang, T.A., and Dani, J.A. (2013). Nicotine decreases ethanol-induced dopamine signaling and increases self-administration via stress hormones. *Neuron* 79, 530–540.
- Durand-de Cuttoli, R., Mondoloni, S., Marti, F., Lemoine, D., Nguyen, C., Naudé, J., d'Izarny-Gargas, T., Pons, S., Maskos, U., Trauner, D., et al. (2018). Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. *eLife* 7, 15991.
- Eddine, R., Valverde, S., Tolu, S., Dautan, D., Hay, A., Morel, C., Cui, Y., Lambolez, B., Venance, L., Marti, F., and Faure, P. (2015). A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. *Sci. Rep.* 5, 8184.
- Ford, C.P., Mark, G.P., and Williams, J.T. (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J. Neurosci.* 26, 2788–2797.
- Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471, 597–601.
- Frahm, S., Šlimak, M.A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.-F., Tsetlin, V., et al. (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron* 70, 522–535.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci.* 4, 2877–2890.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.* 4, 2866–2876.
- Grenhoff, J., Aston-Jones, G., and Svensson, T.H. (1986). Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol. Scand.* 128, 351–358.
- Grieder, T.E., Sellings, L.H., Vargas-Perez, H., Ting-A-Kee, R., Siu, E.C., Tyndale, R.F., and van der Kooy, D. (2010). Dopaminergic signaling mediates the motivational response underlying the opponent process to chronic but not acute nicotine. *Neuropsychopharmacology* 35, 943–954.
- Grieder, T.E., George, O., Tan, H., George, S.R., Le Foll, B., Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2012). Phasic D1 and tonic D2 dopamine receptor signaling double dissociate the motivational effects of acute nicotine and chronic nicotine withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 3101–3106.
- Grieder, T.E., Besson, M., Maal-Bared, G., Pons, S., Maskos, U., and van der Kooy, D. (2019). $\beta 2^*$ nAChRs on VTA dopamine and GABA neurons separately mediate nicotine aversion and reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 116, 25968–25973.
- Khabou, H., Garita-Hernandez, M., Chaffiol, A., Reichman, S., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Bertin, S., Forster, V., Desrosiers, M., Winckler, C., et al. (2018). Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* 3, D358.
- Kleinlogel, S., Feldbauer, K., Dempski, R.E., Fotis, H., Wood, P.G., Bamann, C., and Bamberg, E. (2011). Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat. Neurosci.* 14, 513–518.
- Klink, R., de Kerchove d'Exaerde, A., Zoli, M., and Changeux, J.P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J. Neurosci.* 21, 1452–1463.
- Kutlu, M.G., and Gould, T.J. (2015). Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. *Biochem. Pharmacol.* 97, 498–511.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57, 760–773.
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217.
- Luscher, C. (2016). The emergence of a circuit model for addiction. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 257–276.

- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T.H., Changeux, J.-P., and Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* 50, 911–921.
- Mansvelder, H.D., and McGehee, D.S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27, 349–357.
- Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. *J. Neurosci.* 28, 8908–8913.
- Margolis, E.B., Hjelmstad, G.O., Fujita, W., and Fields, H.L. (2014). Direct bidirectional μ -opioid control of midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* 34, 14707–14716.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103–107.
- Mejias-Aponte, C.A., Ye, C., Bonci, A., Kiyatkin, E.A., and Morales, M. (2015). A subpopulation of neurochemically-identified ventral tegmental area dopamine neurons is excited by intravenous cocaine. *J. Neurosci.* 35, 1965–1978.
- Mineur, Y.S., Fote, G.M., Blakeman, S., Cahuzac, E.L.M., Newbold, S.A., and Picciotto, M.R. (2016). Multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the mouse amygdala regulate affective behaviors and response to social stress. *Neuropsychopharmacology* 41, 1579–1587.
- Molas, S., DeGroot, S.R., Zhao-Shea, R., and Tapper, A.R. (2017). Anxiety and nicotine dependence: emerging role of the habenulo-interpeduncular axis. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 169–180.
- Morales, M., and Margolis, E.B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 73–85.
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y.A., Marti, F., Lambolez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., and Faure, P. (2014). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol. Psychiatry* 19, 930–936.
- Morel, C., Fernandez, S.P., Pantouli, F., Meye, F.J., Marti, F., Tolu, S., Parnaudeau, S., Marie, H., Tronche, F., Maskos, U., et al. (2018). Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. *Mol. Psychiatry* 23, 1597–1605.
- Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., and Lüscher, C. (2015). Sufficiency of mesolimbic dopamine neuron stimulation for the progression to addiction. *Neuron* 88, 1054–1066.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Gulf Professional Publishing).
- Picciotto, M.R., and Mineur, Y.S. (2013). Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. *Neuropharmacology* 76, 545–553.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K., and Changeux, J.P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391, 173–177.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* 65, 113–136.
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., and Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat. Neurosci.* 21, 1260–1271.
- Radke, A.K., and Gewirtz, J.C. (2012). Increased dopamine receptor activity in the nucleus accumbens shell ameliorates anxiety during drug withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 37, 2405–2415.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Su, M., Li, L., Wang, J., Sun, H., Zhang, L., Zhao, C., Xie, Y., Gamper, N., Du, X., and Zhang, H. (2019). Kv7.4 channel contribute to projection-specific auto-inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 557.
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S.F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., et al. (2018). A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174, 481–496.e19.
- Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Tan, K., Feng, J., et al. (2020). New and improved GRAB fluorescent sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.28.013722>.
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., et al. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol. Psychiatry* 18, 382–393.
- Turiault, M., Parnaudeau, S., Milet, A., Parlato, R., Rouzeau, J.-D., Lazar, M., and Tronche, F. (2007). Analysis of dopamine transporter gene expression pattern—generation of DAT-iCre transgenic mice. *FEBS J.* 274, 3568–3577.
- Ungless, M.A., and Grace, A.A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 35, 422–430.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S.K., Vamanrao, A., and Uchida, N. (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74, 858–873.
- Wolfman, S.L., Gill, D.F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J.G., Bruchas, M.R., and McGehee, D.S. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nat. Commun.* 9, 2710.
- Yang, H., de Jong, J.W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H.S., and Lammel, S. (2018). Nucleus accumbens subnuclei regulate motivated behavior via direct inhibition and disinhibition of VTA dopamine subpopulations. *Neuron* 97, 434–449.e4.
- Zarrindast, M.R., Khalifeh, S., Rezayof, A., Rostami, P., Aghamohammadi Sereshki, A., and Zahmatkesh, M. (2012). Involvement of rat dopaminergic system of nucleus accumbens in nicotine-induced anxiogenic-like behaviors. *Brain Res.* 1460, 25–32.
- Zhao-Shea, R., Liu, L., Soll, L.G., Improgo, M.R., Meyers, E.E., McIntosh, J.M., Grady, S.R., Marks, M.J., Gardner, P.D., and Tapper, A.R. (2011). Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 36, 1021–1032.
- Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P.D., and Tapper, A.R. (2013). Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. *Curr. Biol.* 23, 2327–2335.
- Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J.A., Rayport, S., and Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Methods* 143, 27–32.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-tyrosine Hydroxylase produced in mouse	Sigma-Aldrich	Cat# T1299; RRID:AB_477560
Anti-GFP produced in chicken	Aveslabs	Cat# GFP-1020; RRID:AB_10000240
Anti-rabbit Cy2-conjugated produced in donkey	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-225-152; RRID:AB_2340612
Anti-mouse Cy3-conjugated produced in donkey	Jackson ImmunoResearch	Cat# 715-165-150; RRID:AB_2340813
Anti-chicken Alexa488-conjugated	Jackson ImmunoResearch	Cat# 703-545-155; RRID:AB_2340375
AMCA-Streptavidin	Jackson ImmunoResearch	Cat# 016-150-084; RRID:AB_2337243
Bacterial and virus strains		
Lenti-pGK-B2-IRES-GFP	Maskos et al., 2005; https://doi.org/10.1038/nature03694 ; Provided by Institut Pasteur, Paris, France	Virus (Lentivirus)
Lenti-pGK-IRES-GFP	Maskos et al., 2005; https://doi.org/10.1038/nature03694 ; Provided by Institut Pasteur, Paris, France	Virus (Lentivirus)
pAAV.Ef1a-DIO.hCatCh.YFP	This paper: Provided by Institut de la vision, Paris France	plasmid
AAV5-EF1a-DIO-hCatCh-YFP	This paper: Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2	Adgene	65014 -Plasmid
AAV5-CAG-Flex-Jaws-eGFP	This paper: Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV-Ef1a-DIO-YFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Plasmid
AAV5-CAG-Flex-Jaws-eGFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV.hSyn.eGFP.WPRE.bGH	Adgene	105539-Plasmid
AAV5-Ef1a-DIO-YFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV-CAG-Jaws-KGC-GFP-ER2	Adgene	99233-Plasmid
AAV2-CAG-Jaws-KGC-GFP-ER2	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV-CAG-GFP	Adgene	83279-Plasmid
AAV2-7m8-CAG-GFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
pAAV-Ef1a-DIO-hChR2-YFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Plasmid
AAV9-Ef1a-DIO-hChR2-YFP	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-eYFP	Adgene	26973-AAV5
AAV5.hSyn.eGFP.WPRE.bGH	Adgene	105539-AAV5
AAV5-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2	Adgene	65014-AAV5
psAAV-hSyn-GRABDA2m	Sun et al., 2020; https://doi.org/10.1101/2020.03.28.013722	Plasmid
AAV1-hSyn-GRABDA2m	This paper, Provided by Institut de la vision, Paris France	Virus (AAV)
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
KCl	Sigma-Aldrich	P9333

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	S8282
MgCl ₂	Sigma-Aldrich	M2670
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	233506
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S6297
Sucrose	Sigma-Aldrich	S0389
Glucose	Sigma-Aldrich	49159
Kynurenic Acid	Sigma-Aldrich	K3375
Albumin, from bovine serum	Sigma-Aldrich	A4503
KGlu	Sigma-Aldrich	P1847
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
EGTA	Sigma-Aldrich	E3889
ATP	Sigma-Aldrich	A9187
GTP	Sigma-Aldrich	G8877
Biocytin	Sigma-Aldrich	B4261
Nicotine tartrate	Sigma-Aldrich	N5260
Glucose	Sigma-Aldrich	G8270
DPBS 10x	Life Technologies	14200-067
Neurobiotin Tracer	Vector laboratories	SP-1120
Prolong Gold Antifade Reagent	Invitrogen	P36930
Chloral Hydrate	Sigma-Aldrich	302-17-0
Sodium Acetate	Sigma-Aldrich	57654611
Quinpirole	Tocris	55397
Eticlopride	Tocris	57266

Experimental models: Organisms/strains

strain (mouse), strain background (<i>Mus musculus</i>) - males	Janvier Laboratories, France	C57BL/6j SC-C57J-M
strain (mouse), strain background (<i>Mus musculus</i>) - males	Maskos et al., 2005; https://doi.org/10.1038/374065a0	ACNB2 KO, maintained on a C57BL6/J background
strain (mouse), strain background (<i>Mus musculus</i>) - males	Turault et al., 2007; https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05886.x	DATicre, maintained on a C57BL6/J background

Software and algorithms

R Project for Statistical Computing	http://www.r-project.org/	RRID:SCR_001905
Fiji	https://fiji.sc	RRID:SCR_002285
PyCharm	CE version 2020.3.4 (Python 3.8)	RRID:SCR_018221
Adobe Illustrator 2020	Adobe	RRID:SCR_010279
Spike 2 Software	CED	RRID:SCR_000903
Spike sort 3D	5.6.3	Neuralynx acquisition
Spike extractor	2.5.0.0	Neuralynx acquisition
Cheetah software	version 3.01 2.5.4	Neuralynx acquisition
Doric Neuroscience Studio	Doric	RRID:SCR_018569
Clampfit (pClamp suite)	Molecular Devices	RRID:SCR_011323

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Philippe Faure (phfaure@gmail.com) or Fabio Marti (fabio.marti@upmc.fr).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

All the data are available from the corresponding authors upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Wild-type (WT) C57BL/6J (Janvier Labs, France), ACNB2 KO ($\beta 2^{-/-}$) and DAT^{ICRE} (DAT-Cre) male mice, weighing 25–35 g, were used in this study. $\beta 2^{-/-}$ mice were generated using standard homologous recombination procedures. Founders were backcrossed onto a C57BL/6J background for a least 20 generations and bred on site. DAT^{ICRE} mice were provided by François Tronche (IBPS Paris, France). They were bred on site and genotyped as described (Turiault et al., 2007).

Mice were kept in an animal facility where temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity were automatically monitored, and a circadian light-dark cycle of 12/12 hours was maintained. All experiments were performed on 8-to-16-week-old mice. All experiments were performed in accordance with the recommendations for animal experiments issued by the European Commission directives 219/1990, 220/1990 and 2010/63, and approved by Sorbonne University.

METHOD DETAILS

Viral production

AAV vectors were produced as previously described (Khabou et al., 2018) using the co-transfection method, and purified by iodixanol gradient ultracentrifugation (Choi et al., 2007). AAV vector stocks were titrated by quantitative PCR (qPCR) (Aurnhammer et al., 2012) using SYBR Green (Thermo Fischer Scientific). Lentiviruses were prepared as previously described (Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013), with a titer of either 380 ng of p24 protein per μL or 764 ng/ μL for the AChR $\beta 2$ -expressing vector, and 150 ng of p24 protein per μL or 361 ng per 2 μL for GFP-expressing vector.

Drugs

The nicotine (Nic) used for all experiments is a nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich, USA). For juxtacellular recordings, we performed an intravenous injection (IV) of Nic at a dose of 30 $\mu\text{g/kg}$ (4.16 mg/kg, free base) or saline solution (H_2O with 0.9% NaCl). For the behavioral test, in elevated O-maze (EOM) or open-field (OF), mice were injected intra-peritoneally (IP) with Nic at 0.5 mg/kg, 1-minute before the test. For intra-cranial (IC) experiments in EOM, saline solution or 100ng of Nic tartrate, in a volume of 100 nl, were infused over 1 minute before the beginning of the test. All solutions were prepared in the laboratory.

Stereotaxic surgeries

For virus and RB injections, intracranial cannulas, fibers, catheters and micro-drive implantations, mice were anesthetized with a gas mixture of oxygen (1 L/min) and 3% isoflurane (Vetflurane®, Virbac) for the induction of anesthesia, and then placed in a stereotaxic frame (David Kopf) maintained under anesthesia throughout the surgery at 1% isoflurane. A local anesthetic (100 μL Lurocaine®) was applied at the location of the scalp incision or the catheter implant before the procedure. At the end of the surgery, 0.1 mL of buprenorphine (Buprecare®, 1 mg/kg) was injected subcutaneously to prepare awakening.

Retrobead injection

Green fluorescent retrograde tracer, retrobeads (RB, LumaFluor Inc., Naples, FL), were injected (200 nL per site, 0.1 $\mu\text{L/min}$) in WT animals either in the NAc (NAc lateral shell NAcLSh: bregma 1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm; NAc medial shell NAcMSh: bregma 1.78 mm, lateral 0.45 mm, ventral 4.1 mm; NAc core: bregma 1.55 mm, lateral 1.0 mm, ventral 4.0 mm) or in the Amg (BLA: bregma –1.61 mm, lateral 3.18 mm, ventral 4.7 mm; CeA: bregma - 0.78 mm, lateral 2.3 mm, ventral 4.8 mm) with a 10 μL Hamilton syringe (Hamilton) coupled with a polyethylene tubing to a 36G injection cannulas (Phymep). Note that these empirically derived stereotaxic coordinates do not precisely match those given in the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004), which we used as references for the injection-site images. To enable retrograde transport of the RB into the somas of midbrain DA neurons, we waited for an adequate time to perform the electrophysiology experiments, depending on the injection zone: 3 weeks after injection into the NAc and 2 weeks after injection into the Amg.

Intracranial infusion

Bilateral guide cannulas (Bilane) were implanted in the VTA (bregma 3.1 mm, lateral 0.5 mm, ventral 4.3 mm) of WT mice under anesthesia 1 week before the EOM experiment, in order to enable local infusion of drugs. Before each experiment session a double injection cannula (4.5 mm length, 1 mm interval) was inserted into the implanted bilateral guide cannulas (length under pedestal 4.0 mm), 0.5 mm beyond the tip of the guide cannulas. The day of the experiment, the cannulas were connected to a multi-syringe pump (Univentor) allowing saline or nicotine (100 ng) injection over 1 minute (injected volume of 100 nL).

Virus injection and optogenetic experiments

For lentiviral re-expression of the $\beta 2$ subunit, we performed bilateral injections of 1 μL of PGK- $\beta 2$ -IRES-GFP ($\beta 2^{-/-}$ Vec mice) or sham PGK-IRES-GFP into the VTA of $\beta 2^{-/-}$ mice (coordinates from bregma 3.1 mm, lateral 0.5 mm, ventral 4.5 mm).

To perform DA neuron-specific optogenetic experiments, intracranial (IC) injections were performed bilaterally into the VTA (bregma 3.1 mm, lateral 0.5 mm, ventral 4.5 mm) of 8-week-old DAT-Cre mice, in which *Cre* recombinase expression is restricted to DA neurons without disrupting endogenous dopamine transporter (DAT) expression (Turiault et al., 2007; Zhuang et al., 2005), with 0.5 μ L of AAV per hemisphere (AAV5.EF1 α .DIO.CatCh.YFP 2.46e¹² or 6.53e¹³ vg/mL used in the BLA and AAV9.EF1 α .DIO.h-ChR2.YFP 9.59e¹³ vg/mL used in the NAcLSH, AAV5.CAG-Flex-Jaws-eGFP 1.16e¹³ vg/mL, AAV5.EF1 α .DIO.YFP 6.89e¹³ or 9.10e¹³ vg/mL). A double-floxed inverse open reading frame (DIO) allowed restraining to VTA DA neurons the expression of CatCh, a channelrhodopsin mutant with enhanced light sensitivity and Ca²⁺ permeability (Kleinlogel et al., 2011) for activation, or Jaws a red-shifted cruxhalorhodopsin Jaws (Chuong et al., 2014) for inhibition (Figure S9). Optical fibers (200 μ m core, NA = 0.39, Thor Labs) coupled to a zirconia ferule (1.25 mm) were implanted bilaterally in the different target sites of the VTA (coordinates for BLA implantation: bregma –1.6 mm, lateral 3.18 mm, ventral 4.5 mm) (coordinates for NAcLSH implantation: bregma 1.5 mm, lateral 1.75 mm, ventral 3.90 mm), and fixed to the skull with dental cement (SuperBond, Sun medical). An ultra-high-power LED (470 nm for Catch, 520 nm for Jaws, Prizmatix) coupled to a patch cord (500 μ m core, NA = 0.5, Prizmatix) was used for optical stimulation (output intensity of 10 mW, frequency of 10 Hz, 5 ms-pulse for CatCh, continuous stimulation at 520 nm for Jaws).

To perform non-conditional expression in different subnuclei of the amygdala (Amg), an AAV2-CAG-Jaws-GFP (1.45 e¹² ng/ μ L) or AAV2-7m8-CAG-GFP (5.70 e¹² ng/ μ L) were injected bilaterally into the VTA (same coordinates as previously indicated) of distinct groups of 8-week-old WT mice. Optical fibers were bilaterally implanted in those mice either in the basolateral amygdala (BLA: bregma –1.6 mm, lateral 3.18 mm, ventral 4.5 mm) or in the central amygdala (CeA: bregma –0.78 mm, lateral 2.3 mm, ventral 4.8 mm).

To perform non-conditional expression in the NAc medial shell (NAcMSH), a AAV5.hSyn.hChR2(H134R).eYFP (2.4e¹³) or AAV5.hSyn.Jaws.KGC.GFP.ER2 (1.3e¹³) or AAV5.hSyn.eGFP.WPRE.bGH (2.2e¹³) was injected bilaterally in the VTA of distinct groups of 8 week-old WT male mice. Optical fibers were bilaterally implanted in those mice in the NAcMSH with 12° angle (NAcMSH: bregma 1.5 mm, lateral 1.5 mm, ventral 4.5 mm).

All experiments were conducted at least 4 weeks after viral injection, to enable expression of the different constructs. The optical stimulation cable was plugged onto the ferule during all experimental sessions when on purpose, to habituate the animals and control for latent experimental effects.

Fiber photometry experiments

8-week-old WT mice were injected with 0.5 μ L of AAV-hSyn-GRAB_{D₂A_{2m}} (1.23e¹⁴ vg/mL) in the BLA (bregma –1.61 mm, lateral 3.18 mm, ventral 4.7 mm) or NAcLSH (bregma 1.5 mm, lateral 1.55 mm, ventral 3.95 mm). Optical fibers (200 μ m core, NA = 0.39, Thor Labs) coupled to a stainless-steel ferule (1.25 mm) were implanted after virus injection at the same coordinates, and fixed to the skull with dental cement (SuperBond, Sun medical). Two weeks after surgeries, animals begin a habituation period to the plastic cylinder used for photometry recordings.

Before the measurements, the animals were implanted in one of the tail veins with a catheter (30G needle connected to PE10 tubing). Venous return and the absence of tail swelling after a saline injection ensured a good positioning of the catheter, which was then glued and taped to the animal's tail. During awakening, the mouse was placed into a 7 cm-diameter plastic cylinder from which its tail can protrudes on the outside via a hole (see schematic on Figure S2B).

Fluorescence measurements of DA levels in the NAcLSH and BLA were recorded using a Doric Lenses 1-site 2-color fiber photometry system. The fiber photometry console was connected to the LED driver to control connectorized LED in Lock-in mode (CLED 465 nm modulated at 220.537 Hz) that was connected to its port on the Mini Cube (FMC4_AE(405)_E(460-490)_F(500-550)_S) through an optic patch cord (MFP_200/220/LWMJ-0.37_1m_FC-FC_T0.20). Light stimulation and recorded fluorescence were transmitted through an optical fiber (FT400EMT, 400 μ m core, NA = 0.39, Thorlabs) connected both to the animal's implanted optical fiber via a zirconia sleeve and to the sample (S) port on the Mini Cube. Finally, the photoreceiver converting recorded light to electrical signals (AC Low setting, New Focus 2151 Visible Femtowatt Photoreceiver, New Focus, San Jose, CA, USA) was connected to the Mini Cube through an optic path cord (600 μ m core, NA = 0.48, FC-FC, Doric Lenses) fitted on a fiber optic adaptor (Doric Lenses) and to the fiber photometry console. Signal was acquired through Doric Neuroscience Studio software (version 5.2.2.5) with a sampling rate of 12.0 kS/s (kilosamples per second) and a low-pass filter with a cutoff frequency of 12.0 Hz.

We assessed changes in DA levels in NAcLSH or BLA in response to saline or nicotine injection in the tail vein of the animal. After catheter implantation, the animal recovers in the plastic cylinder for 30 min. We then started to record after at least 3 min baseline, 5 min after saline injection, 15 min after 30 μ g/kg or 60 μ g/kg nicotine injection. After the session, mice were re-anesthetized to carefully remove the catheter and were allowed to rest for one day before the next recording session.

In vivo electrophysiology on anesthetized mice

Mice were deeply anesthetized with an IP injection of chloral hydrate (8%), 400 mg/kg, supplemented as required to maintain optimal anesthesia throughout the experiment. The scalp was opened and a hole was drilled in the skull above the location of the VTA. Intravenous administration of saline or nicotine (30 μ g/kg) was carried out through a catheter (30G needle connected to polyethylene tubing PE10) connected to a Hamilton syringe, into the saphenous vein of the animal. For multiple doses of nicotine, mice received first a dose of 30 μ g/kg and then one to four subsequent injections of nicotine at different doses, either 10, 15, 60 and/or 90 μ g/kg (pseudo-randomly administrated). Extracellular recording electrodes were constructed from 1.5 mm outer diameter / 1.17 mm inner

diameter borosilicate glass tubing (Harvard Apparatus) using a vertical electrode puller (Narishige). The tip was broken straight and clean under microscopic control to obtain a diameter of about 1 μm . The electrodes were filled with a 0.5% NaCl solution containing 1.5% of neurobiotin® tracer (VECTOR laboratories) yielding impedances of 6–9 M Ω . Electrical signals were amplified by a high-impedance amplifier (Axon Instruments) and monitored audibly through an audio monitor (A.M. Systems Inc.). The signal was digitized, sampled at 25 kHz, and recorded on a computer using Spike2 software (Cambridge Electronic Design) for later analysis. The electrophysiological activity was sampled in the central region of the VTA (coordinates: between 3.1 to 4 mm posterior to bregma, 0.3 to 0.7 mm lateral to midline, and 4 to 4.8 mm below brain surface). Individual electrode tracks were separated from one another by at least 0.1 mm in the horizontal plane. Spontaneously active DA neurons were identified based on previously established electrophysiological criteria (Grace and Bunney, 1984b; 1984a; Ungless and Grace, 2012).

After recording, nicotine-responsive cells were labeled by electroporation of their membrane: successive currents squares were applied until the membrane breakage, to fill the cell soma with neurobiotin contained into the glass pipet (Pinault 1996). To be able to establish correspondence between neurons responses and their localization in the VTA, we labeled one type of response per mouse: solely activated neurons or solely inhibited neurons, with a limited number of cells per brain (1 to 4 neurons maximum, 2 by hemisphere), always with the same concern of localization of neurons in the VTA.

In vivo electrophysiology on freely moving animals

Micro-drive and electrodes

Hand-made poly-electrodes (bundle of 8 electrodes: “octrodes”) were obtained by twisting eight polyimide-insulated 17 μm Nickel-Chrome wires (A-M SYSTEMS, USA). The use of eight channels relatively close to each other allows for a better discrimination of the different neurons. Before implantation and recording, the octrodes were cut at suitable length and plated with a solution of platinum (platinum black plating solution, Neuralynx; Bozeman, USA) and poly-ethylene glycol (1 mg/mL) (25% platinum - 75% PEG) to lower their impedance to 200–500 kOhms and improve the signal-to-noise ratio. The free ends of 2 octrodes were connected to the holes of an EIB-18 (electrode interface board, Neuralynx) and fixed with pins. We designed and manufactured a micro-drive system (home-made 3D conception and printing) consisting of a frame on which is mounted the EIB, and a platform on which are glued the 2 octrodes. Using a driving screw, we were able to slide the platform up and down within the frame, allowing to move through the VTA during chronic recordings in order to sample neuronal populations.

Micro-drive implantation

After anesthetic procedure, the cranial bone of the mouse was exposed by a midline incision of the scalp. The skull was drilled and recording electrodes were placed just above the VTA (bregma -3.2 ± 0.1 mm, lateral 0.5 ± 0.1 mm, ventral 4.1 ± 0.1 mm from the brain surface) (Paxinos and Franklin, 2004). A small amount of petroleum jelly (Vaseline) was applied on top the hole and around the recordings electrodes to prevent clotting and facilitate sliding for the following weeks. Monopolar ground electrodes were laid over the cortical layer of the cerebellum, cemented to the skull with SuperBond (Sun Medical) and pinned on the EIB during surgery. SuperBond and dental acrylic cement were then used to fix the micro-drive to the skull for chronic recordings. The scalp was stitched and buprenorphine was injected subcutaneously to facilitate awakening. Animals recovered until regaining pre-surgery body weight, for at least one week.

Neuronal recordings and characterization of DA neurons

Recordings of extracellular potentials were performed using a digital acquisition system (Digital Lynx SX; Neuralynx) together with the Cheetah software. Signals from each wire were band-pass-filtered between 600 and 6000 Hz for multi-unit recordings at 32 kHz sampling. Spikes sorting and clustering were performed using SpikeSort3D (Neuralynx), and validation of clusters was done with custom-written Python routines based on activity and waveform criteria as well as auto- and cross-correlograms. From the starting position after surgery (around 4.10 mm), electrodes were lowered (75 μm steps) every other day to sample as many neurons as possible until a depth of 5.0 mm was reached. The electrophysiological characteristics of VTA neurons were assessed each time an active cell was encountered. Extracellular identification of putative DA neurons (pDAn) was based on their location as well as on a set of unique electrophysiological properties that characterize these cells *in vivo*: (1) a typical triphasic action potential with a marked negative deflection; (2) a characteristic long duration (> 2.0 ms) action potential; (3) an action potential width from start to negative trough > 1.1 ms; (4) a slow firing rate (1–10 Hz) with a regular single spiking pattern and occasional short bursting activity. Putative GABA neurons were characterized by a characteristic short duration of action potential from start to negative trough (< 1.0 ms), and a high firing rate (> 12 Hz). D2 receptor (D2R) pharmacology was also used to confirm DA neuron identification: after a baseline (10 min) and a saline (5 min) IP injection, 0.2 mL of quinpirole (1 mg/kg, D2R agonist) was injected (10 min recording), followed by 0.2 mL-eticlopride (1 mg/kg, D2R antagonist) injection (10 min recording). Since most DA, but not GABA neurons, express inhibitory D2 auto-receptors, neurons were considered as pDAn, if quinpirole induced at least 30% decrease in their firing rate, while eticlopride restored firing above the baseline. Nevertheless, as continuous D2 pharmacology could have affected DA neurons firing, we allowed mice to recover two days after this experiment and we did not test all encountered pDAn. We thus performed pharmacological confirmation when first encountering a pDA neuron in a given mouse or at the end of the week if at least one putative neuron was present. Neurons were considered DA only if they responded to the pharmacology, or if they presented electrophysiological characteristics defined above and were recorded between two positive pharmacological experiments.

We assessed the pDAn responses to nicotine injection in the tail vein of the animal (catheter implantation presented above see Fiber photometry section, Figure S2B). We let the animal recover after catheter implantation and habituate to the plastic cylinder

for 30 min, and then started to record VTA neurons. For each session, we recorded 7 min of baseline, 7 min after saline injection, 15 min after 30 $\mu\text{g/kg}$ nicotine injection and 20 min after 60 $\mu\text{g/kg}$ nicotine injection. After the session, mice were re-anesthetized to carefully remove the catheter and were allowed to rest for one day before the next recording session. The screw was turned to lower the octrodes into the VTA and try to sample new pDAn within the following days.

Ex vivo patch-clamp recordings

For a functional verification of CatCh or Jaws expression, AAV5.EF1 α .DIO.CatCh.YFP or AAV5.EF1 α .DIO.Jaws.eGFP virus was injected into 7 to 9-week-old male DAT^{CRE} mice. For the characterization of NAc-projecting and Amg-projecting neurons, green retrobead tracers (Lumafluor) were injected into 7–9 week old male WT mice. After 4 weeks (for DAT-Cre mice) or 2 weeks (for WT mice), mice were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of a mix of ketamine (150 mg/kg Imalgene® 1000, Merial) and xylazine (60 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer). Coronal midbrain sections (250 μm) were sliced with a Compresstome (VF-200, Precisionary Instruments) after intracardial perfusion of cold (4°C) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (SB-aCSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 5.9 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 25 sucrose, 2.5 glucose, 1 kynurenate (pH 7.2, 325 mOsm). After 10 to 60 minutes at 35°C for recovery, slices were transferred into oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 15 sucrose, 10 glucose (pH 7.2, 325 mOsm) at room temperature for the rest of the day, and individually transferred to a recording chamber continuously perfused at 2 mL/minute with oxygenated aCSF. Patch pipettes (4–8 M Ω) were pulled from thin wall borosilicate glass (G150TF-3, Warner Instruments) with a micropipette puller (P-87, Sutter Instruments, Novato, CA) and filled with a potassium gluconate-based intracellular solution containing (in mM): 116 K-gluconate, 20 HEPES, 0.5 EGTA, 6 KCl, 2 NaCl, 4 ATP, 0.3 GTP, and biocytin 2 mg/mL (pH adjusted to 7.2). Neurons were visualized using an upright microscope coupled with a Dodt contrast lens, and illuminated with a white light source (Scientifica). A 460 nm LED (pE-2, Cooled) was used for visualizing GFP-, YFP- or RB-containing cells (using a bandpass filter cube, AHF). Whole-cell recordings were performed with a patch-clamp amplifier (Axoclamp 200B, Molecular Devices) connected to a Digidata (1550 LowNoise acquisition system, Molecular Devices). Signals were low-pass filtered (Bessel, 2 kHz) and collected at 10 kHz using the data acquisition software pClamp 10.5 (Molecular Devices). Optical stimulation was applied through the microscope with two LEDs (460 nm and 525 nm, pE-2, CoolLED). To characterize CatCh expression, a 1 s continuous photostimulation was used to evoke currents in voltage-clamp mode (−60 mV), and a 10 Hz - 5 ms/pulse photostimulation was used to drive neuronal firing in current-clamp mode. Regarding Jaws expression, continuous photostimulation (20 s) was used in current-clamp (−60 mV). To record nicotinic currents from RB+ DA neurons of the VTA, local puffs (500 ms) of nicotine tartrate (100 μM in aCSF) were applied with a glass pipette (2–3 μm diameter) positioned 20 to 30 μm away from the soma and connected to a picospritzer (World Precision Instruments, adjusted to ~2 psi). All electrophysiological recordings were extracted using Clampfit (Molecular Devices) and analyzed with R.

Immunostaining

After euthanasia, brains were rapidly removed and fixed in 4% paraformaldehyde. After a period of at least three days of fixation at 4°C, serial 60- μm sections were cut from the midbrain with a vibratome. Immunostaining experiments were performed as follows: free-floating VTA brain sections were incubated for 1 hour at 4°C in a blocking solution of phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma; A4503) (vol/vol) and 0.2% Triton X-100 (vol/vol), and then incubated overnight at 4°C with a mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody (anti-TH, Sigma, T1299) and a chicken anti-GFP antibody (Life technologies Molecular Probes, A-6455), both at 1:500 dilution, in PBS containing 1.5% BSA and 0.2% Triton X-100. The following day, sections were rinsed with PBS, and then incubated for 3 hours at 22–25°C with Cy3-conjugated anti-mouse and Alexa488-conjugated anti-chicken secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 715-165-150 and 711-225-152) at 1:500 and 1:1000 dilution in a solution of 1.5% BSA in PBS, respectively. After three rinses in PBS, slices were wet-mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930). Microscopy was carried out with a fluorescent microscope, and images captured using a camera and analyzed with ImageJ.

In the case of electrophysiological recordings, the recorded neurons were identified by immunohisto-fluorescence as described above, with the addition of 1:200 AMCA-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) in the solution. Immunoreactivity for both TH and neurobiotin (NB) allowed us to confirm the neurochemical phenotype of DA neurons in the VTA (TH+ NB+).

In the case of optogenetic experiments on DAT^{CRE} mice, identification of the transfected neurons by immunofluorescence was performed as described above, with the addition of chicken-anti-GFP primary antibody (1:500, ab13970, Abcam) in the solution. A goat-anti-chicken AlexaFluor 488 (1:500, Life Technologies) was then used as secondary antibody. Immunoreactivity for TH, GFP and neurobiotin/biocytin allowed us to confirm the neurochemical phenotype of DA neurons in the VTA (TH+ NB+) and the transfection success (GFP+).

Image acquisition

For immunofluorescence pictures, all slices were imaged by acquisition on a Leica DMR epi-fluorescent microscope, under identical conditions of magnification, illumination and exposure (using photometrics coolsnap camera). Images were captured in gray level using MetaView software (Universal Imaging Corporation, Roper Scientific, France) and colored post-acquisition on ImageJ software.

Elevated O-maze test

All behavioral tests were conducted during the light period of the animal cycle (between 1:00 and 7:00PM). The raw data for behavioral experiments were acquired as the time spent by animals in the different zones of the environments. Animals were detected in their body center with a 2D USB camera, connected to the Anymaze software for acquisition.

The elevated O-maze (EOM) apparatus consists of two open (stressful) and two enclosed (protecting) elevated arms that together form a zero or circle (diameter of 50 cm, height of 58 cm, 10 cm-wide circular platform). The time spent in exploring enclosed versus open arms indicates the anxiety level of the animal. The first EOM experiment assessed the effect of an IP injection of Nic (0.5 mg/kg) on WT mice. The test lasts 10 minutes: mice are injected 1 minute before the test, and then put in the EOM for 9 minutes. In the second EOM experiment, mice received an IC infusion of Nic (100 ng/infusion) over 1 minute before the 9-minute test. Finally, optogenetic EOM experiments consisted in 15 minute-test, alternating 5 minute-periods of stimulation and non-stimulation (OFF-ON-OFF). For “rescue” experiment in EOM, nicotine was injected IP to the mice with the same protocol as described above, the test lasted for 9 minutes with continuous stimulation along the test (continuous for inhibition and 10Hz for activation).

Real-time place preference test

The real-time place preference (RTPP) protocols were performed in a Y-maze apparatus (Imetronic, Pessac, France), using only two arms of the Y-maze as two distinct compartments (the third arm was closed by a door and not available to the animal). The chamber in between is an equilateral triangle (side of 11 cm) used as a neutral compartment, where the animal was never photo-stimulated. Each arm of the maze measures 25 cm × 12 cm. The first arm displays black and white stripes with smooth walls and floor, whereas the other arm displays uniform-gray rough walls and floor. Choices of the compartment where the animals will be stimulated were counterbalanced across animals in the same test and YFP-control groups.

The RTPP test consisted of a 20 minute-session where animals can freely navigate between the compartments but are photo-stimulated only in one of the two compartments.

Implanted animals were connected with a bilateral fiber (diameter of 400 μ m, NA = 0.39, Thorlabs) attached to a rotor connecting the 470 nm-LED or 520 nm-LED (Prizmatix) with a fiber of diameter 500 μ m and NA = 0.5 (Thorlabs). LED output was controlled using a Master-8 pulse stimulator (A.M.P.I., Jerus) which delivered a discontinuous stimulation of 5-ms light flashes at 10 Hz frequency and 470 nm wavelength (for CatCh experiments), or a continuous stimulation at 520 nm (for Jaws experiments). Naive mice were connected and placed at the center of the neutral compartment before starting the recording. The time spent in the neutral compartment was not taken into account in the result. The results are presented as preference score which is the difference of time spent between the stimulated compartment over the “non-stimulated” compartment.

Open field paradigm

The open field (OF) is a square enclosure of 50 cm x 50 cm where animals can move freely. Animal displacements were quantified by comparing the time spent in the center versus the periphery of the square. When nicotine was injected to WT mice in the OF test (IP injection of nicotine tartrate at 0.5 mg/kg, 0.1 mL/10 g, 1 minute before the test), animals were placed in the center of the OF for a 9-minute test duration, freely moving inside the enclosure. Regarding the optogenetic experiments conducted in the OF, animals were placed in the maze for 15 minutes, while alternating between OFF, ON and OFF optical stimulations periods of 5 minutes each.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Measurements of neuronal activity

Timestamps of action potentials were extracted in Spike 2 and analyzed using R, a language and environment for statistical computing (<http://www.r-project.org>). Spontaneous activity of DA cell firing *in vivo* was analyzed with respect to the average firing frequency (in Hz) and the percentage of spikes-within-burst (%SWB = number of spikes within burst divided by total number of spikes in a given window). Neuronal basal activity was defined on at least three-minute recording. To determine whether the spontaneous activity of VTA DA neurons could predict their responses to nicotine injection (activation or inhibition), we analyzed 4 variables that characterize the firing patterns: the mean firing frequency, the coefficient of variation of the firing frequency estimated on sliding windows, the %SWB and the burst event frequency. For multiple logistic regression, glm function (R 4.0, with binomial family) was used for fitting and predict.glm function was used to obtain prediction.

Method for classifying VTA DA neurons subpopulations in response to nicotine injection

Subpopulations of DA neurons were automatically classified using variation of firing frequency and the following routine: First, we calculated the maximal variation from the baseline per neuron, within the first 3 (for anesthetized animals) or 5 minutes (for freely-moving mice) following injection. We then used a bootstrapping method (see below) to exclude non-responding neurons. Two neurons included in Figure 1B ($n = 245$) did not show statistical variations after nicotine injections and were thus removed from the rest of the study. Neurons displaying an increase in firing frequency ($\Delta f > 0$) were defined as “Nic+,” while neurons displaying a decrease in firing frequency ($\Delta f < 0$) were defined as “Nic-.” For the dose-response curve, neurons were classified as Nic+ or Nic- based on their response to a nicotine dose of 30 μ g/kg or higher. For saline injections, only nicotine-responsive neurons were considered, and the polarity of the variation was defined based on the response to nicotine (i.e., in Nic+ neurons, we consider that saline increases

activity). In $\beta 2^{-/-}$ mice, VTA DA neurons did not show a clear change in firing rate after nicotine injection. In $\beta 2^{Vec}$ mice, lentivirus-mediated expression of $\beta 2$ is most likely heterogenous within the VTA, hence not all recorded cells are expected to respond to nicotine. In $\beta 2^{-/-}$ and $\beta 2^{Vec}$ mice, we thus divided populations of neurons using the threshold criteria ($\Delta f < 0$ or > 0) and evaluated the impact of re-expression without using the bootstrapping method (Figures 3B and S8A–S8D). Responding neurons (bootstrapping at 2%) are shown in Figures S8E and S8F. Overall, for $\beta 2^{-/-}$ mice, only 22/46 neurons (47%) showed a response (bootstrapping at 2%), while for $\beta 2^{Vec}$ mice this ratio increased to 65/90 (72%).

Quantification of neuronal responses to nicotine injection

Firing frequency was quantified on overlapping 60 s windows shifted by 15 s time steps (except for Figure S1, in which windows are shifted by 1 s steps). For each neuron, the firing frequency was rescaled as a percentage of its baseline value averaged during 3 minutes before nicotine injection. The responses to nicotine are thus presented as a percentage of variation from baseline (mean $\pm$ SEM). The effect of nicotine was assessed by comparing the maximum of firing frequency variation induced by nicotine and saline injection. For activated (respectively inhibited) neurons, the maximal (respectively minimal) value of firing frequency was measured within the response period (3 to 5 minutes) that followed nicotine or saline injection. The results are presented as mean $\pm$ SEM of the difference of maximum variation after nicotine or saline. The mean responses to nicotine injections for recordings in freely moving mice, both for inhibited and activated groups, pooled 7 responses at 30 μ g/kg Nic and one response at 60 μ g/kg. Neurons that significantly responded to nicotine injections were identified by bootstrapping. Baseline spike intervals were randomly shuffled 1000 times. Firing frequency was estimated on 60 s time windows, with 15 s time steps. For each neuron we determined the percentile from the shuffled data corresponding to the nicotine-evoked response (max or min frequency after nicotine injection). Neurons were individually considered as responsive to nicotine injection if this percentile is ≥ 0.98 or ≤ 0.02 .

Quantification of juxtacellularly labeled neurons

A total number of 245 neurons were recorded and labeled for Figure 1. Those 245 neurons were used in Figure 1B. Two non-responding neurons were removed, so 243 neurons were used for Figures 1C, 1D, and 1G. Among them, 101 neurons were shown in Figures 2B and 2E, with 49 neurons labeled in NAc-RB injected mice and 52 in Amg-RB injected mice. The locations of the labeled neurons were manually placed on sections of the Paxinos atlas georeferenced in a 2D grid using Adobe Illustrator rules. The medio-lateral and dorso-ventral coordinates of the location of each neuron were extracted from the grid pattern and the antero-posterior coordinates were estimated from the section of the Paxinos atlas on which the neurons were placed. These three coordinates were used to make density histograms of location for nicotine-activated and nicotine-inhibited DA neurons or NAc-projecting and Amg-projecting DA neurons.

Quantification of fluorescence

Data from fiber photometry experiments were first down-sampled by a 100-factor using custom MATLAB routine. Down-sampled data were then further analyzed on R software. First, we subtracted the mean value of “autofluorescence” (signal acquired after each recording with the same parameters, but without the optic fiber attached to the mouse) to the signal. We then fitted an exponential to this signal and subtracted it before adding an offset equal to the mean of the signal before detrending to account for the slow decay of the signal due to bleaching during recording. We defined a baseline fluorescence value (F_0) as the mean fluorescence of the signal during 120 s before injection time, for each injection (saline and nicotine) individually. We then calculated normalized variation in fluorescence ($\Delta F/F$) as $(F - F_0)/F_0$ for each injection. The analysis was carried out by averaging each $\Delta F/F$ obtained for each condition (all saline or nicotine injections done in NAcLSh implanted mice, same for saline or nicotine in BLA animals) and mean data were smoothed using a normal kernel.fit (bandwidth = 120). All Nic responses ($n = 7$) for BLA implantation were done at 30 μ g/kg recorded in 6 different animals. For NAcLSh implantation, 6 animals received Nic injection at 30 or 60 μ g/kg ($n = 8$, mean fluorescence pooled 2 injections at 60 μ g/kg and 6 injections at 30 μ g/kg). For each injection (saline and nicotine), peak fluorescence (maximum and minimum of $\Delta F/F$ for NAcLSh and BLA implanted mice respectively) were detected within a 100 s window after injection. For each paired injection, we calculated the difference in peak fluorescence between nicotine and saline.

Statistics: figure by figure

All statistical analyses were done using the R software with home-made routines. Results are plotted as mean $\pm$ SEM. The total number (n) of observations in each group and the statistical tests used for comparisons between groups or within groups are indicated on the figures directly or in the figure legends. Comparisons between means were performed with parametric tests as Student's t test, or two-way ANOVA for comparing two groups when parameters followed a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test with $p > 0.05$), or Wilcoxon non-parametric test as when the distribution was skewed. Holm's sequential Bonferroni post hoc analysis was applied, when necessary. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***), or $p > 0.05$ was considered not to be statistically significant.

Figure 1: Kolmogorov-Smirnov test was used to compare the responses of VTA DA neurons to saline or nicotine injection. Wilcoxon test was used to demonstrate a significant increase or decrease of firing frequency induced by nicotine injection compared to saline injection (B). Wilcoxon test was used to compare the firing frequency before and after nicotine or saline injection. Wilcoxon test was used to compare the firing frequency variation induced by nicotine or saline injection. (D). One-way ANOVA was used to demonstrate

a dose-effect of nicotine on activated or inhibited DA neurons (E). Wilcoxon test was used to compare coordinates of nicotine-inhibited and nicotine-activated recorded neurons (G).

Figure 2: Wilcoxon test was used to compare the firing frequency before and after nicotine in RB+ and RB- DA neurons. Wilcoxon test was used to compare firing frequency variations induced by nicotine in RB+ and RB- DA neurons (C-F). Kolmogorov-Smirnov test was used to compare the responses of NAc-projecting and Amg-projecting DA neurons to nicotine injection (G). Paired Student's t test was used to compare the peak of fluorescence induced by saline and nicotine injection in NAcLSH or BLA. Student's t test was used to compare the difference in $\Delta F/F$ (Nicotine – Saline) between NAcLSH and BLA (I).

Figure 3: For behavior (A-C), over time effect of nicotine or saline injection (IP and IC) on the time spent by the mice in the open arms of the EOM was first tested with one-way repeated-measures ANOVA for each group of mice (shown in [Figures S7A, S7D, and S7G](#)). Two-way repeated-measures ANOVA (time/treatment or time/genotype) were used to compare the difference between the groups. In case of significant interaction effect between factors, Wilcoxon or Student's t test with Holm's sequential Bonferroni corrections were used for intra-group and inter-group post hoc analysis (as indicated in the figure). For electrophysiology (B), Kolmogorov-Smirnov test was used to compare responses to nicotine of DA neurons in $\beta 2^{-/-}$ mice and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice. Wilcoxon tests with Bonferroni corrections are used to demonstrate a significant increase or decrease of firing frequency induced by IV nicotine injection in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice compared to saline and nicotine injections in $\beta 2^{-/-}$ mice.

Figure 4 and 5: For EOM experiments (A-B), effect of light was first tested with one-way repeated-measures ANOVA for each group of mice (shown in [Figures S11A, S11B, S13A, and S13B](#)). Two-way repeated-measures ANOVA (time/opsin) were used to compare the difference between the groups. In case of a significant interaction effect between factors, Wilcoxon or Student's t test with Holm's sequential Bonferroni corrections were used for intra-group and inter-group post hoc analysis (as indicated in the figure). For EOM experiment under nicotine (C), over time effect of nicotine injection on the time spent by the mice in the EOM open arms was first tested with one-way repeated-measures ANOVA for each group. Two-way repeated-measures ANOVA (time/opsin) were used to compare the difference between the groups. In case of a significant interaction effect between factors, Wilcoxon or Student's t test with Bonferroni corrections were used for intra-group and inter-group post hoc analysis (as indicated in the figure). For RTPP experiments (D), preference scores between groups were compared with Student's t test.

Figure S2: Wilcoxon test was used to compare spontaneous activity of nicotine-inhibited and nicotine-activated recorded neurons (C).

Figure S4: Wilcoxon test was used to compare coordinates of NAc- and Amg-projecting neurons (E). Wilcoxon test was used to compare spontaneous activity of NAc- and Amg-projecting DA neurons (F).

Figure S5: Wilcoxon test was used to compare firing frequencies before and after nicotine in RB+ and RB- DA neurons. Wilcoxon test was used to compare firing frequency variations induced by nicotine in RB+ and RB- DA neurons (D/H).

Figure S6: Two-way repeated-measures ANOVA (current, phenotype) was used to compare neuronal excitability (D). Wilcoxon test was used to compare nicotine-evoked currents (F).

Figure S7: Two-way repeated-measures ANOVA (time, treatment) was used to compare the distance traveled by mice in the OF after nicotine or saline injection (A). One-way repeated-measures ANOVA were used to test the overtime effect of saline or nicotine intraperitoneal injection, or intracranial infusion, or the time spent by mice in the open arms of the EOM. Two-way repeated-measures ANOVA (time, treatment) was used to compare number of entries in the open arms of the EOM after saline or nicotine injection (A, D, G). Two-way repeated-measures ANOVA (time, genotype) was used to compare the time spent and the number of entries in the EOM open arms after nicotine injection between groups (A-D-F-G). In case of a significant interaction effect between factors, Wilcoxon or Student's t test with Holm's sequential Bonferroni corrections were used for intra-group and inter-group post hoc analysis.

Figure S8: Kolmogorov-Smirnov test was used to compare the responses of VTA DA neurons to saline or nicotine injection in $\beta 2^{-/-}$ (A) and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice (C). Wilcoxon test was used to compare firing frequency before and after nicotine or saline injection. Wilcoxon test was used to compare firing frequency variation induced by nicotine or saline injection in $\beta 2^{-/-}$ (B-G-F) and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice (D-G-F).

Figure S11 and S13: For anxiety measurements, one-way repeated-measures ANOVA were used to test the light effect on the time spent in the open arms of the EOM. Two-way repeated-measures ANOVA were used to compare the stimulation effect depending on the position of the animal (closed arms or open arms) at the onset of the light and the number of entries in the open arms of the EOM between groups (A-B). For locomotor activity, two-way repeated-measures ANOVA (time, opsin) were used to compare the difference of light effect on the distance traveled by the mice between the groups (C). In case of a significant interaction effect between factors, Wilcoxon or Student's t test with Holm's sequential Bonferroni corrections were used for intra-group and inter-group post hoc analysis (as indicated in the figure).

Figure S12: EOM experiments (C-D) and locomotor activity (E-F) were analyzed as previously described for [Figure S9](#).

Figure S14: For EOM experiments, the time spent in the open arms (*cf.* [Figure 3](#)), and the number of entries were analyzed as previously described (*cf.* [Figure S11](#)). Locomotor activity was analyzed as previously described in [Figure S11](#). For RTPP experiments (E), preference scores between groups were compared with Student's t test.

Supplemental information

**Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala
dopamine pathway to promote anxiety**

Claire Nguyen, Sarah Mondoloni, Tinaïg Le Borgne, Ines Centeno, Maxime Come, Joachim Jehl, Clément Solié, Lauren M. Reynolds, Romain Durand-de Cuttoli, Stefania Tolu, Sébastien Valverde, Steve Didienné, Bernadette Hannedouche, Jean-François Fiancette, Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Véronique Deroche-Gamonet, Deniz Dalkara, Jean-Pierre Hardelin, Alexandre Mourot, Fabio Marti, and Philippe Faure

Supplemental Information

Nicotine inhibits the VTA to Amygdala dopamine pathway to promote anxiety

Nguyen C, Mondoloni S, Le Borgne T, Centeno I, Come M, Jehl J, Solié C, Reynolds LM, Durand-de Cuttoli R, Tolu S, Valverde S, Didienne S, Hanneke B, Fiancette JF, Pons S, Maskos U, Deroche-Gamonet V, Dalkara D, Hardelin JP, Mourot A, Marti F & Faure P

Supplemental Information consists of:

Supplementary Figure S1, related to Figure 1.

Supplementary Figure S2, related to Figure 1.

Supplementary Figure S3, related to Figure 1.

Supplementary Figure S4, related to Figure 2.

Supplementary Figure S5, related to Figure 2.

Supplementary Figure S6, related to Figure 2.

Supplementary Figure S7, related to Figure 3.

Supplementary Figure S8, related to Figure 3.

Supplementary Figure S9, related to Figure 4.

Supplementary Figure S10, related to Figure 4.

Supplementary Figure S11, related to Figure 4.

Supplementary Figure S12, related to Figure 4.

Supplementary Figure S13, related to Figure 5.

Supplementary Figure S14, related to Figure 5.

Figure S1: Paired responses to saline and nicotine injections of *in vivo* recorded DA neurons in anesthetized mice. Related to Figure 1.

Responses of VTA DA neurons to saline (left) and nicotine (right) injections. Responses are rank ordered based on the response to nicotine, from the most inhibited (below) to the most excited (above). *Left*: Colored scale of amplitude responses. *Right*: Examples of individual responses to nicotine (10 neurons), horizontal dotted lines indicate 0, vertical dotted lines the nicotine injections.

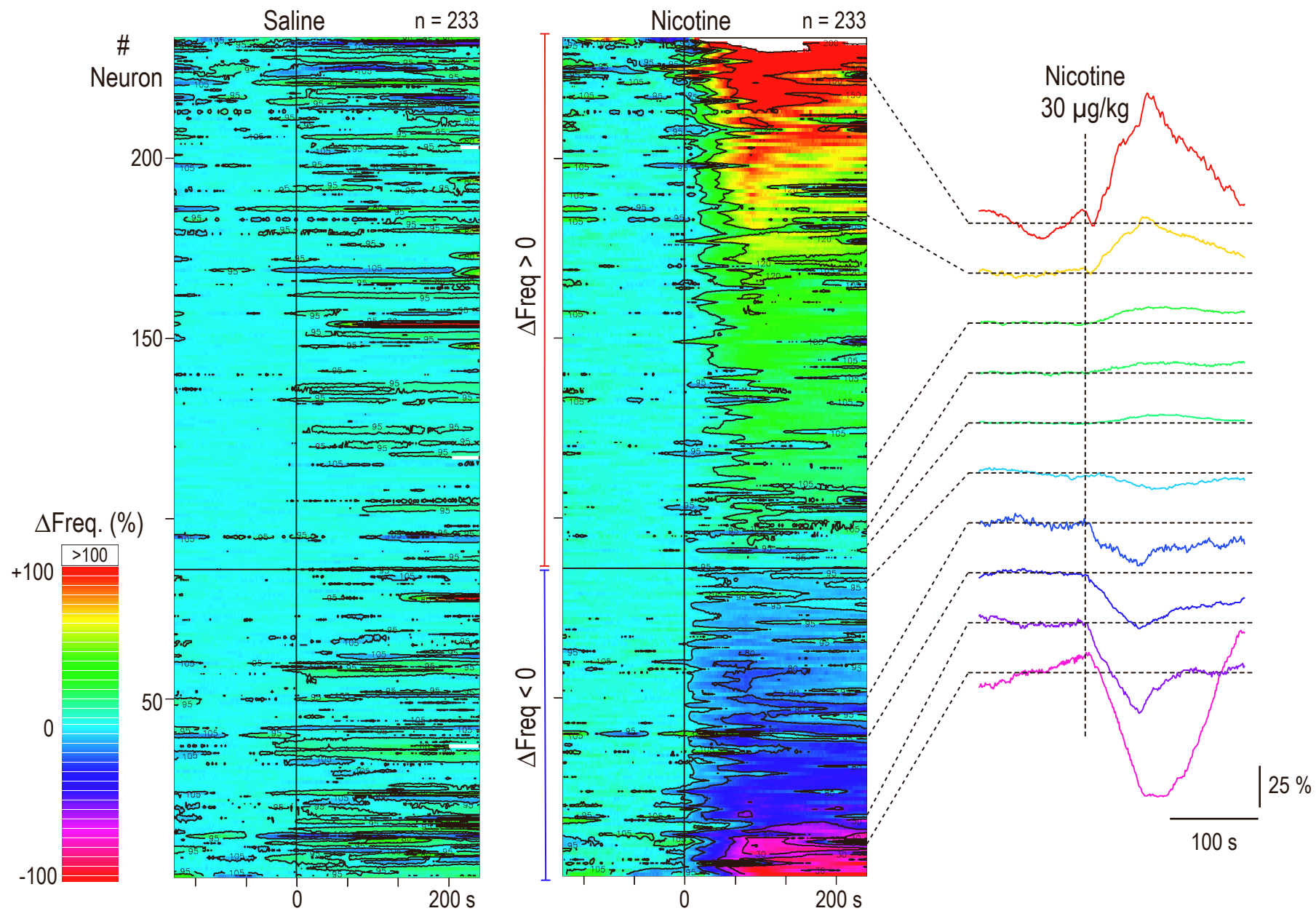
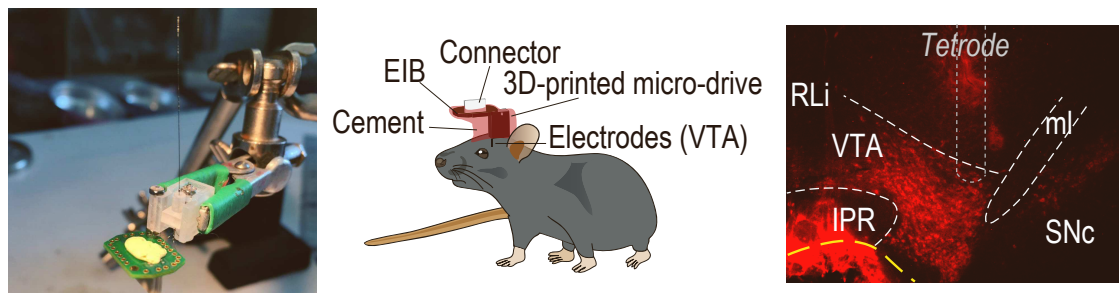


Figure S1

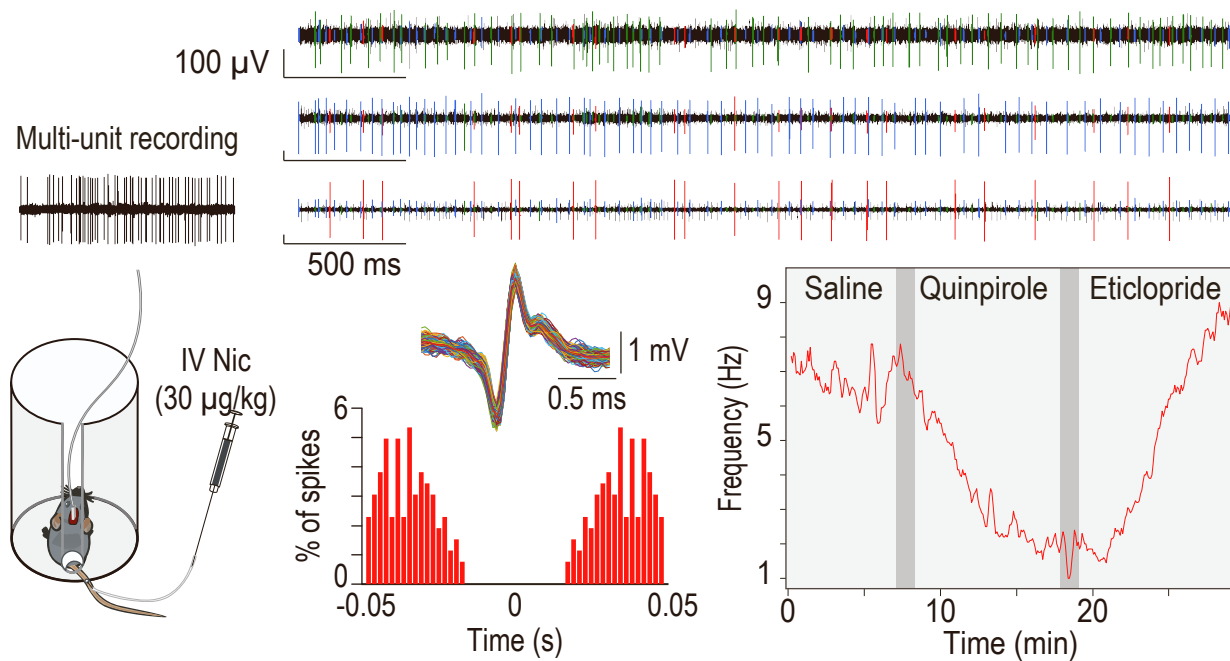
Figure S2: *In vivo* recordings of DA neurons: anesthetized and freely moving experiments. Related to Figure 1.

(A) From left to right: Picture of the micro-drive (upside-down view). Schematic of micro-drive implantation for *in vivo* recordings of freely moving mice. Histological slice showing tetrode implantation in the VTA. **(B)** Left: Schematic of the plastic cylinder used for IV nicotine injection into the tail vein during tetrode and fiber photometry recordings in freely moving animals. Right: Example of one multi-channel recording of three VTA neurons (color-coded after clustering on all channels, *top*). GABAergic neurons are in green and blue and a putative DA neuron is in red. DA neurons are characterized by electrophysiological criteria (firing frequency, bursting activity, regularity of firing and large refractory period as seen in the auto-correlogram, *bottom*) and their response to Quinpirole/Eticlopride (D2R selective agonist and antagonist respectively, *bottom right*). **(C)** Analysis of the spontaneous activity of NB-labeled DA neurons that were either activated (red) or inhibited (blue) by the nicotine injection. *Top*: Basal firing rates and percentage of spikes-within-burst (%SWB) between activated and inhibited neurons were not statistically different (Wilcoxon test $p = 0.051$ and $p = 0.064$). *Bottom*: Interval between SWB (in ms) as a function of the length of the burst (from two to seven action potentials).

A



B



C

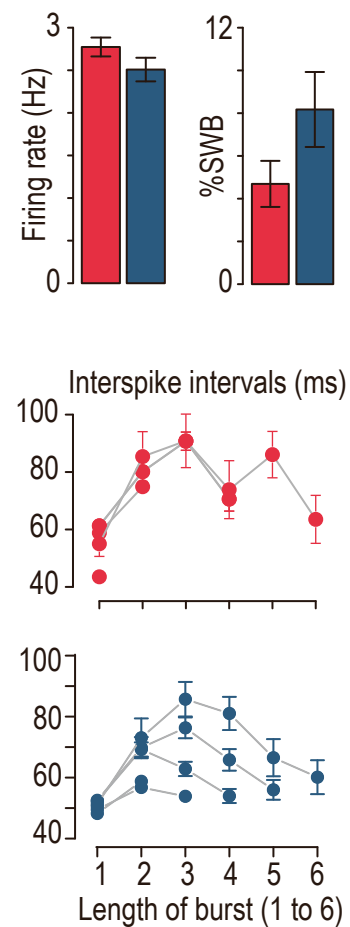


Figure S2

Figure S3: Localization of *in vivo* labeled DA neurons on anesthetized mice. Related to Figure 1.

Localization of VTA DA neurons labeled *in vivo* after juxtacellular recordings on anesthetized animals. Neurons are color-coded according to their responses to nicotine injection (activated in red, n = 155 and inhibited in blue, n = 88), and positioned according to the antero-posterior axis on the Paxinos atlas from Bregma -2.8 to -3.8 mm.

Antero-posterior axis

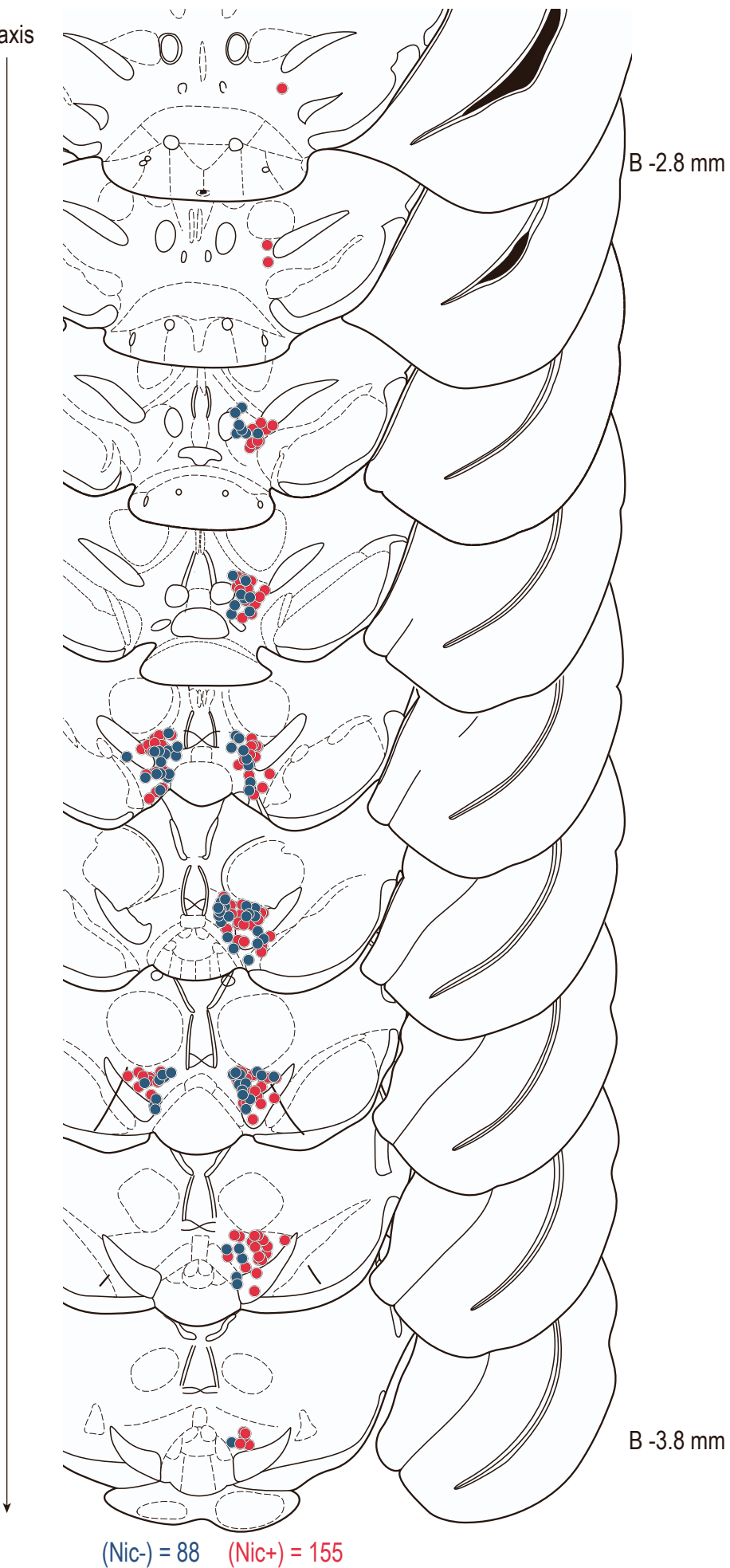


Figure S3

Figure S4: Retrobead injections into the NAc and Amg. Related to Figure 2.

(A, C) Examples of retrograde tracer (retrobeads RB, in yellow) injected in all of the NAc (A) and Amg sites (C), reported onto different Paxinos atlas slices. (B, D) Representative immunofluorescence images of VTA slices (TH+, red) revealing neurons containing RB (RB+, green), after RB injection into the NAc (B) or into the Amg (D). (E) *Left*: A Paxinos atlas slice at 3.3 mm from bregma, onto which neurobiotin-filled cell bodies of all recorded neurons from RB-injected mice were positioned (NAc-projecting neurons $n = 30$, gold and Amg-projecting neurons $n = 22$, purple). *Right*: Medio-lateral distribution (shown as density) of the neurons shown in E) that project either to the NAc (gold) or to the Amg (purple). Amg-projecting neurons were located more medially in the VTA than NAc-projecting neurons (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$). (F) Analysis of the spontaneous activity of NB-labeled DA neurons that were found RB+ after either NAc injection ($n = 30$, gold) or Amg injection ($n = 22$, purple). NAc-projecting DA neurons and Amg-projecting DA neurons displayed similar firing frequency (Wilcoxon test, $p = 0.8$). The Amg-projecting neurons tend to have a higher bursting activity even though it is not statistically different than the NAc-projecting neurons (Wilcoxon test, $p = 0.28$). IF: *interfascicular nucleus*; IPN: *interpeduncular nucleus*; ml: *medial lemniscus*; SNc: *substantia nigra pars compacta*

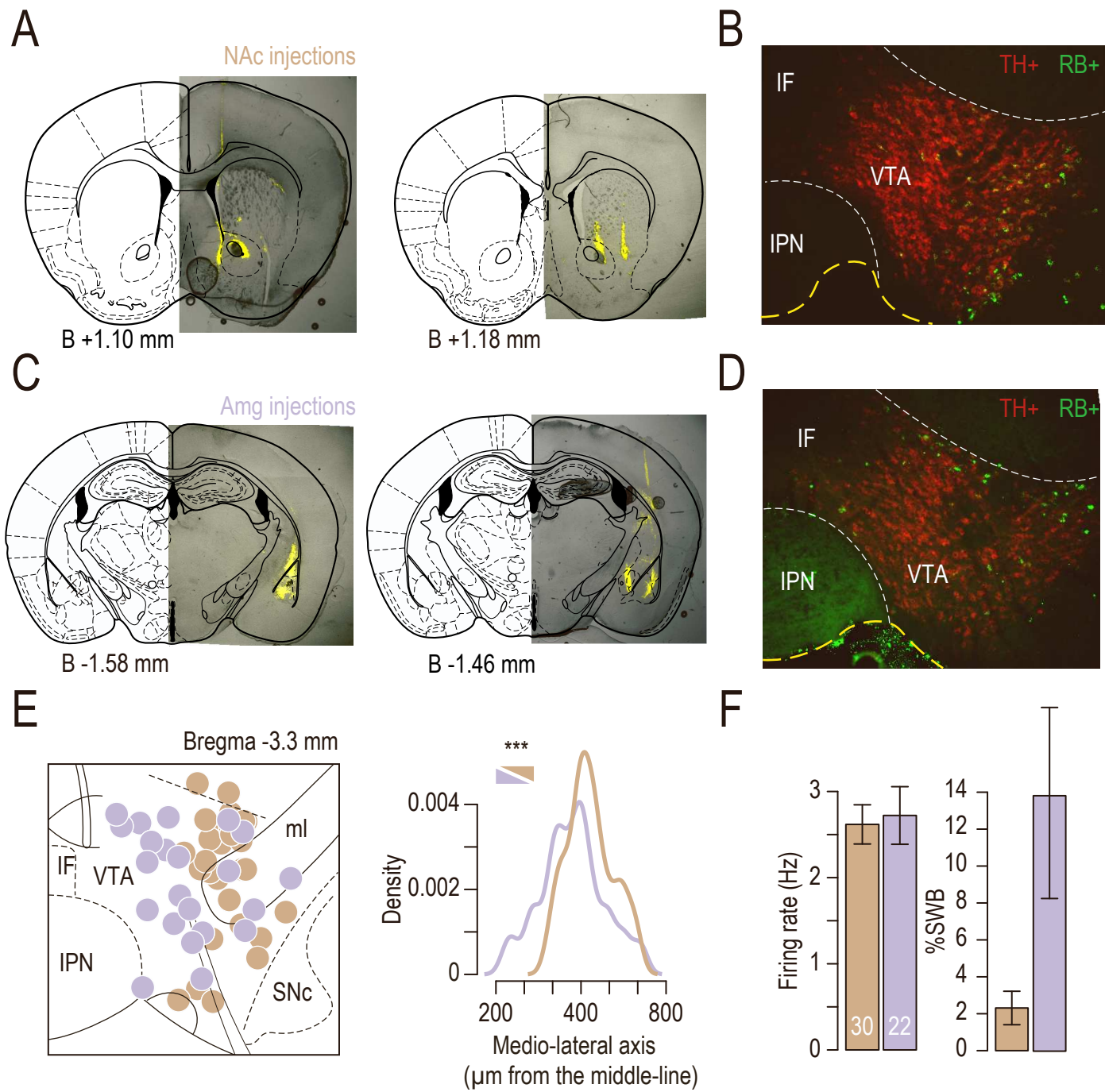


Figure S4

Figure S5: DA neurons projecting to either NAcMSh or NAcLSh are activated by nicotine injection. Related to Figure 2.

(A) Retrobeads (RB) were injected in the NAc Medial Shell (NAcMSh) of WT mice and VTA DA neuron responses to an IV nicotine injection (30 $\mu\text{g/kg}$) were recorded *in vivo* on anesthetized animals, and labeled with neurobiotin. Example of RB site in the NAcMSh (top) and retrobeads labelling in the VTA two weeks after injection (bottom). **(B)** *Post hoc* identification of NAcMSh-projecting DA neurons by immunofluorescent co-labeling of tyrosine hydroxylase (TH), neurobiotin (NB) and RB (scale bar 20 μm). Localization on the Paxinos atlas at bregma - 3.4 mm of NB-labeled DA neurons (NB+ TH+, $n = 22$) following RB injection ($\bullet$ RB+, $\circ$ RB-) into the NAcMSh. Red and blue colors denote nicotine-activated (Nic+) and nicotine-inhibited (Nic-) neurons, respectively. (RB+ Nic+, $n = 14$, RB+ Nic-, $n = 0$; RB- Nic+, $n = 5$; RB- Nic-, $n = 3$). **(C)** *Top*: Percentage and number of Nic+ (red) and Nic- (blue) cells among NAcMSh-projecting DA neurons (RB+). Mean change in firing frequency of NAcMSh-projecting DA neurons in response to an IV injection of nicotine (red) or saline (grey). *Bottom*: Percentage and number of Nic+ (red) and Nic- (blue) cells in non-RB-labeled neurons (RB-). Mean change in firing frequency of RB- DA neurons in response to an IV injection of nicotine (black) or saline (grey). **(D)** Firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by nicotine (Nic) injection in RB+ (*left*, mean $\Delta = +0.50$ Hz) or RB- (*right*, mean $\Delta = +0.05$ Hz) DA neurons. (Comparison between mean firing rate during baseline and maximum firing rate after injection: paired Wilcoxon test, *** p (RB+) < 0.001, p (RB-) = 0.64; Comparison between nicotine-induced firing rate variation evoked in RB+ and RB- DA neurons: Wilcoxon test, ** $p = 0.004$). Mean scores are represented in black, and individual scores in red or blue. **(E)** RB were injected in the NAc Lateral Shell (NAcLSh) of WT mice and VTA DA neuron responses to an IV nicotine injection were recorded as in (A). **(F)** Localization of NB-labeled DA neurons (NB+ TH+, $n = 12$) following RB injection into the NAcLSh. (RB+ Nic+, $n = 6$; RB+ Nic-, $n = 0$; RB- Nic+, $n = 4$; RB- Nic-, $n = 3$) and example of NB-labelled identified DA neuron (scale bar 20 μm). **(G)** Same as in (C) for NAcLSh -projecting (RB+) DA neurons (*top*) and for non-RB-labeled (RB-) neurons (*bottom*) when RB were injected in the NAcLSh. **(H)** Same as in (D) for NAcLSh -projecting (RB+) DA neurons (*left*, mean $\Delta = +0.73$ Hz) and for non-RB-labeled (RB-) neurons (*right*, mean $\Delta = -0.23$ Hz). (Comparison between mean firing rate during baseline and maximum firing rate after injection: paired Wilcoxon test, * p (RB+) = 0.03, p (RB-) = 0.8; Comparison between nicotine-induced firing rate variation evoked in RB+ and RB- DA neurons: Wilcoxon test, $p = 0.13$). Mean scores are represented in black, and individual scores in red or blue.

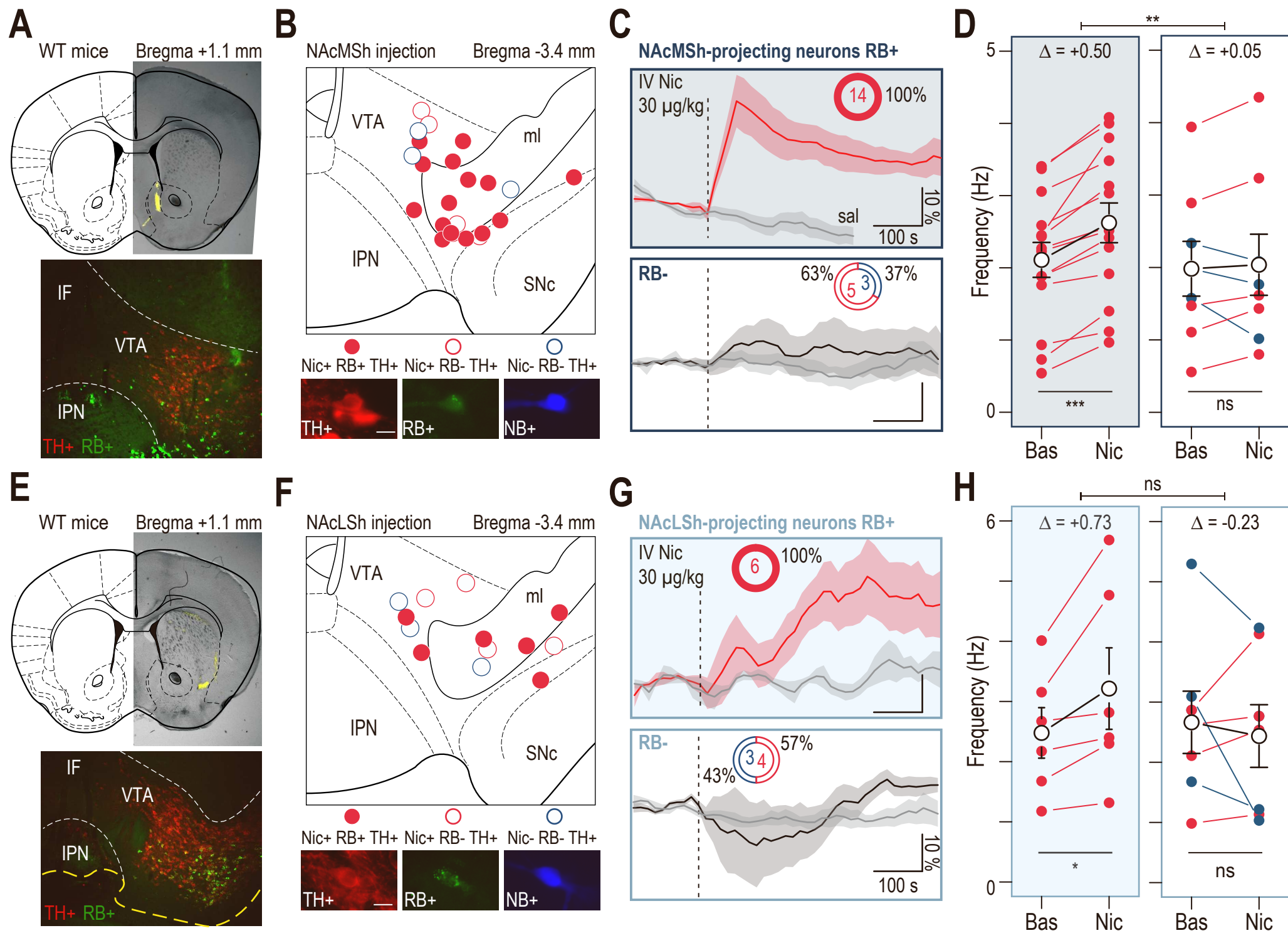


Figure S5

Figure S6: VTA DA neurons projecting to the Amg are more excitable but not more reactive to nicotine than NAc-projecting DA neurons. Related to Figure 2.

(A) Immunofluorescence image of VTA DA (TH+) neurons projecting to the NAc (retrobeads, RB+) labeled after patch-clamp recording (neurobiotin, NB+). **(B)** Immunofluorescence image of an Amg-projecting (RB+) VTA DA (TH+) neuron labeled after patch-clamp recording (neurobiotin, NB+). **(C)** Firing of NAc-projecting and Amg-projecting VTA DA neurons after current injections (20, 60 and 100 pA). **(D)** Higher excitability of Amg-projecting (n = 15, purple) compared to NAc-projecting (n = 13, gold) DA neurons (two-way RM ANOVA main effect phenotype $F(1,26) = 4.96$, * $p = 0.035$, current $F(4,104) = 15.97$, *** $p < 0.001$, current x phenotype interaction $F(4,104) = 13.78$, *** $p < 0.001$). **(E)** Nicotine-evoked currents (local puff 100 μ M) in RB+-identified, NAc- or Amg-projecting VTA DA neurons recorded in brain slices (whole-cell voltage-clamp mode -60 mV). **(F)** Mean currents evoked by nicotine in either NAc-projecting (n = 16, gold, 33.0 ± 19.8 pA) or Amg-projecting (n = 17, purple, 22.4 ± 13.3 pA) VTA DA neurons were not statistically different (Student's t-test, $p = 0.08$).

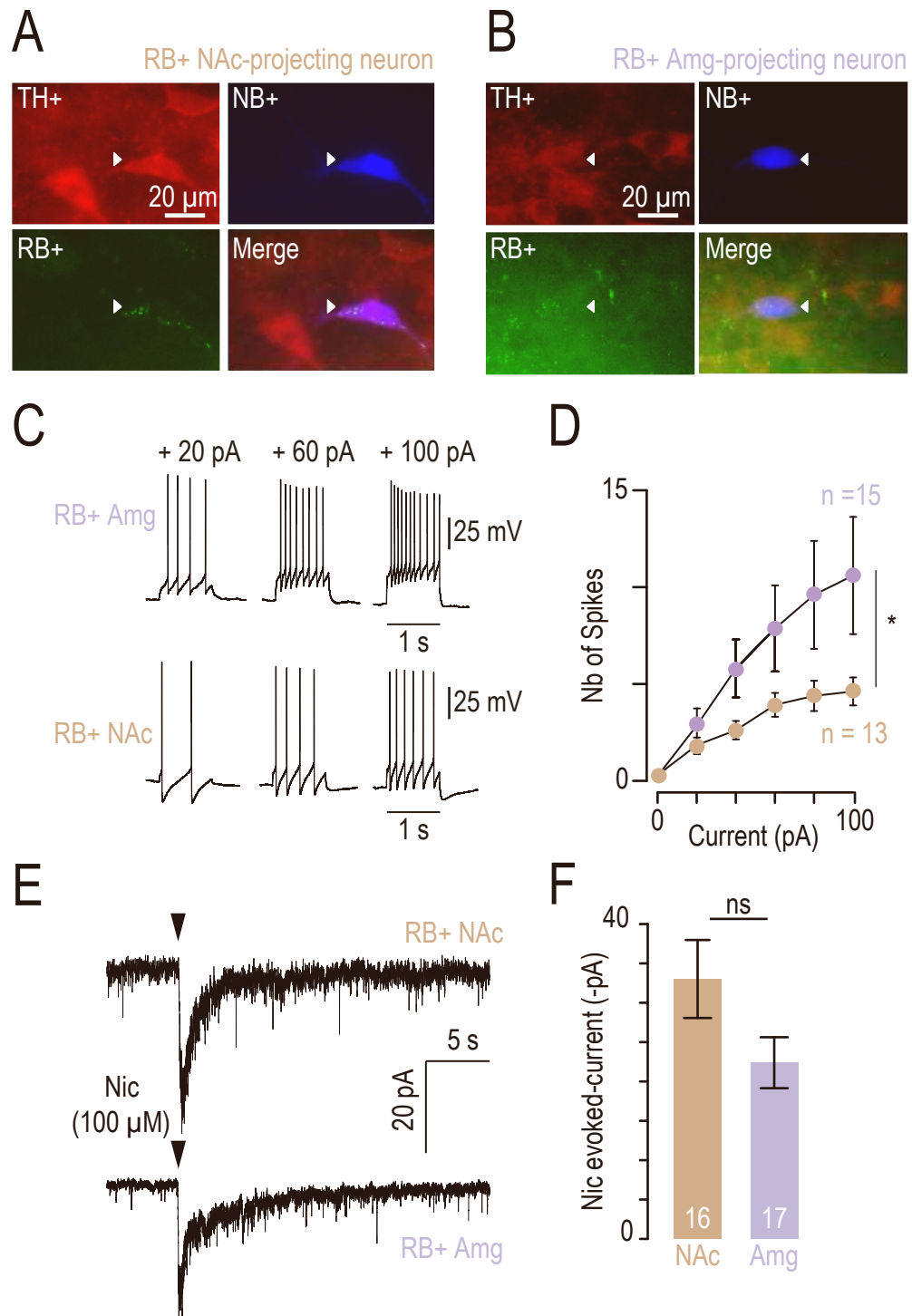


Figure S6

Figure S7: Detailed analysis of nicotine-induced anxiety-like behaviors and the role of $\beta 2$ subunit-containing nAChR. Related to Figure 3.

(A) *Left*: Individual data for Figure 3A, Sal (grey, $n = 23$) or Nic (black, $n = 21$), solid colors indicate group means, individual data with open gray dots (one-way RM ANOVA Nic: $F_{(2,40)} = 5.18$, ** $p = 0.01$; Sal: $F_{(2,44)} = 1.65$, $p = 0.2$). *Right*: Mean number of open arm entries during elevated O-maze (EOM) test (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,84)} = 8.02$, *** $p < 0.001$). **(B)** Locomotor activity was measured in a square open field (OF) following an intraperitoneal (IP) injection of either saline (IP Sal, grey, $n = 6$) or nicotine (IP Nic 0.5 mg/kg, black, $n = 6$) in WT mice. No difference was observed in the distance traveled over time (two-way RM ANOVA no time, no treatment or interaction effect, $p > 0.05$) or in the total distance traveled during 9 minutes (*inset*, Student's t-test, $p > 0.05$). **(C)** Example of *post hoc* verification of intracranial guide cannula implantations in WT mice. Bilateral injection cannulas (0.5 μm longer than the guide cannulas) are inserted on the day of the experiment for local infusion into the VTA. Tyrosine hydroxylase (TH) labeling is shown in yellow. **(D)** *Left*: Individual data for Figure 3B, intracranial (IC) infusion of Sal (grey, $n = 6$) or Nic (red, $n = 7$) 1 mg/mL 1 minute before the test (one-way RM ANOVA Nic: $F_{(2,12)} = 26.11$, *** $p < 0.001$; Sal: $F_{(2,10)} = 0.01$, $p = 0.99$). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots. *Right*: Mean number of open arm entries during EOM test (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,20)} = 8.25$, ** $p = 0.002$). **(E)** Schematic of $\beta 2$ subunit re-expression by lentiviral vectorization in the VTA of $\beta 2^{-/-}$ mice. Lentiviruses encoding either pGK- $\beta 2$ -IRES-GFP ($\beta 2^{-/-}$ Vec) or pGK-GFP ($\beta 2^{-/-}$ GFP, used as a control) were injected into the VTA. Representative immunofluorescence image of a $\beta 2^{-/-}$ Vec mouse brain labeled for TH (red) and GFP (green). **(F)** Percentage of time spent in the open arms of the EOM by $\beta 2^{-/-}$ GFP mice ($n = 6$, green) and $\beta 2^{-/-}$ mice ($n = 17$, grey) was not different (two-way RM ANOVA no time, no treatment or interaction effect, $p > 0.05$). **(G)** *Left*: Individual data for Figure 3D, $\beta 2^{-/-}$ mice ($n = 23$, green) and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice ($n = 18$, brown) after IP injection of Nic 0.5 mg/kg 1 minute before the test (one-way RM ANOVA for $\beta 2^{-/-}$ Vec mice: $F_{(2,34)} = 8.65$, *** $p < 0.001$; and for $\beta 2^{-/-}$ mice: $F_{(2,44)} = 1.08$, $p = 0.3$). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots. *Right*: Mean number of open arm entries from $\beta 2^{-/-}$ GFP or $\beta 2^{-/-}$ mice in this test (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,78)} = 7.26$, ** $p = 0.001$).

IF: *interfascicular nucleus*; IPN: *interpeduncular nucleus*; SNc: *substantia nigra pars compacta*; ml: *medial lemniscus*; SNc: *substantia nigra pars compacta*.

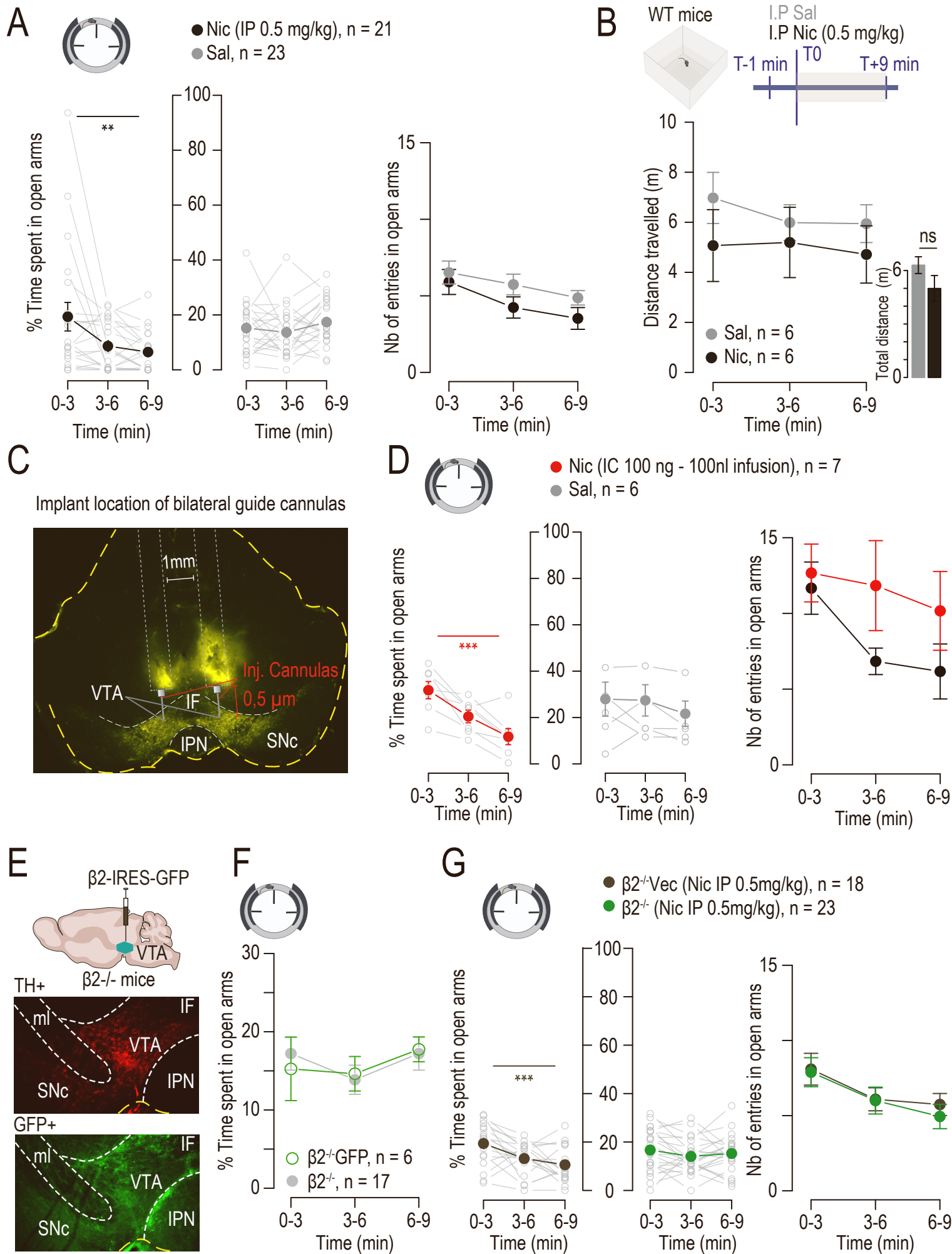


Figure S7

Figure S8: $\beta 2$ nAChR subunit re-expression in the VTA restores DA neuron response to nicotine injection. Related to Figure 3.

(A) Density plot of percentage of firing variation induced by IV injection of either saline (Sal, grey, $n = 46$) or nicotine (Nic, black, $n = 46$) in $\beta 2^{-/-}$ mice (Kolmogorov-Smirnov test, $p = 0.7$). (B) Firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by Nic and Sal injection in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice DA neurons with increase ($\Delta fr > 0$) or decrease ($\Delta fr < 0$) in firing frequency after Nic injection. Comparison between mean firing rate during baseline and maximum firing rate after injection (paired Wilcoxon test, *** $p < 0.001$), comparison between saline-induced and Nic-induced firing rate variation (Wilcoxon test, $p(\Delta fr > 0) = 0.07$, $p(\Delta fr < 0) = 0.4$). (C) Density plot of percentage of firing variation induced by IV Sal or Nic injection in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice (Sal: grey, $n = 79$, Nic: black, $n = 90$). (Kolmogorov-Smirnov test, * $p = 0.024$). (D) Firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by Nic and Sal injection in $\beta 2^{-/-}$ Vec mice DA neurons with increase ($\Delta fr > 0$) or decrease ($\Delta fr < 0$) in firing frequency after Nic injection. Comparison between mean firing rate during baseline and maximum firing rate after injection (paired Wilcoxon test, *** $p < 0.001$), comparison between saline-induced and Nic-induced firing rate variation (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$). Mean scores are represented in black, and individual scores in grey. (E) Time course for the average change in firing frequency upon saline (grey) or nicotine injection for activated (Nic+, in red) and inhibited (Nic-, in blue) VTA DA neurons in $\beta 2^{-/-}$ and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice. Comparison between saline-induced and nicotine-induced firing rate variation (paired Wilcoxon test, ** $p = 0.0015$, *** $p < 0.001$). (F) Firing rate variation (Δ) from baseline (Bas) induced by Nic injection in Nic+ or Nic- DA neurons in $\beta 2^{-/-}$ and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice. Comparison between mean firing rate during baseline and maximum firing rate after Nic injection (paired Wilcoxon test, * $p = 0.015$, *** $p < 0.001$), comparison between Nic-induced firing rate variation in $\beta 2^{-/-}$ and $\beta 2^{-/-}$ Vec mice (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$). Mean scores are represented in black, and individual scores in grey. In panels B and D, all neurons are considered, while in E and F only responding neurons (i.e those with a statistically significant increase (Nic+) or decrease (Nic-) in firing rate in response to Nic injection, see bootstrapping in Methods) are included.

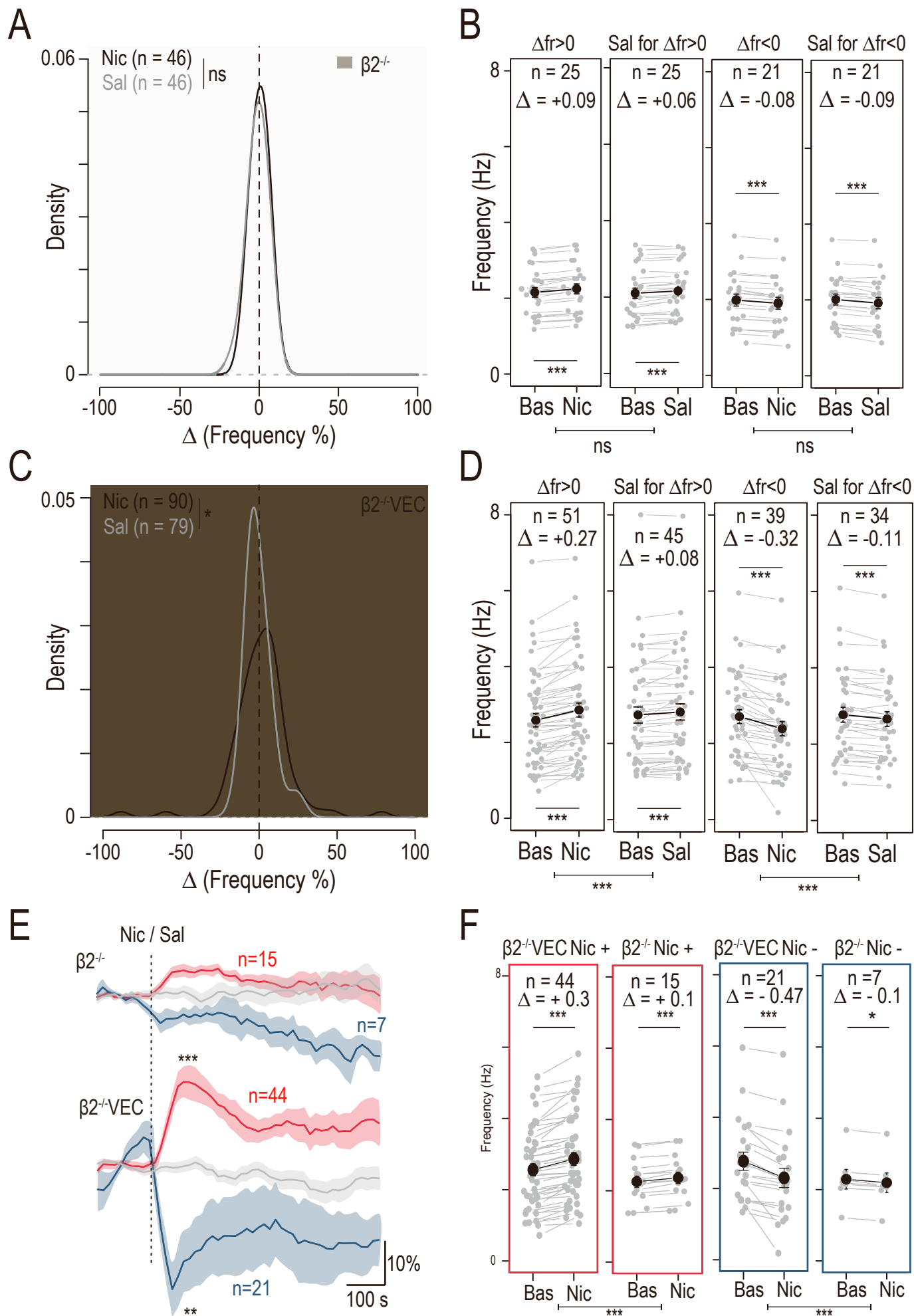


Figure S8

Figure S9: Temporally specific control of DA neuron firing with Jaws and CatCh. Related to Figure 4.

(A) Representative immunofluorescence image of VTA DA neurons after patch-clamp recordings in mice injected with AAV-Ef1 α -DIO-Jaws-eGFP into the VTA. Neurobiotin (NB, blue), tyrosine hydroxylase (TH, red), GFP (green) (scale bar 20 μ m). **(B)** Example of a recording trace of a VTA DA neuron during continuous light stimulation (highlighted in yellow, 20 s, 520 nm) and raster plot of action potentials showing light-induced inhibition in Jaws-expressing DA neurons ($n = 7$). **(C)** Representative immunofluorescence image of VTA DA neurons (NB, blue; TH, red; GFP, green) after patch-clamp recording in mice injected with AAV-DIO-hCatCh-YFP into the VTA (scale bar 20 μ m). **(D)** Example of recording trace of a DA neuron of the VTA during light stimulation (10 Hz, 5-ms pulse, 470 nm) and light-evoked inward current in DA neurons expressing CatCh. Mean light-evoked currents in seven DA neurons.

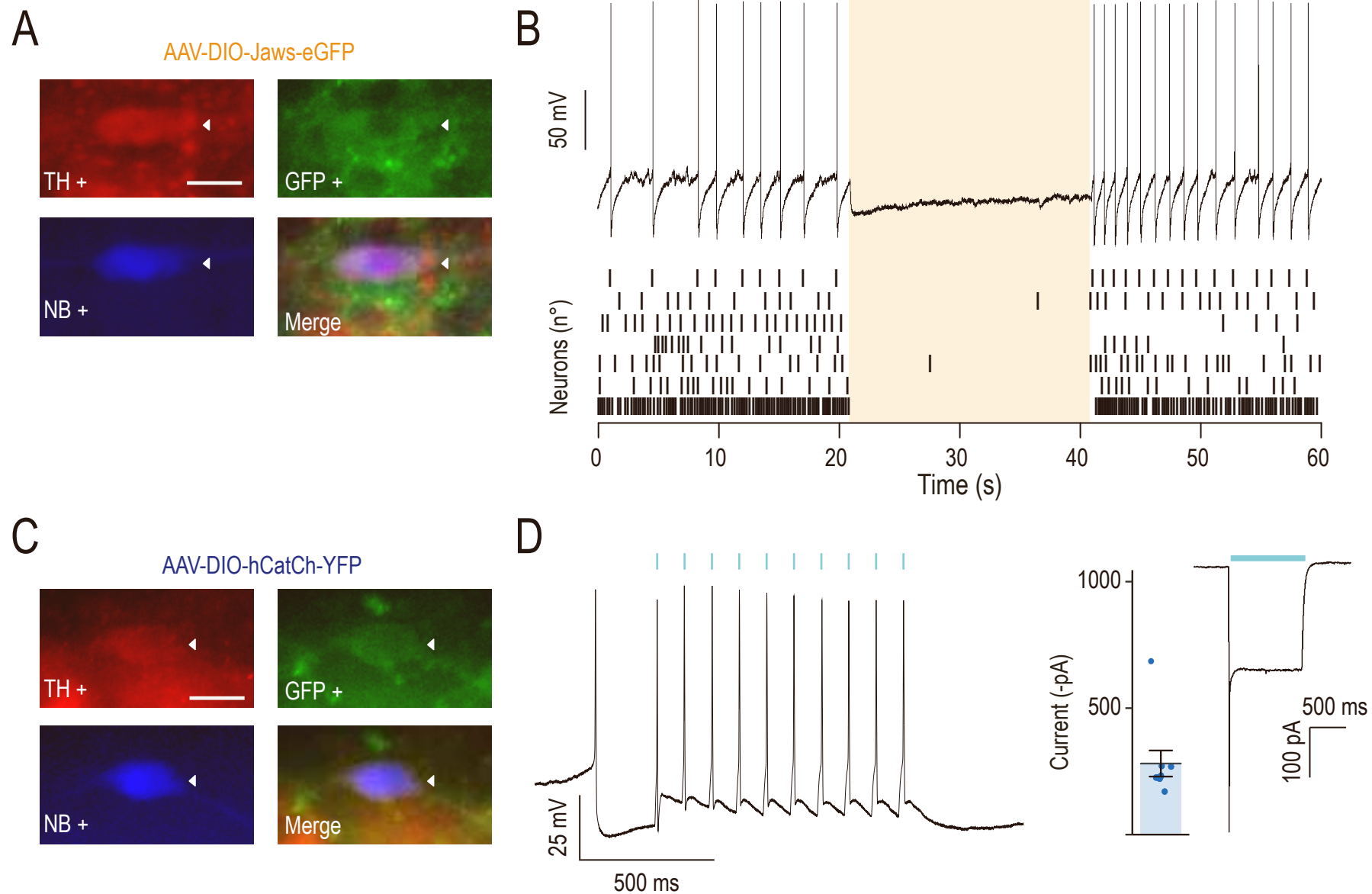


Figure S9

Figure S10: Fiber locations for optogenetic experiments. Related to Figure 4.

(A) Representative immunofluorescence images of VTA sections after AAV-DIO-Jaws-eGFP or AAV-DIO-YFP injection into the VTA. **(B)** Representative immunofluorescence images of VTA sections after AAV-Ef1 α -DIO-hCatCh-YFP or AAV-Ef1 α -DIO-YFP injection into the VTA. **(C)** Verification of fiber implantations into the basolateral Amygdala (BLA) of mice used in optogenetic experiments, positioned onto Paxinos atlas slices from bregma -1.22 to -1.82 mm. *Left side*: orange dots indicate fiber tip location for mice injected with Jaws (n = 13), and green dots indicate fiber location in YFP controls (n = 10). *Right side*: blue dots indicate fiber tip location for mice injected with CatCh (n = 16), and green dots indicate fiber location in YFP controls (n = 11). **(D)** Verification of fiber implantations into the NAc lateral shell (NAcLSH) of mice used in optogenetic experiments, positioned onto Paxinos atlas slices from bregma + 0.86 to + 1.54 mm. *Left side*: blue dots indicate fiber tip location for mice injected with CatCh (n = 13), and green dots indicate fiber tip positions in YFP controls (n = 14). *Right side*: orange dots indicate fiber tip location for mice injected with Jaws (n = 11), and green dots indicate fiber tip location in YFP controls (n = 12).

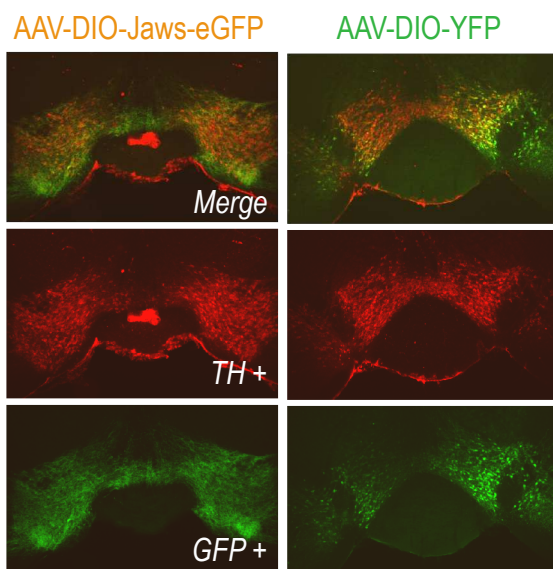
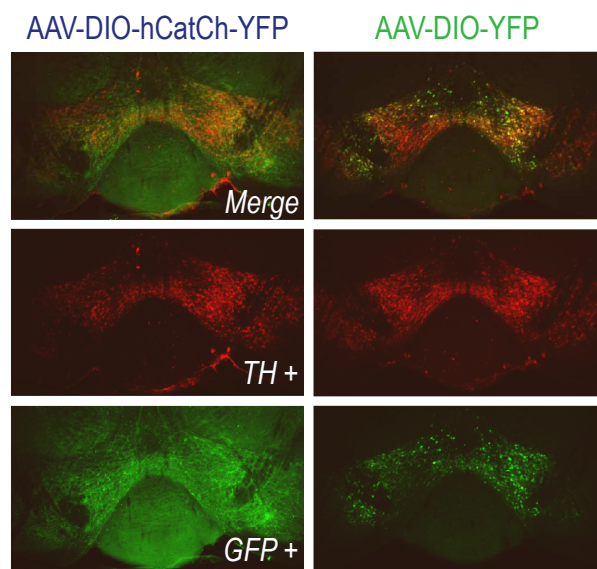
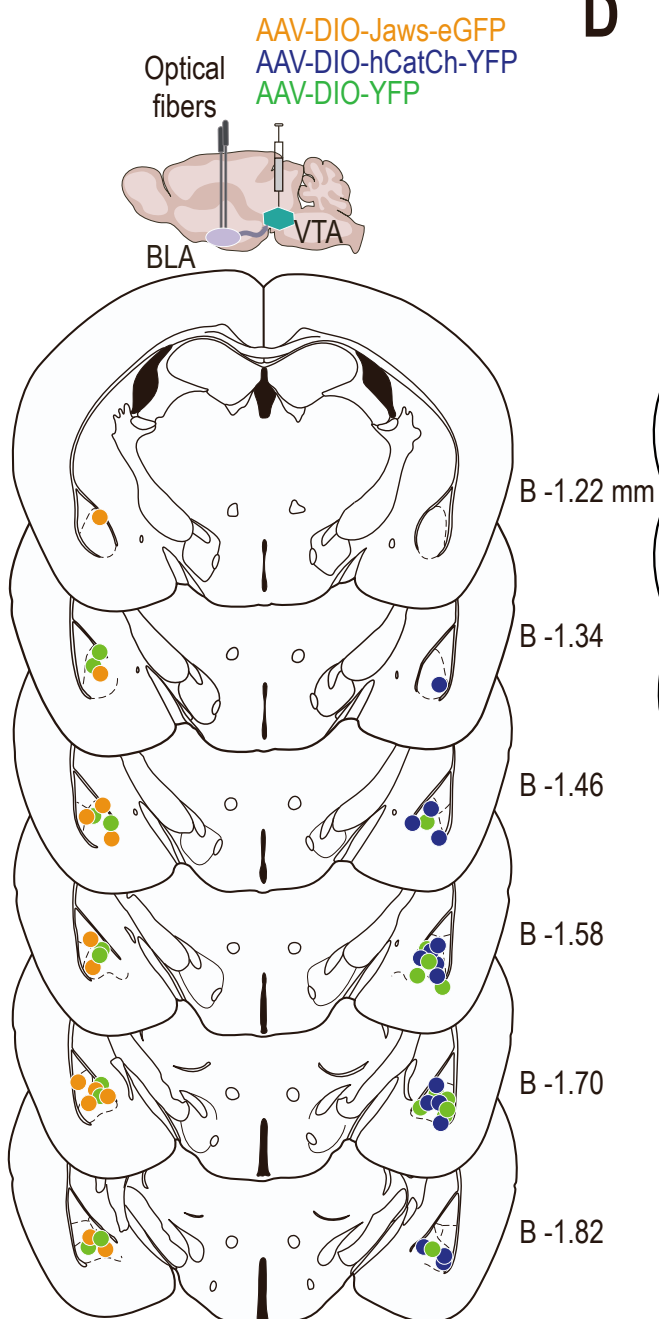
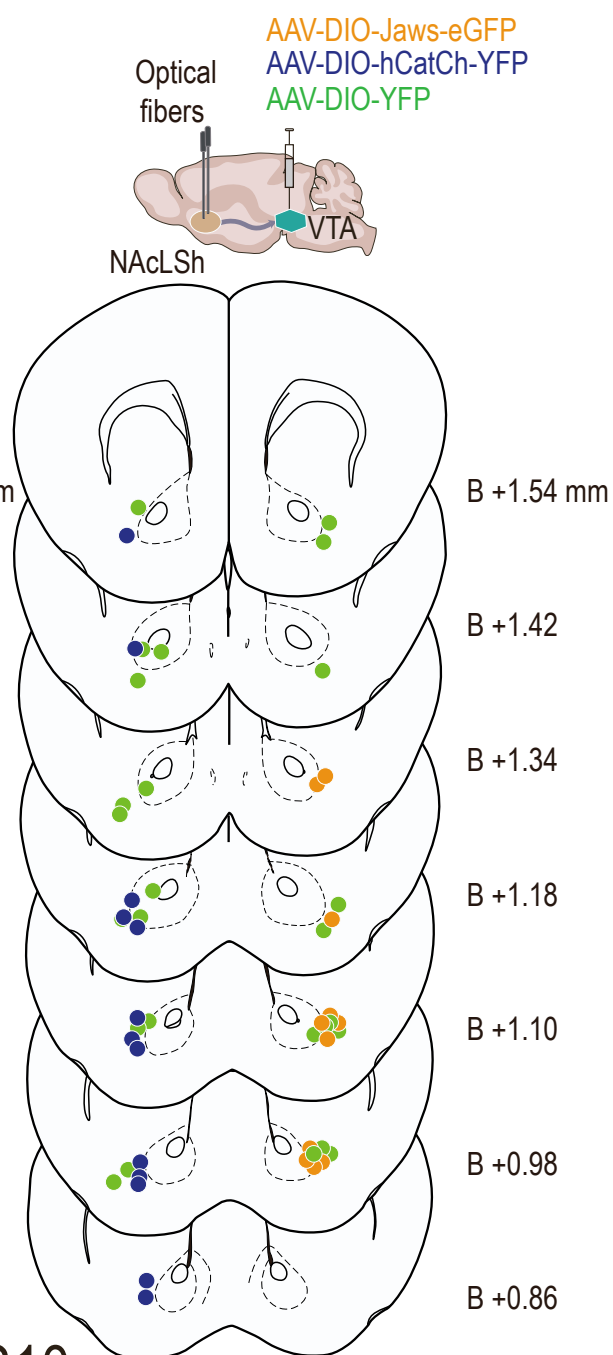
A**B****C****D**

Figure S10

Figure S11: Detailed analysis of optogenetic effects on elevated O-maze test and locomotor behavior. Related to Figure 4.

(A) *Left*: Individual data for Figure 4A (Jaws, $n = 18$, orange, one-way RM ANOVA $F_{(2,34)} = 5.28$, ** $p = 0.01$; YFP, $n = 19$, green, one-way RM ANOVA $F_{(2,36)} = 0.32$, $p = 0.7$). *Middle*: Time spent in open arms for mice injected with Jaws during the 10 first minute of EOM, divided in two groups depending on the location of the animal, either in open arms (OA, white) or closed arms (CA, gray) at the onset of the stimulation (two-way RM ANOVA OA vs CA main light effect $F_{(1,17)} = 9.02$, ** $p = 0.008$, no effect of position $F_{(1,17)} = 0.003$, $p = 0.96$). *Right*: Open arm entries during EOM (two-way RM ANOVA Jaws vs YFP no effect of time or opsin). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots. **(B)** *Left*: Individual data for Figure 4B (CatCh, $n = 18$, blue, one-way RM ANOVA $F_{(2,34)} = 9.27$, *** $p < 0.001$; YFP, $n = 19$, green, one-way ANOVA $F_{(2,36)} = 0.01$, $p = 0.99$). *Middle*: Time spent in open arms for mice injected with CatCh during the 10 first minutes of EOM, divided in two groups depending on the location of the animal, either in open arms (OA, white) or closed arms (CA, gray) at the onset of the stimulation (two-way RM ANOVA OA vs CA main light effect $F_{(1,16)} = 16.56$, *** $p < 0.001$, no effect of position $F_{(1,16)} = 0.32$, $p = 0.57$). *Right*: Open arm entries during EOM (two-way RM ANOVA CatCh vs YFP no effect of time or opsin). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots. **(C)** Locomotor activity was assessed in a novel open field (OF) in the three paired groups. *Top*: Jaws-injected ($n = 20$) and YFP-injected mice ($n = 20$) with fibers implanted in the BLA (two-way RM ANOVA, main time effect $F_{(2,76)} = 44.27$, *** $p < 0.001$, no opsin or interaction effect). *Bottom*: CatCh-injected ($n = 13$) and YFP-injected mice ($n = 10$) implanted in the BLA (two-way RM ANOVA, main time effect $F_{(2,42)} = 25.17$, *** $p < 0.001$, no opsin or interaction effect).

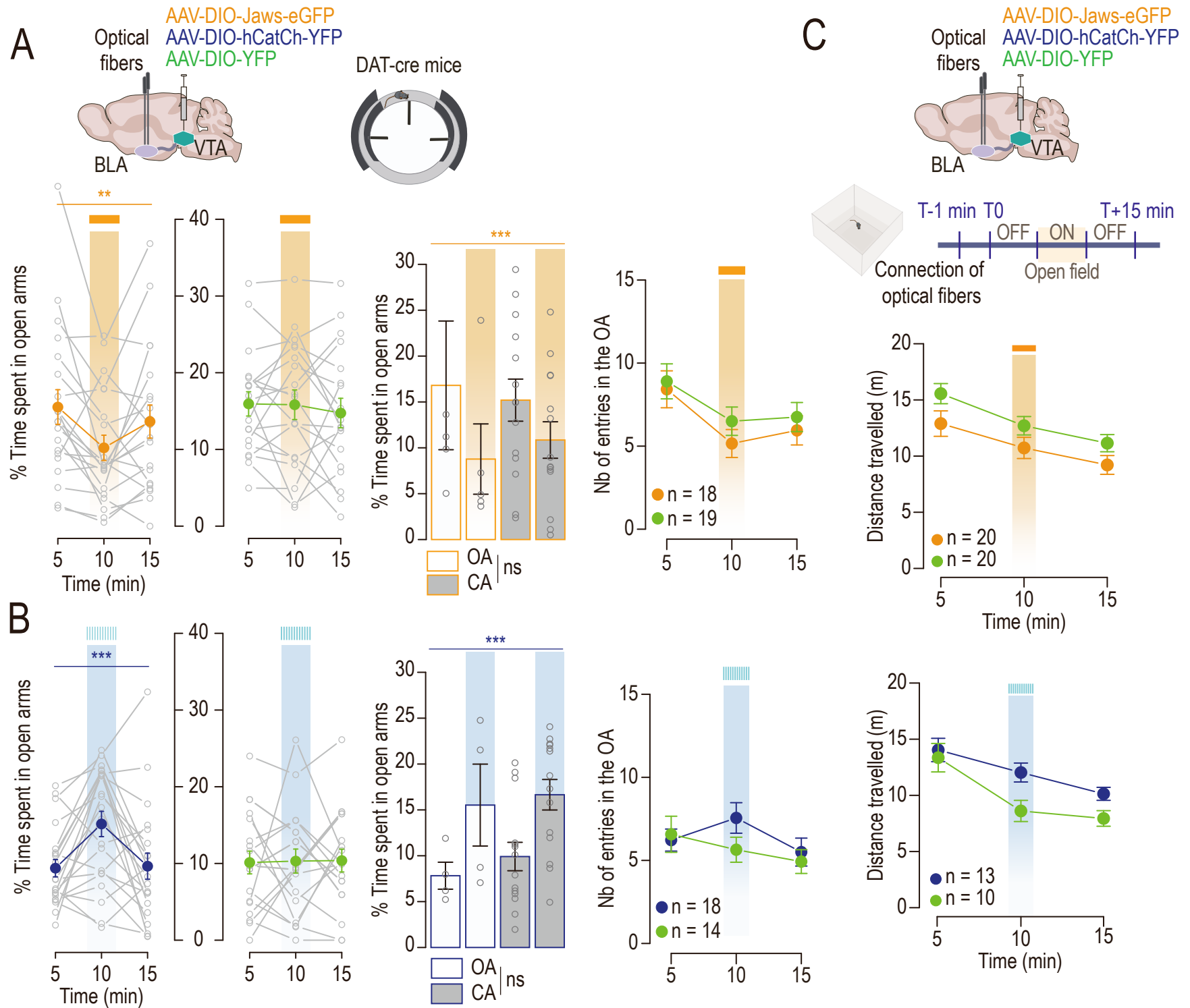


Figure S11

Figure S12: Inhibition of VTA terminals in the BLA, but not the CeA, produces anxiety-like behavior.
Related to Figure 4.

(A) *Left*: Representative immunofluorescence image of a VTA section with AAV-CAG-Jaws-GFP (Jaws) expression (GFP: green labeling, TH: red labeling). *Right*: Optical fibers were implanted in the basolateral Amy (BLA) of wild-type (WT) mice injected either with Jaws (orange dots represent the fiber tip location, $n = 7$) or with AAV-CAG-GFP (GFP, green dots, $n = 3$) in the VTA. **(B)** *Left*: Representative immunofluorescence image of a VTA section with Jaws expression (GFP: green labeling, TH: red labeling). *Right*: Optical fibers were bilaterally implanted in the central amygdala (CeA) of a separate group of WT mice injected with either Jaws (orange dots represent the fiber tip location, $n = 7$) or with GFP (green dots, $n = 7$) in the VTA. **(C)** Photo-inhibiting VTA axon terminals in the BLA using Jaws during the EOM in the same mice induced a decrease in the time spent in the open arms compared to the control group (two-way RM ANOVA, time x opsin interaction $F_{(2,42)} = 3.44$, $* p = 0.04$, *post hoc* Student's t-test p (ON Jaws vs GFP) = 0.056; *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections Jaws $*p$ (5 minutes vs 10 minutes) = 0.01; $** p$ (10 minutes vs 15 minutes) = 0.005). **(D)** Photo-inhibiting VTA terminals in the CeA did not produce any difference in the amount of time spent in the open arm of the EOM test (two-way RM ANOVA, time x opsin interaction $F_{(2,32)} = 3.67$, $* p = 0.04$, *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections $p > 0.05$). **(E)** Mice implanted in the BLA were tested for any difference in locomotor activity between groups in the open field (OF). The test lasted 15 minutes and consisted of a 5-minute period of photostimulation (continuous at 520 nm) in between two non-stimulation periods (OFF-ON-OFF). During both OFF- and ON-periods, the groups did not present any statistically significant difference in the distance traveled in the OF (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,44)} = 5.89$, $** p = 0.005$, no opsin or interaction effect, *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections, $p > 0.05$). **(F)** Photo-inhibiting VTA terminals in the CeA did not produce any statistically significant difference in locomotor activity in the OF test between the Jaws- and GFP-expressing groups (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,32)} = 23.11$, $*** p < 0.001$, time x opsin interaction $F_{(2,32)} = 3.8$, $* p = 0.03$, no opsin effect, *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections, $p > 0.05$).

IF: *interfascicular nucleus*; IPN: *interpeduncular nucleus*; ml: *medial lemniscus*; SNc: *substantia nigra pars compacta*.

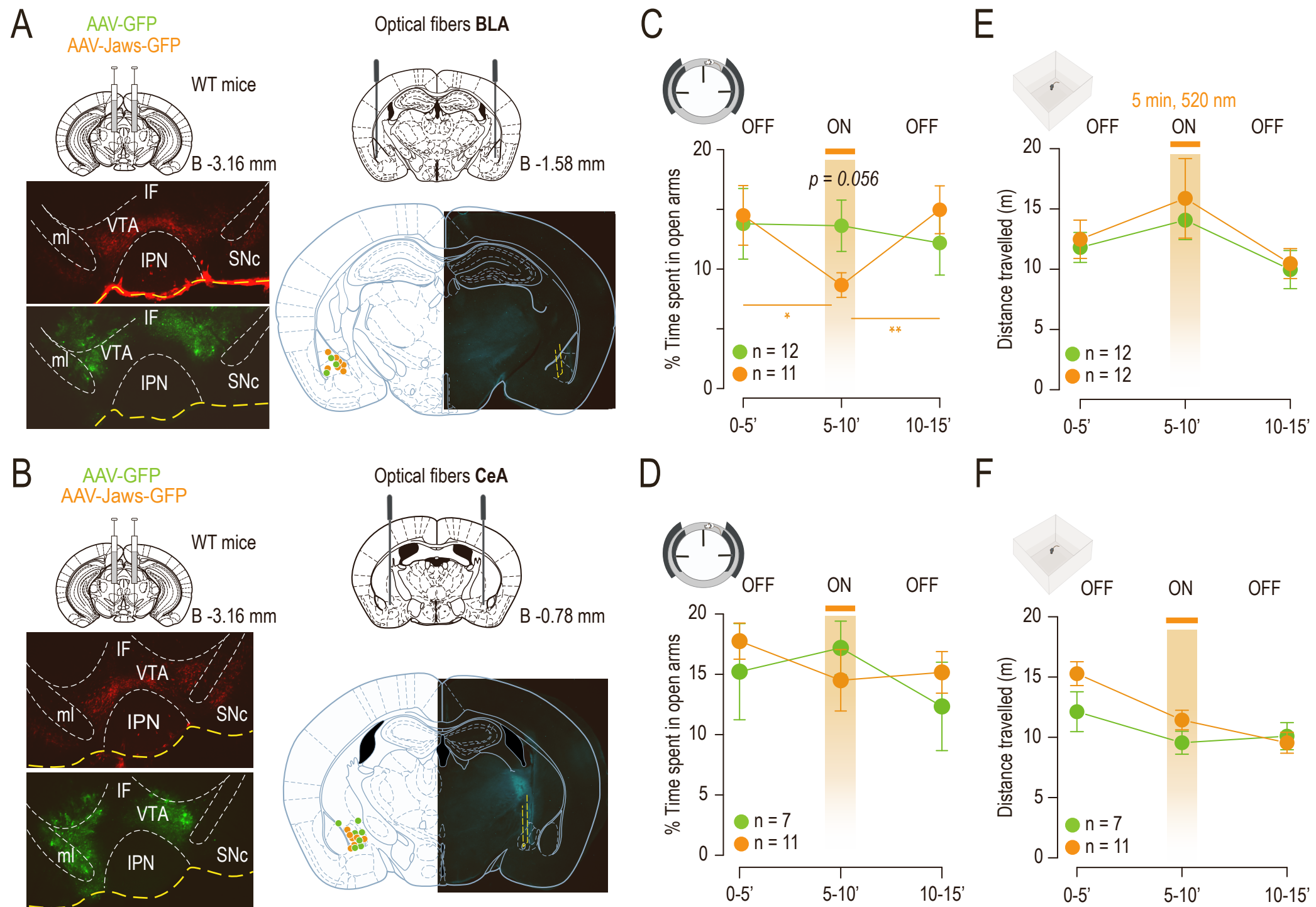


Figure S12

Figure S13: Detailed analysis of optogenetic stimulations of NAcLSH in elevated O-maze test and locomotor behavior. Related to Figure 5.

(A) *Left:* Individual data for Figure 5A (CatCh, $n = 13$, blue, one-way RM ANOVA $F_{(2,24)} = 0.61$, $p = 0.6$; YFP, $n = 14$, green, one-way RM ANOVA $F_{(2,26)} = 1.47$, $p = 0.3$). *Middle:* Time spent in open arms for mice injected with CatCh during the 10 first minute of EOM, divided in two groups depending on the location of the animal, either in open arms (OA, white) or closed arms (CA, gray) at the onset of the stimulation (two-way RM ANOVA OA vs CA no effect of light $F_{(1,11)} = 0.46$, $p = 0.5$, or position $F_{(1,11)} = 1.35$, $p = 0.27$). *Right:* Open arm entries during EOM (two-way RM ANOVA CatCh vs YFP no effect of time or opsin). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots.

(B) *Left:* Individual data for Figure 5B (Jaws, $n = 12$, orange, one-way RM ANOVA $F_{(2,22)} = 0.25$, $p = 0.8$; YFP, $n = 12$, green, one-way RM ANOVA $F_{(2,22)} = 0.93$, $p = 0.4$). *Middle:* Time spent in open arms for mice injected with Jaws during the 10 first minute of EOM, divided in two groups depending on the location of the animal, either in open arms (OA, white) or closed arms (CA, gray) at the onset of the stimulation (two-way RM ANOVA OA vs CA no effect of light $F_{(1,11)} = 0.18$, $p = 0.67$, or position $F_{(1,11)} = 1.9$, $p = 0.19$). *Right:* Open arm entries during EOM (two-way RM ANOVA Jaws vs YFP no effect of time or opsin). Group means are shown by solid color points, individual data with open gray dots.

(C) Locomotor activity was assessed in a novel open field (OF) in the three paired groups. *Top:* CatCh-injected ($n = 13$) and YFP-injected mice ($n = 14$) implanted in the NAcLSH (two-way RM ANOVA, main time effect $F_{(2,50)} = 14.27$, *** $p < 0.001$, time x opsin interaction $F_{(2,50)} = 4$, * $p = 0.02$, *post hoc* Wilcoxon test for CatCh vs YFP at 5 minutes, * $p = 0.04$). *Bottom:* Jaws-injected ($n = 12$) and YFP-injected mice ($n = 12$) implanted in the NAcLSH (two-way RM ANOVA, main time effect $F_{(2,44)} = 12.47$, *** $p < 0.001$).

Figure S14: Activation of VTA terminals in the NAcMSh changes the EOM exploration and increases locomotor activity but not place preference. Related to Figure 5.

(A) Top: Representative immunofluorescence image of a VTA section with AAV-hSyn-Jaws-GFP (Jaws) expression (GFP: green labeling, TH: red labeling). **Bottom:** Optical fibers were bilaterally implanted in the NAc medial shell (NAcMSh: bregma 1.7; lateral 1.75; ventral 4.25 mm, angle 12°) of wild-type (WT) mice injected into the VTA with either AAV-hSyn-ChR2-eYFP (ChR2, blue dots represent fiber tip locations, n = 8), Jaws (orange dots, n = 7) or AAV-hSyn-eGFP as a control (GFP, green dots, n = 10) into the VTA. **(B) Top:** Activating VTA axon terminals in the NAcMSh by ChR2 photostimulation during the EOM task induced an increase in both the number of entries into the open arm (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,28)} = 15.68$, *** $p < 0.001$, time x opsin interaction $F_{(2,28)} = 7.59$, ** $p = 0.002$; *post hoc* Student's t-test for ChR2 vs GFP mice: ** p (ON) = 0.007 ; *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections for ChR2 mice, *** p (5 vs 10 minutes) < 0.001, *** p (10 vs 15 minutes) = 0.001) and in the percentage of time spent by the mice in the open arms compared to the control group (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,28)} = 7.28$, ** $p = 0.003$, opsin $F_{(1,14)} = 5.26$, * $p = 0.038$, time x opsin interaction $F_{(2,28)} = 4.53$, * $p = 0.02$; *post hoc* Student's t-test for ChR2 vs GFP mice: *** p (ON) < 0.001; *post hoc* Student's t-test and Wilcoxon test with Bonferroni corrections for ChR2 mice, p (5 vs 10 minutes) = 0.06, *** p (10 vs 15 minutes) < 0.001). **Bottom:** Inhibiting VTA axon terminals in the NAcMSh by Jaws photostimulation during the EOM task did not alter the number of entries into the open arm, nor the percentage of time mice spent in the open arms (two-way RM ANOVA no time or opsin effect, nor interaction effect). **(C) Top:** Locomotor activity assessed in ChR2- and GFP-expressing groups in a square novel open field (OF). The OF test lasts 15 minutes, with 10 Hz photostimulation at 470 nm, 5-ms pulses, during a 5-minute ON period in between two non-stimulation periods (OFF-ON-OFF). Activating VTA terminals in the NAcMSh by ChR2 photostimulation produced a significant increase of locomotor activity compared to GFP-expressing mice (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,28)} = 38.45$, *** $p < 0.001$, opsin $F_{(1,14)} = 17.93$, *** $p < 0.001$, time x opsin interaction $F_{(2,28)} = 18.45$, *** $p < 0.001$; *post hoc* Student's t-test with Bonferroni corrections for ChR2 mice, *** p (5 vs 10 minutes) < 0.001, *** p (10 vs 15 minutes) < 0.001). **Bottom:** Locomotor activity assessed in Jaws- and GFP-expressing groups, where the stimulation occurs continuously at 520 nm over the 5-minute ON period. Inhibiting VTA terminals in the NAcMSh by Jaws photostimulation did not alter locomotor activity in comparison to GFP-expressing mice (two-way RM ANOVA no time or opsin effect nor interaction effect). **(D)** The number of entries in the open arms (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,20)} = 5.27$, * $p = 0.014$) and the percentage of time spent in the open arms of the EOM after nicotine IP injection in Jaws or GFP injected mice stimulated continuously throughout the test in the NAcMSh (two-way RM ANOVA main time effect $F_{(2,20)} = 7.88$, ** $p = 0.003$, and effect of opsin $F_{(1,10)} = 7.79$, * $p = 0.019$). **(E)** Preference score in 20min-RTPP defined by the % of time spent in the compartment where the animals are photo-stimulated compared to the compartment where they are not (ON-OFF). Neither activation (Student t-test, $p = 0.4$) nor inhibition (Student t-test, $p = 0.9$) of the DA axon terminals in the NAcMSh induced place preference or aversion.

IF: *interfascicular nucleus*; IPN: *interpeduncular nucleus*; ml: *medial lemniscus*; SNc: *substantia nigra pars compacta*; VTA: *ventral tegmental area*

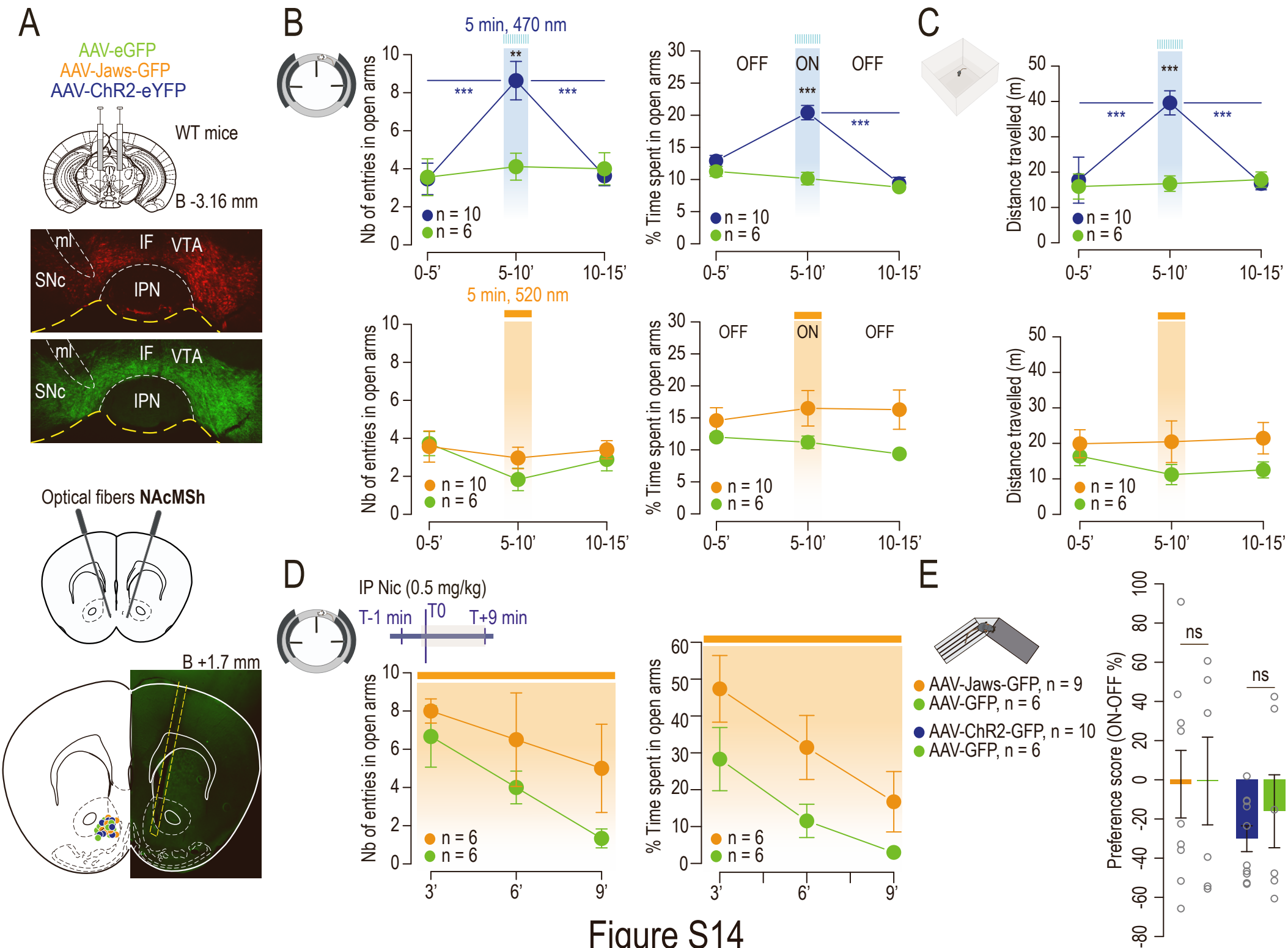


Figure S14

Chapitre 5 : Seconde publication scientifique

Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway through a NAc inhibitory feedback loop.

Le Borgne T., Nguyen C., Vicq E., Jehl J., Solié C., Guyon N., Daussy L., Reynolds L.M., Gulmez A., Mondoloni S., Tolu S., Pons S., Valjent E., Maskos U., Mourot A., Faure P.*, Marti F.* (* co-last). **En préparation.**

Nous avons vu que, en fonction du contexte et de l'environnement dans lequel se trouve un individu, une même dose de nicotine est capable d'induire des effets récompensants ou anxiogènes. Ces effets comportementaux distincts sont médiés par une activation des neurones dopaminergiques projetant vers le NAc et une inhibition des neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg. En effet, l'activation de la voie VTA_{DA}-NAc induit des effets récompensants alors que l'inhibition de la voie VTA_{DA}-Amg induit un message anxiogène. L'inhibition observée *in vivo* nécessite l'expression de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiniques, localement dans la VTA. La nicotine, en agissant au niveau des récepteurs nicotiniques, produit une activation des neurones. En effet, ces derniers sont des récepteurs perméables aux cations et vont donc avoir pour conséquence de dépolariser le neurone. L'inhibition ne peut donc pas être directement induite par la nicotine. De plus, nos précédents travaux de recherche ont examiné séparément l'effet d'une activation ou d'une inhibition de ces deux populations, mais jamais leur induction simultanée.

Cette seconde publication s'inscrit dans la continuité de la première publication que je vous ai présenté. L'objectif ici est de comprendre le mécanisme à la base de l'inhibition des neurones dopaminergiques observée en réponse à la nicotine, et le rôle de cette inhibition dans la mise en place de l'addiction. Également, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition observée en réponse à la nicotine était spécifique de cette drogue ou si elle pouvait être généralisée à d'autres drogues d'abus, comme l'alcool, généralement consommé en même temps qu'une cigarette.

Pour ce faire, nous avons eu recours à des techniques anatomiques, électrophysiologiques et comportementales. Dans un premier temps, nous avons effectué des enregistrements électrophysiologiques juxtacellulaires *in vivo*, et montré que des injections intraveineuses de nicotine et d'alcool produisent exactement les mêmes effets sur les neurones dopaminergiques. Ces deux drogues induisent une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la voie VTA_{DA}-NAc et une diminution de la

fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la voie VTADA-Amg. Ces premiers résultats montrent que l'alcool et la nicotine, bien qu'ayant des cibles moléculaires différentes, semblent agir de la même façon sur le système dopaminergique de la VTA. Afin d'identifier si des différences intrinsèques de ces deux sous-populations pourraient expliquer cette inhibition, nous avons eu recours à des expériences en *patch-clamp* couplées à des traceurs rétrogrades injectés dans les sous-noyaux respectifs du NAc (NAcShellLat) ou de l'Amg (BLA), et enregistré la réponse de ces deux populations à des puffs de nicotine. Nous avons ainsi montré que les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc présentent de plus forts courants nicotiques dépolarisants, mêmes pour des faibles doses. Puisque les neurones projetant vers l'Amg présentent de plus faibles courants nicotiques, ils peuvent être plus sensibles à une potentielle source d'inhibition. Nous n'avons cependant observé aucune différence significative, *ex vivo*, dans les entrées GABAergiques reçues par ces deux populations après application de nicotine dans le bain, qui pourrait expliquer l'inhibition des neurones projetant vers l'Amg. Par contre, nous mettons en évidence, *in vivo*, que l'activation des neurones de la voie VTADA-NAc, dépendante de l'expression de la sous-unité $\beta 2$, suffit à induire l'inhibition d'une population de neurones dopaminergiques dans la VTA. Nous avons démontré, grâce à l'utilisation de souris délétées pour les récepteurs D2 (DAT-D2^{KO}), que cette inhibition consécutive à l'activation ne semble pas être provoquée par une libération somatodendritique de DA dans la VTA. En effet, les neurones n'exprimant plus le récepteur D2 (inhibant l'activité dopaminergique une fois activé) présentent toujours une inhibition à la nicotine. Par ailleurs, nous avons découvert que les neurones de la voie VTADA-BLA sont contactés par des neurones inhibiteurs GABAergiques du NAc, qui pourraient constituer une source inhibitrice externe à la VTA, responsable de l'inhibition observée *in vivo* en réponse à la nicotine et à l'alcool. Nous avons mis en évidence qu'une activation optogénétique de la voie VTADA-NAc suffit à provoquer l'inhibition de neurones dopaminergiques dans la VTA, et qu'une inhibition des terminaisons GABAergiques du NAc au niveau de la VTA bloque la réponse inhibitrice à la nicotine.

Enfin, une étude comportementale vient compléter ces travaux dans le but d'évaluer la conséquence d'une inhibition de la voie VTADA-Amg dans un processus de renforcement. Pour ce faire, nous avons eu recours à des boîtes opérantes pour simuler un comportement d'auto-administration par optogénétique. Les résultats montrent que la simple activation d'un sous-circuit dopaminergique projetant vers le NAc suffit à induire un renforcement. Toutefois, une modulation optogénétique bidirectionnelle de la voie VTADA-BLA n'impacte pas l'effet renforçant de la stimulation de la voie VTADA-NAc. Ce travail est prévu d'être complété.

Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway through a NAc inhibitory feedback loop.

Le Borgne T., Nguyen C., Vicq E., Jehl J., Solié C., Guyon N., Daussy L., Reynolds L.M., Gulmez A., Mondoloni S., Tolu S., Pons S., Valjent E., Maskos U., Mouroto A., Faure P.*, Marti F.* (*co-last). *In prep.*

ABSTRACT

Nicotine mediates both reinforcing and anxiogenic effects by acting on the dopaminergic (DA) neurons of the ventral tegmental (VTA). Specifically, nicotine activates DA neurons projecting to the nucleus accumbens (NAc), contributing to preference behaviors. Conversely, it inhibits DA neurons projecting to the amygdala (Amg), responsible for the anxiogenic effect of nicotine, although the underlying mechanism of inhibition remains unclear. In this study, we showed that NAc- and Amg-projecting VTA DA neurons are equally activated and inhibited by ethanol and nicotine. A common mechanism could therefore be shared by these two drugs. We found that re-expression of the $\beta 2$ subunit of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the VTA-NAc pathway, or its optogenetic activation, can in turn induce inhibition of VTA DA neurons via direct GABAergic projections from the NAc. Inhibition of the VTA-BLA pathway therefore appears to be consequent to activation of the VTA-NAc pathway, and does not appear to alter the reinforcement induced by activation of NAc-projecting VTA DA neurons.

INTRODUCTION

The escalating global burden of disease associated with tobacco and alcohol use is a major public health challenge. Emerging evidence highlights cigarette smoking and alcohol consumption as two of the most important contributors to the development of cancer (Tran et al., 2022). Understanding the cellular mechanisms and the sequence of neuronal events that drive addiction is necessary to develop innovative products to aid withdrawal and to define effective prevention strategies. In this context, the mesocorticolimbic dopamine (DA) system is central and is involved in critical cognitive processes such as conditioning, reinforcement learning, motivation, decision-making (Schultz, 2006), and in responses to nicotine or alcohol (Di Chiara & Imperato, 1988). Exposure to addictive substances alters both the response to the drug and the decision-making parameters (Dongelmans et al., 2021). Drugs of abuse act

on DA neurons through a variety of cellular mechanisms, but primarily increase DA release in the nucleus accumbens (NAc) (Di Chiara & Imperato, 1988). Specifically, nicotine acts on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), a heterogeneous family of ligand-gated ion channels (Changeux et al., 1998), and increases the activity of both DA and GABA neurons in the ventral tegmental area (VTA) (Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013). However, VTA DA neurons exhibit remarkable heterogeneity based on molecular properties and projection areas (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008; Watabe-Uchida et al., 2012). These neurons encode not only appetitive stimuli and reward predictions, but also salient signals such as aversive or alarming events (Bromberg-Martin et al., 2010; Mirenowicz & Schultz, 1996; Schultz, 2006). Indeed, global optogenetic activation of VTA DA neurons can induce conditioned place preference (Tsai et al., 2009) or reinforcement in a self-administration paradigm (Pascoli et al., 2015), whereas inhibition of the same neurons induces avoidance behavior (Tan et al., 2012).

Our previous work has shown that nicotine not only activates one population of VTA DA neurons as traditionally described, but also induces inhibition of another population of VTA DA neurons (Eddine et al., 2015; Nguyen et al., 2021). On the one hand, VTA DA neurons activated by nicotine project to the NAc and optogenetic activation of this pathway induces a place preference. On the other hand, VTA DA neurons inhibited by nicotine project to the amygdala (Amg) and optogenetic inhibition of this pathway mediates anxiety-like behavior (Nguyen et al., 2021). However, the mechanism underlying this inhibition remains unknown. This study investigates whether this inhibition can be extended to alcohol, another drug of abuse, and aims to elucidate the mechanism of nicotine-induced inhibition and its role in reinforcement.

RESULTS

Nicotine and alcohol induce similar opposite responses *in vivo*

In vivo single-cell electrophysiological recordings were performed in anesthetized mice to record VTA DA neurons before and after intravenous (i.v.) injection of both nicotine (Nic; 30 µg/kg i.v.) and ethanol (EtOH; 250 mg/kg i.v.). These neurons were first identified according to their location and their electrophysiological patterns (see Methods) and then filled with neurobiotin (NB) using the juxtacellular labeling technique (Eddine et al., 2015; Pinault, 1996). All neurons were thus confirmed as DA neurons by post hoc immunofluorescence with co-labeling for tyrosine hydroxylase (TH) (**Figure 1A**). Acute i.v. paired injections of nicotine and ethanol induced a significant variation in DA neuron firing rates (**Figure 1B**), resulting in either an increase or a decrease in the firing rate that was absent in vehicle injections (Sal; n = 72; Kolmogorov-Smirnov test: Sal vs. EtOH ***p<0.001, Sal vs. Nic ***p<0.001; **Fig S1**). The distribution of firing frequency variations across neurons showed a unimodal pattern after i.v. saline

injections (**Fig S1**), while those after i.v. ethanol and nicotine injections exhibited a similar bimodal distribution ($n = 72$; Kolmogorov-Smirnov test, $p=0.49$) (**Figure 1C**). Among the 72 neurons recorded, 67 neurons showed a significant response to ethanol while 69 exhibited a significant response to nicotine, as compared to the baseline variation (see Methods). Some neurons displayed activation in response to i.v. ethanol injection (EtOH+; $n = 56$), while others showed inhibition (EtOH-; $n = 16$) when compared to i.v. saline injection (paired Wilcoxon test: EtOH vs. Sal, $***p<0.001$ for activated DA neurons, $***p<0.001$ for inhibited DA neurons) (**Figure 1D, left**) and to baseline (Bas; paired Wilcoxon test: Bas vs. EtOH+ $***p<0.001$, Bas vs. EtOH- $***p<0.001$) (**Figure 1D, right**).

We next asked whether excited and inhibited neurons were anatomically distinct. NB-filled cell bodies of each responding neuron ($n = 72$) were positioned on mouse brain atlas plates (Paxinos and Franklin, 2004) (**Figure S1**), revealing that EtOH- neurons were predominantly located in the central region of the VTA, whereas EtOH+ neurons were mainly located in the lateral region (**Figure S1**). In addition, the polarity of the responses was not dose-dependent, as neurons maintained their activation or inhibition across all ethanol doses tested (**Figure S1**). Similar results were observed with nicotine (paired Wilcoxon test: Nic vs. Sal, $***p<0.001$ for activated DA neurons, $***p<0.001$ for inhibited DA neurons; Bas vs. Nic+ $***p<0.001$, Bas vs. Nic- $***p<0.001$) (**Figure 1E**), consistent with previous reports (Nguyen et al., 2021). Strikingly, nicotine and ethanol injections induced similar firing variations (**Figure 1F**), with 80% of the neurons responding similarly to nicotine and ethanol (i.e., activated or inhibited by both nicotine and ethanol, **Figure 1G**). Only 14 out of 71 neurons do not respond similarly and are activated by ethanol and inhibited by nicotine. Permutation analysis revealed that this similarity in response polarity exceeded what would be expected by chance, as none of the surrogates reached a level of 80% of matched injections with the same response direction (0 out of 10,000). These results suggest that nicotine and ethanol elicit activation or inhibition in the same subpopulations of DA neurons.

Nicotine and alcohol activate VTA DA neurons projecting to the NAc while inhibit VTA DA neurons projecting to the amygdala

To estimate the response of subpopulations of VTA DA cells depending on their anatomical projections, we injected retrobeads (RB) into either the NAc (NAcLatShell, NAcMedShell, NAcCore) or the Amg (BLA, CeA). We then performed *in vivo* single-cell electrophysiological recordings before and after paired i.v. injection of nicotine and ethanol. Triple-labeling immunofluorescence allowed us to confirm post hoc the DA nature (TH+), the projection site (RB+), and the position (NB+) of all recorded neurons (**Figure 2A, Figure S2**). We first confirmed that nicotine elicited different polarity of responses depending on whether the neurons projected to the NAc or the Amg. This was evident from the distribution of the maximum

variation in frequency after nicotine injection, which differed depending on the projection site (NAc-proj DA neurons, $n=13$; Amg-proj DA neurons, $n=16$; Kolmogorov-Smirnov test: Nic-NAc vs. Nic-Amg $***p<0.001$) (**Figure 2B**). Consistent with our previous results (Nguyen et al., 2021), most NAc-projecting neurons were excited, whereas Amg-projecting neurons were mainly inhibited. Specifically, among the neurons projecting to the NAc, 12 out of 13 were activated, while among those projecting to the amygdala, 15 out of 16 were inhibited after i.v. nicotine injection compared to baseline frequency (**Figure 2C**; paired Wilcoxon test: $**p=0.01$ for NAc-projecting DA neurons, $**p=0.002$ for Amg-projecting DA neurons). Furthermore, compared to saline, nicotine significantly activated the majority of NAc-projecting DA neurons (paired Student's t test: Nic vs. Sal, $***p<0.001$), whereas it inhibited the majority of Amg-projecting DA neurons (paired Student's test: Nic vs. Sal, $***p<0.001$) (**Figure 2D**).

In the same population of neurons, ethanol i.v. injection also led to different distributions of firing frequency in NAc-projecting VTA DA neurons and in Amg-projecting VTA DA neurons (NAc-proj DA neurons: $n=13$; Amg-proj DA neurons: $n=16$; Kolmogorov-Smirnov test: EtOH-NAc vs. EtOH-Amg $**p=0.002$) (**Figure 2E**). Specifically, 11 out of the 13 neurons projecting to the NAc were activated, and 13 over 16 neurons projecting to the Amg were inhibited after i.v. injection of nicotine (paired Wilcoxon test: $p=0.12$ for NAc-projecting DA neurons, $p=0.12$ for Amg-projecting DA neurons) (**Figure 2F**). Similar to nicotine, ethanol significantly activated the majority of NAc-projecting DA neurons (paired Student's t -test: Nic vs. Sal, $***p<0.001$), while it inhibited the majority of Amg-projecting DA neurons compared to saline (paired Student test: Nic vs. Sal, $*p=0.05$) (**Figure 2G**). By examining, in the same neurons, the polarity of nicotine- and ethanol-induced frequency variations, we observed a correlation of 87.5% among Amg-projecting VTA DA neurons and a correlation of 92.3% among NAc-projecting VTA DA neurons (**Figure 2H**). Only 3 neurons showed different polarity of responses: 2 Amg-projecting DA neurons were activated by ethanol but inhibited by nicotine, and 1 NAc-projecting DA neuron was inhibited by ethanol but activated by nicotine.

In summary, these results show that nicotine and alcohol induce the same opposite responses within two distinct dopaminergic pathways. These observations suggest the existence of a common network mechanism, shared by nicotine and alcohol, that results in the inhibition of Amg-projecting DA neurons.

Nicotine-induced activation is sufficient to trigger nicotine-induced inhibition

To unravel this network mechanism, we first investigated the balance between direct excitatory and indirect inhibitory effects of nicotine on DA neurons projecting to either the NAcLatShell or the BLA. These two specific pathways are respectively excited and inhibited by nicotine, and are involved in distinct behaviors, either preference or avoidance (Nguyen et al., 2021). We examined nicotine-induced currents

ex vivo using patch-clamp recordings on neurons identified by RB labeling. All neurons recorded were filled with biocytin (B) at the end of experiments to verify the DA phenotype by post-hoc immunofluorescence, with co-labeling of TH, RB and B (**Figure 3A**). We found that nicotine induced smaller nicotinic currents in Amg-projecting DA neurons (dose 10 μ M, n=13; dose 30 μ M, n=8; dose 100 μ M, n=10) than in NAc-projecting DA neurons (dose 10 μ M, n=8; dose 30 μ M, n=13; dose 100 μ M, n=11) for three doses of nicotine (two-way ANOVA: dose effect $F_{2,57}=9.5$, *** $p<0.001$; projection effect, $F_{1,57}=1428.4$, *** $p<0.001$) (**Figure 3B**). Consequently, NAc-projecting DA neurons, which are known to be activated by nicotine *in vivo*, are more responsive to nicotine than Amg-projecting DA neurons, suggesting a differential expression of nAChRs in these two neurons' subpopulations.

We next decided to determine whether nicotine-induced inhibition might be mediated by local GABAergic interneurons and recorded nicotine-evoked GABAergic currents within the two subpopulations. We found no significant increase in amplitude or frequency of the spontaneous post-synaptic inhibitory currents (sIPSCs) (**Figure 3C, top** and **Figure S3**) in Amg-projecting VTA DA neurons (n=14), which are known to be inhibited *in vivo*. In contrast, in NAc-projecting VTA DA neurons, we observed an increase in sIPSC amplitude on average (n=17 neurons, Student's t-test: * $p=0.04$) (**Figure 3C, bottom**) and in cumulative distributions (Kolmogorov-Smirnov test: amplitude *** $p<0.001$, frequency * $p=0.01$) (**Figure S3**). Moreover, miniature post-synaptic inhibitory currents (mIPSCs) amplitudes per neurons are similar in the two subpopulations, but different in cumulative distribution (Kolmogorov-Smirnov test: amplitude *** $p<0.001$) (**Figure S3**). Thus, these results suggest that nicotine-induced inhibition of Amg-projecting DA neurons is unlikely to be mediated by an increased GABAergic signaling originating from VTA neurons.

Finally, we tested whether inhibition of Amg-projecting DA neurons could be the consequence of activation of NAc-projecting DA neurons. Nicotine evoked response (activation and inhibition) is primarily caused by nicotine binding to $\beta 2$ -containing nAChRs expressed in the VTA (Durand-de-Cuttoli et al., 2018; Mameli-Engvall et al., 2006; Tolu et al., 2013), and nAChRs are cationic receptors that thus cannot directly inhibit DA neurons. We then used $\beta 2^{-/-}$ mice and re-expressed the $\beta 2$ subunit only in NAc-projecting neurons (the neurons that are activated by nicotine). For this purpose, we used a retrograde virus expressing a Cre-recombinase injected into the three subnuclei of the NAc (NAcLatShell, NAcMedShell, NAcCore), and a Cre-dependent lentivirus expressing the $\beta 2$ subunit in the VTA. We then performed *in vivo* single-cell electrophysiological recordings of VTA DA neurons activity in vectorized mice expressing either GFP or $\beta 2$ -GFP construct specifically on VTA-NAc pathway (**Figure 3D**). We demonstrated that neurons from $\beta 2^{-/-}$ mice expressing the control vectorization (GFP^{NAcVec}, n=19) showed the same distribution of firing frequency variation after i.v. nicotine or saline injections (Kolmogorov-Smirnov test, $p=0.79$) (**Figure 3E, top**). However, responses to nicotine of neurons from $\beta 2^{-/-}$ mice expressing the $\beta 2$

vectorization ($\beta 2^{\text{NacVec}}$, n=32) showed a bimodal distribution compared to the unimodal distribution of responses observed with i.v. saline injections (Kolmogorov-Smirnov test, $*p=0.02$) and with nicotine in $\text{GFP}^{\text{NacVec}}$ (Kolmogorov-Smirnov test, $*p=0.04$) (**Figure 3E, bottom**). DA neurons in the VTA of $\text{GFP}^{\text{NacVec}}$ mice showed no response to nicotine, whereas activation and inhibition are fully restored in $\beta 2^{\text{NacVec}}$ mice (**Figure 3F**). Indeed, in $\beta 2^{\text{NacVec}}$ mice, nicotine induced changes in firing frequency compared to baseline, both for increase and decrease responses (paired Wilcoxon test: activation $***p<0.001$, inhibition $**p<0.01$), but also compared to saline injection (paired Wilcoxon test: $***p<0.001$) (**Figure 3F**). These results indicate that re-expression of $\beta 2$ subunit only in the VTA-NAc pathway is sufficient to provoke both nicotine-induced activation and inhibition of VTA DA neurons. We also re-expressed the $\beta 2$ subunit in the VTA-Amg pathway (**Figure 3G**) and found that it did not produce strong inhibition. The nicotine-induced changes in firing in $\beta 2^{\text{AmgVec}}$ mice showed a unimodal right-shifted distribution compared to that observed with saline (Kolmogorov-Smirnov test, $**p=0.002$) but is not different from that observed in $\text{GFP}^{\text{AmgVec}}$ mice (Kolmogorov-Smirnov test, $p=0.2$) (**Figure 3H**). Indeed, out of 21 neurons, 12 respond with an increase in their firing rate, and 4 neurons with a decrease (**Figure 3I**). However, only activated neurons showed a firing rate variation statistically different from that induced by saline (**Figure 3I**).

Thus, activation of NAc-projecting DA neuron is sufficient to restore nicotine-induced inhibition in another subset of DA neurons. Nicotine-induced inhibition may rely on activation of D2 autoreceptors following somatodendritic DA release from excited VTA DA neurons. To test this mechanism, we used $\text{DAT-D2R}^{-/-}$ mice, which specifically lack D2 receptors in DA neurons. We found that both activated and inhibited responses were unchanged in recorded VTA DA neurons. Contrary to what was suggested in a previous paper (Eddine et al., 2015), autoinhibitory D2 receptors do not appear to underlie nicotine-induced inhibition (**Figure S4**).

In conclusion, we have shown that nicotine-induced inhibition can be evoked by activation of VTA DA neurons projecting to the NAc. Because it does not depend on local GABAergic circuitry or DA release in the VTA, it may involve long-range GABAergic neurons that are activated by VTA-NAc DA projections.

VTA-NAc pathway activates feedback inhibitory loop that target VTA-BLA DA neurons

NAc medium spiny neurons expressing dopaminergic D1 receptors (D1-MSNs) are known to send direct inhibitory projections to the VTA neurons (Yang et al., 2018). First, we examined the connectivity between NAc GABAergic terminals and BLA-projecting DA neurons by combining optogenetics with patch-clamp recordings (**Figure 4A**). To do this, we expressed ChR2 in the three subnuclei of the NAc (in different batches of mice) and injected red RB into the BLA, and recorded light-evoked IPSCs in BLA-projecting DA neurons. Neurons were then filled with biocytin (B) to verify the DA phenotype (co-labeling for TH, RB

and B, **Figure 4B**). We found that a small percentage of BLA-projecting DA neurons responded to light stimulation from the NAcMedShell (41.2%, n=7/17 neurons), while a higher proportion responded to light stimulation from the NAcShellLat (61.6%, n=8/13 neurons) and almost all responded to light stimulation from the NAcCore (90.9%, n=10/11 neurons) (**Figure 4C**). These results suggest that VTA DA neurons projecting to the BLA receive strong GABAergic inhibition coming from the three subnuclei of the NAc.

In light of these results, we investigated the functional impact of this inhibitory pathway and injected a retrograde ChR2-containing virus (retroChR2) with YFP signal into the three subnuclei of the NAc in DATcre mice, so that retroChR2 was specifically expressed in VTA DA neurons projecting to the NAc (**Figure 4D, left**). All YFP-positive cells recorded in patch-clamp experiments followed 10 and 20 Hz stimulation patterns (**Figure 4D, middle**). Recorded neurons were confirmed to be DA by post hoc immunofluorescence verification of co-labeling of TH, YFP and B. Neurons expressing the YFP signal were localized in the medial and lateral portions of the VTA (**Figure 4D, right**), consistent with previous findings (Lammel et al., 2008; Yang et al., 2018).

We then used multi-unit extracellular recordings, which allowed us to simultaneously lower a tetrode and an optical fiber into the VTA. To mimic nicotine-induced response, we used 5 min of optogenetic stimulation at 10 or 20 Hz. NAc-projecting neurons are localized laterally, whereas Amg-projecting neurons are localized more medially within the VTA (**Figure S2**, (Nguyen et al., 2021)). Thus, we placed the optical fiber at lateral coordinates within the VTA, to preferentially induce light activation of NAc-projecting neurons. Optical stimulation induced frequency variations of the putative DA (pDA) neurons and showed a bimodal distribution of the frequency variation that differs from the maximum spontaneous variation occurring during baseline. (n=43, Kolmogorov-Smirnov test: **p=0.002) (**Figure 4E**). Specifically, when exposed to 10 or 20 Hz photostimulation, a significant increase in firing frequency was observed in a subset of pDA neurons likely expressing retroChR2 (paired Wilcoxon test: n=15, ***p<0.001 for 10Hz photostimulation; n=6, *p < 0.05 for 20Hz photostimulation) (**Figure 4F**). Conversely, a significant proportion of pDA neurons are inhibited by photostimulation (paired Wilcoxon test: n=13, ***p<0.001 for 10Hz photostimulation; n=8, **p<0.01 for 20Hz photostimulation) (**Figure 4G**). These results suggest that activation of NAc-projecting DA neurons triggers inhibition of a subset of VTA DA neurons. Because we were unable to label neurons *in vivo* using this electrophysiological technique to identify projections, we tested the response to nicotine in 6 light-inhibited neurons. As a result, 4 out of the 6 neurons were inhibited by both 10 Hz photostimulation and nicotine (**Figure S5**), suggesting that some of the light-inhibited neurons may project to the Amg.

Long-range GABAergic neurons could originate either from the NAc or from other regions known to send GABAergic inputs to VTA DA neurons. To confirm that nicotine-induced inhibition involves descending fibers from the NAc to the VTA, we expressed JAWS halorodopsin in the NAc to block its

projection to the VTA (**Figure 4H**). We then recorded *in vivo* neurons inhibited by an i.v. injection of nicotine. By applying a second i.v. injection of nicotine coupled with an optogenetic inhibition of NAc terminals in the VTA (**Figure 4I**), we showed that blocking NAc inputs to the VTA modulates and even tends to reverse nicotine-induced inhibition. (**Figure 4J, left**). Maximum variations from baseline showed a decrease for i.v. nicotine (Nic), but an increase for i.v. nicotine coupled with photoinhibition of NAc terminals (Opto+Nic), compared to i.v. saline (Sal) (n=6; paired Student's t-test: Sal vs. Nic **p<0.01, Nic vs. NicOpto ***p=0.001) (**Figure 4J, right and Figure S5**). Light photostimulation alone does not induce variations in firing frequency, suggesting that this change in nicotine effect is not due to disinhibition alone (**Figure S5**).

Taken together, these results suggest that activation of NAc-projecting DA neurons leads to activation of MSN neurons in the NAc. These neurons have established connections with BLA-projecting VTA DA neurons, suggesting that they may be responsible for their inhibition when exposed to nicotine. This circuit-based mechanism involving an inhibitory loop between VTA and NAc may also apply to ethanol-induced activation and inhibition.

The VTA-BLA pathway does not modulate choice and value in reinforcement learning

Nicotine-induced activation and inhibition are inextricably linked to one another. To investigate the functional role of VTA-BLA inhibition in reinforcement, we set up an optogenetic DA neuron self-stimulation task (oDASS, Harada et al., 2021). It consisted of a box with two levers delivering optogenetic stimulation of DA neurons, to mimic the effects of nicotine and alcohol on the two VTA DA subpopulations. To simulate drug effects, we expressed ChR2 in one hemisphere and JAWS in the other, both in the VTA of DAT-Cre mice, and implanted optical fibers in the NAcLatShell and BLA, respectively (**Figure 5A**). During the first week, mice were conditioned to press an active lever that stimulated VTA-NAcLatShell terminals. Animals could choose between an active lever, which delivered the oDASS and was indicated by a cue, and an inactive lever. The active lever (and associated cue) was switched daily to avoid side effects (N=10 animals; two-way ANOVA: lever x session interaction, $F_{4,72}=3.5$, *p=0.01; main effect of session, $F_{4,72}=9.2$, ***p<0.001) (**Figure 5B-C, yellow panel**). During the second week, once mice had already learned the task, we added inhibition of VTA-BLA terminals, concurrent with activation of VTA-NAcLatShell terminals, on the active lever. The active and inactive levers were also signaled by the same light cue to ensure that mice track the stimulation independently of the cue. Mice were still able to track this dual stimulation regardless of the cue position (N=10 animals; two-way ANOVA: lever x session interaction, $F_{4,72}=4.1$, **p=0.004; lever effect, $F_{1,18}=10.01$, **p=0.005; session effect, $F_{4,72}=6.1$, ***p<0.001) (**Figure 5B-C, orange panel**). The third week consisted of a choice between two active

levers: one associated with activation of VTA-NAcLatShell terminals only, and the other with the dual stimulation. Mice pressed both levers equally, even if the two levers had two different oDASS patterns (N=10 animals; two-way ANOVA: lever x session interaction, $F_{4,72}=11.3$, $***p<0.001$) (**Figure 5B-C red panel**). Finally, mice rapidly stopped pressing the levers during extinction (N=10 animals; two-way ANOVA: session effect, $F_{4,72}=29.5$, $***p<0.001$). These results suggest that concomitant inhibition of the VTA-BLA pathway does not seem to affect the reinforcement induced by VTA-NAcLatShell activation, at least not the value associated with the lever delivering the oDASS. This is supported by the similar results obtained in experiments using VTA-NAcLatShell stimulation only (**Figure S6A-D**).

We then examined whether inhibition of the VTA-BLA pathway alone mediated motivational valence. Four weeks after the first experiment, mice were re-tested by pressing an active lever that activated only VTA-NAcLatShell terminals (**Figure 5D**). Mice immediately showed a number a lever presses similar to last day of week3 (N=10 animals; two-way ANOVA: lever x session interaction, $F_{4,72}=4.3$, $**p=0.004$; main effect of lever, $F_{1,18}=45.4$, $***p<0.001$). The following week, active lever was associated with inhibition of VTA-BLA terminals alone (**Figure 5D**). Mice then drastically stopped pressing the active lever, indicating that inhibition of the VTA-BLA pathway does not support reinforcement (N=10 animals; lever x session interaction, $F_{4,72}=8.2$, $***p<0.001$; lever effect, $F_{1,18}=15.6$, $***p<0.001$; session effect, $F_{4,72}=16.7$, $***p<0.001$). However, mice still pressed the active lever more than the inactive lever, suggesting a possible effect of VTA-BLA pathway inhibition on salience.

Similar results were observed with activation of the VTA-BLA terminals concomitant with activation of VTA-NAcLatShell terminals (N=8 animals; two-way ANOVA; week 1: lever x session interaction, $F_{4,56}=3$, $*p=0.03$, main effect of session, $F_{4,56}=12.5$, $***p<0.001$; week 2: lever effect, $F_{1,14}=12.2$, $**p=0.003$, session effect $F_{4,56}=6.3$, $***p<0.001$; week 3: lever x session interaction, $F_{4,56}=18.5$, $***p<0.001$; week4: session effect, $F_{4,56}=27.8$, $***p<0.001$) (**Figure 5.E-G**). After the reconditioning week, activation of only the VTA-BLA terminals also showed a drastic decrease in active lever presses (N=7 animals; two-way ANOVA; reconditioning: lever x session interaction, $F_{4,48}=4.6$, $**p=0.003$, main effect of lever, $F_{1,12}=20.32$, $***p<0.001$; VTA-BLA+: lever effect, $F_{1,12}=22.58$, $***p<0.001$, session effect, $F_{4,48}=4$, $**p=0.007$) (**Figure 5.H**). Again, mice are able to discriminate between the two levers as they press the active lever more than the inactive one, suggesting a salience effect. Taken together, these results indicate that the VTA-BLA pathway does not appear to be involved in value-based choice.

DISCUSSION

The VTA has traditionally been regarded as the neural structure responsible for the widespread distribution of DA throughout the brain. The temporal variation in DA release has been used to explain

the functional role of DA neurons in various behavioral processes (Schultz, 2007). However, this temporal perspective on DA neuron function has evolved over time, giving way to the idea that the DA system, particularly within the VTA, consists of distinct subpopulations of DA neurons, each associated with specific appetitive, aversive, or attentional behaviors (Lammel et al., 2012). Optogenetic manipulation of specific subpopulations and pathways supports this notion. Previously, our research has shown that nicotine induces both activation and inhibition of VTA DA neurons, each associated with two distinct anatomical and functional circuits. Interestingly, these circuits appear to produce opposite behavioral effects: inhibition of VTA DA neurons projecting to the BLA is anxiogenic, whereas activation of those projecting to the NAcLatShell is rewarding. Here, we provide evidence that inhibition and excitation cannot be viewed as isolated events; rather, inhibition arises as a consequence of excitation facilitated by feedback inhibition from the NAc. This finding has important conceptual implications, as it suggests that the VTA should not be viewed as a collection of independent subcircuits that could function in isolation. Instead, it is important to understand the response patterns of the different connections in the context of specific behavioral scenarios.

An important element of our demonstration of a network-based mechanism underlying inhibition is that both alcohol and nicotine induce inhibition of the VTA DA-Amg pathway and activation of the VTA DA-NAc pathway. Whereas nicotine exerts its effects via specific molecular targets, the nAChRs, alcohol lacks a well-defined molecular target. Nevertheless, recent research in rats has shown a greater activation of dopaminergic neurons in the lateral part of the VTA in response to ethanol compared to those located medially (Doyon et al., 2021). This population of neurons corresponds anatomically to those projecting to the NAc, consistent with activation of the pathway under ethanol that would override a potential source of inhibition. Indeed, alcohol, like nicotine, induces an increase in DA release at the NAc (Di Chiara & Imperato, 1988). Taken together, these findings strongly suggest the involvement of a network mechanism to explain the observed inhibitory effects, as alcohol and nicotine do not rely on identical molecular pathways. This also justifies the use of optogenetics to recover some of the effects of drug exposure.

Amg plays a key role in emotional memory processes. It is therefore conceivable that the anxiety elicited by the initial nicotine intake may assign a particular salience or value to this experience. Consequently, any alterations in dopaminergic signaling within this neural region during the period of drug intake could potentially alter the emotional salience of the intake event and influence the way in which animals subsequently respond to the drug. With this in mind, we sought to investigate the consequences of inhibition in the context of a reinforcement learning process using an optogenetic approach. Unfortunately, our results were inconclusive, as inhibition neither reduced nor increased the reinforcing effect of the stimulus. There are several plausible interpretations of these results. First, inhibition may not

play a significant role in the reinforcement process. Alternatively, the ineffectiveness of inhibition could be due to suboptimal parameters for optogenetic inhibition. For example, the duration of the inhibitory patterns may need to be increased in order to achieve detectable effects. Furthermore, it is possible that giving the animals a choice between NAc and NAc/Amg stimulation from the outset could have a more pronounced effect on their behavioral responses, potentially explaining the observed lack of effect. Further investigation is warranted to explore these intriguing possibilities.

METHOD DETAILS

Animals

Experiments were performed on wild-type (WT) C57Bl/6Rj (Janvier Labs, France), DATiCRE (DAT-Cre), DAT-D2^{KO}, ACNB2^{KO} ($\beta 2^{\text{KO}}$) mice, weighing 25-35 grams. $\beta 2^{\text{KO}}$ mice were provided by Uwe Maskos' team (Pasteur institute, Paris, France). DATiCRE mice were provided by François Tronche's team (IBPS Paris, France), and were bred on site and genotyped as described (Turiault et al., 2007). DAT-D2-KO were provided by Emmanuel Valjent's team (IGF, Montpellier, France). WT animals were males, while the transgenic animals were equally divided between males and females.

Mice were kept in an animal facility where temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity were automatically monitored and a circadian light cycle of 12/12-h light-dark cycle was maintained. All experiments were performed on 8-to-20-week-old mice.

All experiments were performed in accordance with the recommendations for animal experiments issued by the European Commission directives 219/1990, 220/1990 and 2010/63, and approved by Sorbonne University.

Virus

Lentiviruses were prepared in Pasteur institute as previously described (Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013), with a titer of either 260 ng/ μl for the AChR $\beta 2$ -expressing vector (PDGF.low.mCherry.lox. $\beta 2$) or 370 ng/ μl for GFP-expressing vector (PDGF.low.mCherry.lox. $\beta 2$). AAV-Ef1a-flox-hChR2-YFP and CAG-Flex-Jaws-eGFP was prepared by Vision Institute (Paris, France). pAAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP and pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2 was provided by Addgene. ssAAV-retro/2-hSyn1-chl-mCherry_2A_iCre-WPRE-SV40p(A) and ssAAV-retro/2-hEF1a-dlox-hChR2(H134R)_EYFP(rev)-dlox-WPRE-hGHp(A) was provided by VVF Zurich.

Drugs

In all our experiments we used a nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich, USA) and liquid ethanol 96% (Emprove, Ph Eur BP, Sigma-Aldrich).

For juxtacellular and tetrode recordings, we performed an intravenous injection (IV) of nicotine at a dose of 30 µg/kg or ethanol at a dose of 250 mg/kg or saline solution (H₂O with 0.9% NaCl). For patch-clamp recordings, we used 30 µM of nicotine for bath-application and 10, 30 or 100 µM for local puffs. All solutions were prepared in the laboratory.

Stereotaxic surgeries

For viral or retrobead injections, mice were anesthetized with a gas mixture of oxygen (1 L/min) and 3% isoflurane (IsoFlo) through a TeamSega apparatus. Mice deeply anesthetized were then placed in a stereotaxic frame (David Kopf), maintained under anesthesia throughout the surgery at 3 to 2% isoflurane. The skin was shaved, disinfected and locally anesthetized with 100 µl of lurocaine 10% at the location of the scalp incision. Depending on the experiments that are developed below, unilateral or bilateral craniotomies were then performed over the VTA, NAc or BLA. At the end of the surgery, 75 µl of buprenorphine (Buprecare, 0.1 mg/kg) was injected subcutaneously to prepare awakening.

Retrobeads injections

Green or red fluorescent retrograde tracers, retrobeads (RB, Lumafluor), were performed using a cannula (diameter 36G, Phymep, Paris, France). Red RB were using when combined with optogenetic experiments in slice electrophysiology, to not overlap with the ChR2-YFP signal. Green RB were used for juxtacellular recordings, and for patch-clamp recordings without optogenetics. The cannula were connected to a 10 µl Hamilton syringe (Mode 1701, Hamilton Robotics, Bonaduz, Switzerland) placed in a syringe pump (QSI, Stoelting Co, Chicago, IL, USA). For juxtacellular recordings, injections were performed in the 3 subnuclei of the NAc (NAc medial shell NAcMSh: bregma 1.78 mm, lateral 0.45 mm, ventral 4.1 mm; NAc core: bregma 1.55 mm, lateral 1.0 mm, ventral 4.0 mm; NAc lateral shell NAcLSh: bregma 1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm) or in Amg (BLA: bregma -1.35 mm, lateral 3.07 mm, ventral 4.7 mm; CeA: bregma -0.78 mm, lateral 2.3 mm, ventral 4.8 mm). For patch-clamp experiments, only NAcLSh (bregma 1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm) and BLA (bregma -1.35 mm, lateral 3.07 mm, ventral 4.7 mm) were targeted with the same protocol of RB injection. To enable retrograde transport of the RB into the somas of midbrain DA neurons, we waited for an adequate time to perform the electrophysiological experiments, depending on the injection zone: 2 weeks after injection into the NAc and 3 to 4 weeks after injection into the Amg.

Lentiviral reexpression and optogenetic experiments

All viral and lentiviral injections were done using a glass micropipette (10 μ l graduated borosilicate glass capillary; Wiretrol I Calibrated Micropipettes, Drummond) prefilled with mineral oil was fixed into the MO-10 One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator (Narishige).

Added to some retrobeads experiments in patch-clamp experiments, activation of NAc terminals was mediated through viral injection of pAAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP (2×10^{13} , 26973, Addgene).

To perform re-expression of the $\beta 2$ subunit specifically in the VTA-NAc pathway of $\beta 2^{-/-}$ mice, we first injected ssAAV-retro/2-hSyn1-chl-mCherry_2A_iCre-WPRE-SV40p(A) (8.4×10^{12} , v147-retro, VVF Zurich) in the 3 subnuclei of the NAc (200 nl each site: NAc medial shell NAcMSh: bregma 1.78 mm, lateral 0.45 mm, ventral 4.1 mm; NAc core: bregma 1.54 mm, lateral 1.0 mm, ventral 4.0 mm; NAc lateral shell NAcLSh: bregma 1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm) and we waited 3 weeks for the Cre to expressed. We then performed unilateral injections of 700 nl of PDGF.lox.mCherry.lox.GFP (185 ng/nl, Pasteur institute) or PDGF.low.mCherry.lox. $\beta 2$ (260 ng/nl, Pasteur institute) in the VTA (bregma -3.1 mm, lateral 0.5 mm, ventral 4.5 mm).

To perform DA-neuron specific optogenetic activation of the VTA-NAc pathway for patch-clamp or tetrode recordings, we used 8-week-old DAT-Cre mice, in which Cre recombinase expression is restricted to DA neurons without disrupting endogenous dopamine transporter (DAT) expression (Turiault et al., 2007; Zhuang et al., 2005). We injected ssAAV-retro/2-hEF1a-dlox-hChR2(H134R)_EYFP(rev)-dlox-WPRE-hGHp(A) (5.4×10^{12} , v214-retro, VVF Zurich) in the 3 subnuclei of the NAc (200 nl each site: NAc medial shell NAcMSh: bregma 1.78 mm, lateral 0.45 mm, ventral 4.1 mm; NAc core: bregma 1.55 mm, lateral 1.0 mm, ventral 4.0 mm; NAc lateral shell NAcLSh: bregma 1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm) and we waited 3 weeks before recordings.

To perform non-conditional optogenetic inhibition of the NAc inputs onto the VTA for tetrode recordings, we injected pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2 (1.3×10^{13} 1:10 dilution, 65014, Addgene) in the 3 subnuclei of the NAc (200 nl each site: NAc medial shell NAcMSh: bregma +1.78 mm, lateral 0.45 mm, ventral 4.1 mm; NAc core: bregma +1.54 mm, lateral 1.0 mm, ventral 4.0 mm; NAc lateral shell NAcLSh: bregma +1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 4.0 mm) in WT mice.

To perform DA neuron-specific optogenetic experiments, we did unilateral injections in the VTA (bregma -3.1 mm, lateral 0.5 mm, ventral 4.5 mm) of 6-week-old DAT-Cre mice, with 400 nl of AAV-Ef1a-flox-hChR2-YFP (9.59×10^{14} 1:10 dilution) or CAG-Flex-Jaws-eGFP (1.16×10^{14} 1:10 dilution) A double-floxed inverse open reading frame (DIO) allowed restraining to VTA DA neurons the expression of ChR2 for activation, or Jaws a red-shifted cruxhalorhodopsin Jaws (Chuong et al., 2014) for inhibition. Optical fibers (200 μ m core, NA = 0.39, ThorLabs) coupled to a zirconia ferule (1.25 mm) were implanted unilaterally or bilaterally depending on the experiments, in the different target sites of the VTA DA neurons

(coordinates for BLA implantation: bregma -1.35 mm, lateral 3.07 mm, ventral 4.55 mm) (coordinates for NAcLSH implantation: bregma +1.45 mm, lateral 1.75 mm, ventral 3.90 mm), and fixed to the skull with dental cement (SuperBond, Sun medical).

***In vivo* electrophysiology on anesthetized animals**

Induction of anesthesia was done with gas mixture of oxygen (1 L/min) and 3% isoflurane (IsoFlo) through a TeamSega apparatus. Mice deeply anesthetized were then placed in a stereotaxic frame (David Kopf), maintained under anesthesia throughout the surgery at 3 to 2.5% isoflurane. The scalp was opened and a cranial window was drilled in the skull above the location of the VTA (coordinates: 3.1 ± 3 mm posterior to bregma, 0.4 to 0.5 mm lateral to the midline, 3.9 to 5 mm ventral from the brain). During recordings, mice were maintained deeply anesthetized at 2 % isoflurane, with monitoring and adjustment of the anesthesia throughout the experiment. Intravenous (IV) administration of saline, nicotine (30 μ g/kg) or ethanol (250 mg/kg) was carried out through a catheter (30G needle connected to polyethylene tubing PE10) connected to a Hamilton syringe, into the saphenous vein of the animal. For multiple doses of ethanol, mice received two to four injections of 125, 250, 500 and/or 750 mg/kg (pseudo-randomly administrated).

Juxtacellular recordings

To perform single unit extracellular recordings, recording electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, with outer and inner diameters of 1.50 and 1.17 mm, respectively) with a Narishige electrode puller. The tips were broken under microscope control and filled with 0.5% sodium acetate containing 1.5% of neurobiotin tracer (VECTOR laboratories). Electrodes had tip diameters of 1-2 μ m and impedances of 6–9 M Ω . A reference electrode was placed in the subcutaneous tissue. The recording electrodes were lowered vertically through the hole with a micro drive. Electrical signals were amplified by a high-impedance amplifier (Axon Instruments) and monitored through an audio monitor (A.M. Systems Inc.). The unit activity was digitized at 25 kHz and recorded using Spike2 software (Cambridge Electronic Design) for later analysis. Individual electrode tracks were separated from one another by at least 0.1 mm in the medio-lateral axis. The electrophysiological characteristics of dopamine neurons were analyzed in the active cells encountered when passing the microelectrode in a stereotaxically defined block of brain tissue corresponding to the coordinates of the VTA (coordinates: between 3 to 3.4 mm posterior to bregma, 0.4 to 0.6 mm lateral to midline, and 3.9 to 5 mm below brain surface). Extracellular identification of dopamine neurons was based on their location as well as on the set of unique electrophysiological properties that distinguish dopamine from non-dopamine neurons *in vivo*: (i) a typical triphasic action potential with a marked negative deflection; (ii) a long duration (>2.0 ms);

(iii) an action potential width from start to negative trough >1.1 ms; (iv) a slow firing rate (<10 Hz and >1 Hz). After recording, nicotine-responsive cells were labeled by electroporation of their membrane: successive current squares were applied until the membrane breakage, to fill cell soma with neurobiotin contained into the glass pipet (Pinault, 1996). To be able to establish correspondence between neurons responses and their localization in the VTA, we labeled one type of response per mouse: solely activated neurons or solely inhibited neurons, with a limited number of cells per brain (1 to 4 neurons maximum, 2 by hemisphere), always with the same concern of localization of neurons in the VTA. All data were analyzed with R.

Multi-unit extracellular recordings

4-5 weeks after viral infection, we used a Mini-Matrix (Thomas Recording) allowing us to lower within the VTA: up to 3 tetrodes (Tip shape A, Thomas Recording, $Z = 1-2$ MW) and a tip-shaped quartz optical fiber (100 μ m core, NA = 0.22, Thomas Recording) for photostimulation. The fiber was coupled to a dual LED (450-465 nm for ChR2, 600-630 nm for Jaws, Prizmatix) with an output intensity of 200–500 mW at the tip of the fiber for both wavelengths. These five elements could be moved independently with micrometer precision. Tetrodes were lowered in the medial part of the VTA while the optical fiber was lowered in the lateral part of the VTA 100 μ m above the tetrodes (300 μ m between the two elements). Spontaneously active putative DA neurons were identified on the basis of the electrophysiological criteria used for juxtacellular recordings. Baseline activity was recorded for 5 minutes, prior to IV injection of nicotine allowing us to target drug-inhibited neurons and then second IV injection of drug with optical-stimulation was performed. Electrophysiological signals were acquired with a 20 channels preamplifier included in the Mini Matrix (Thomas Recording) connected to an amplifier (Digital Lynx SX 32 channels, Neuralynx) digitized and recorded using Cheetah software (Neuralynx). Spikes were detected using a custom-written Matlab routine and sorted using a classical principal component analysis associated with a cluster cutting method (SpikeSort3D Software, Neuralynx). All the data were analyzed with R (<https://www.r-project.org>) and Matlab (MathWorks).

Ex vivo electrophysiology: patch clamp recordings

Mice were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of a mix of ketamine (150 mg/kg Virbac 1000) and xylazine (60 mg/kg, Rompun 2%, Elanco). Coronal midbrain sections (250 μ m) were sliced with a Compressstome (VF-200, Precisionary Instruments) after intracardial perfusion of frozen sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (SB-ACSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 5.9 MgCl_2 , 25 sucrose, 2.5 glucose, 1 kynurenate (pH 7.2, 325 mOsm). After 8 minutes at 37°C

for recovery, slices were transferred into oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 15 sucrose, 10 glucose (pH 7.2, 325 mOsm) at room temperature for the rest of the day. Slices were individually transferred to a recording chamber continuously perfused at 2 mL/minute with oxygenated ACSF. Patch pipettes (4-6 MΩ) were pulled from thin wall borosilicate glass (G150TF-3, Warner Instruments) with a micropipette puller (P-87, Sutter Instruments Co.). Neurons were visualized using an upright microscope coupled with a dot gradient contrast imaging, and illuminated with a white light source (Scientifica). Whole-cell recordings were performed with a patch-clamp amplifier (Axoclamp 200B, Molecular Devices) connected to a Digidata (1550 LowNoise acquisition system, Molecular Devices). Signals were low-pass filtered (Bessel, 2 kHz) and collected at 10 kHz using the data acquisition software pClamp 10.5 (Molecular Devices). VTA location was identified under microscope. Identification of dopaminergic neurons was performed by location and by their electrophysiological properties (width and shape of action potential (AP) and after hyperpolarization (AHP)).

To perform recordings of spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSCs), we used Cesium-based internal solution of (in mM): 130 CsCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.2 NaGTP, 0.1% neurobiotin pH 7.35 (270-285 mOsm). Local perfusion was used to apply nicotine locally in the bath above recorded cells. Recordings of light-evoked GABA current from activation of NAc terminals were conducted in presence of 20 μM DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione, HelloBio) and 50 μM D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, HelloBio) to block respectively AMPA and NMDA receptors, 500 mM of TTX (tetrodotoxin citrate, HelloBio) to block voltage-gated sodium channels and 1mM of 4-AP (4-aminopyridine, HelloBio) to block potassium channel antagonist (Cho et al., 2013). Light-evoked responses were obtained every 10s with one pulse (3ms) of 460 nm wavelength (5 sweeps for each neuron). For recordings of miniature IPSCs, Cs-based internal solution was used with 20 μM DNQX, 50 μM D-AP5 and 500 nM TTX.

To perform characterization of DA subpopulations and puffs recordings (200 ms, 2 psi), potassium gluconate-based intracellular solution was used containing (in mM): 135 K-gluconate, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 ATP-Mg, 0.2 GTP-Na, and biocytin 2 mg/mL (pH adjusted to 7.2). Same internal solution was used to record optical stimulation of retroChR2 virus in NAc-projecting DA neurons. To characterize retroChR2 expression, 10 and 20 Hz (3s pulse; train rate of 10 or 20 Hz; 5 sweeps of 10s) photostimulation were used to drive neuronal firing in current-clamp mode. 30% LED intensity was used, as no higher amplitude currents were observed above this threshold.

Behavioral task

For optogenetic self-stimulation of DA neurons (oDASS, Harada et al., 2021), we used operand chamber (MED Associates) with 2 levers. The oDASS task consisted of a 2 hour-session in which animals were free to explore and press the levers whenever they wanted. An ultra-high-power LED (450-465 nm for ChR2, 600-630 nm for Jaws, Prizmatix) coupled to a patch cord (1000 μ m POF, NA = 0.63, Prizmatix or 200 μ m core, NA = 0.37, Doric) was used for optical stimulation (output intensity of 5 mW; frequency of 20 Hz, 4 ms-pulse and 5s duration for ChR2; continuous stimulation for Jaws). LED output was controlled using a Master-8 pulse stimulator (A.M.P.I., Jerus).

The aim was to study the value of a lever depending on the optogenetic stimulation associated with it. Three types of experiments were performed: 1) activation of VTA_{DA}-NAc only, 2) activation of VTA_{DA}-NAc together with inhibition of VTA_{DA}-BLA, or 3) simultaneous activation of VTA_{DA}-NAc and VTA_{DA}-BLA.

During the first week (5 days), only one lever was active, indicated by a light cue, and was flipped to the side each day to ensure that the mice followed the cue and stimulation. Conditioning was performed by activating only the VTA_{DA}-NAc pathway.

During the second week, the two cues above the levers were on, but only one lever was active so that the mouse was tracking the stimulation and not just the cue. For groups (2) and (3), VTA_{DA}-BLA stimulation was added during this second week.

The third week was the week of choice, we had the two cues on and the two levers active. One lever elicited VTA_{DA}-NAc activation and the second lever elicited VTA_{DA}-BLA either inhibition or activation. During all experiments, the stimulation-induced levers were changed every day.

Fluorescence immunohistochemistry

Recorded neurons in patch-clamp experiments were filled with biocytin in order to validate presence of TH enzyme by immunohistochemistry, indicator of dopaminergic neurons. After recordings, slices were fixed in 4% PFA (paraformaldehyde) during a night. Recorded neurons in juxtacellular experiments were filled with neurobiotin and after euthanasia of the animals, brains were rapidly removed and fixed in 4% PFA. After a period of at least three days of fixation at 4°C, serial 60- μ m sections were cut from the midbrain with a vibratome.

Immunostaining experiments were performed as follows: free-floating VTA brain sections were incubated for 3 hours (juxtacellular experiments) or 6 hours (patch-clamp experiments) at 4°C in a blocking solution of phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma; A4503) (vol/vol) and 0.2% Triton X-100 (vol/vol), and then incubated overnight (juxtacellular experiments) or during 72 hours (patch-clamp experiments) at 4°C with a mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody (anti-TH, Sigma, T1299), at 1:500 or 1:200 dilution, in PBS containing 1.5% BSA and 0.2% Triton X-100. Sections were

then rinsed with PBS, and incubated for 3 hours (juxtacellular experiments) or 6 hours (patch-clamp experiments) at room temperature with Cy3-conjugated anti-mouse and AMCA-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) both at 1:500 or 1:200 dilution in a solution of 1.5% BSA in PBS. After three rinses in PBS, slices were wet-mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930). In the case of optogenetic or re-expression experiments, identification of transfected neurons by immunofluorescence was performed as described above, with addition of chicken anti-GFP primary antibody (1:500, ab13970, Abcam) in the 3% BSA solution. A goat-anti-chicken AlexaFluor 488 (1:500, Life Technologies) was then used as secondary antibody.

Microscopy was carried out with a fluorescent microscope, and images captured using a camera and analyzed with ImageJ. Immunoreactivity for both TH and biocytin (B) or neurobiotin allowed us to confirm the neurochemical phenotype of DA neurons in the VTA or the transfection success.

Quantification and statistical analysis

Method for classifying VTA DA neurons subpopulations in response to nicotine or ethanol injection.

Subpopulations of DA neurons were automatically classified using variation of firing frequency. First, we calculated the maximal variation from the baseline per neuron, within the first 3 minutes following injection. We then used a bootstrapping method to exclude non-responding neurons.

For each neuron, the maximal and the minimal value of firing frequency was measured within the response period (3 minutes) that followed nicotine or saline injection, and the bigger of the two are used to determine the maximum of variation induced by the given injection. The effect of nicotine or alcohol was assessed by comparing the maximum of firing frequency variation induced by the drug and saline injection. If the distribution of all maximum variation induced by nicotine or ethanol are different from those induced by saline, each neuron is then individually classified as activated or inhibited by bootstrapping. Baseline spike intervals were randomly shuffled 1000 times. Firing frequency was estimated on 60s-time windows, with 15 s time steps. For each neuron, we determined the percentile from the shuffled data corresponding to the drug-evoked response (max or min frequency after nicotine injection). Neurons were individually considered as responsive to nicotine or ethanol injection if this percentile is ≥ 0.95 or ≤ 0.05 . Responsive neurons displaying an increase in firing frequency ($\Delta f > 0$) were defined as “Nic+” or “EtOH+” while neurons displaying a decrease in firing frequency ($\Delta f < 0$) were defined as “Nic-” or “EtOH-”. For the dose-response curve, neurons were classified as EtOH+ or EtOH- based on their response for the first doses inducing a significant firing variation identified by bootstrapping.

The mean responses to nicotine and ethanol of activated and inhibited neurons are thus presented as a percentage of variation from baseline (mean $\pm$ SEM). Then, for activated (or inhibited) neurons, we compare the maximum (or minimum) value of firing frequency before and after injection for nicotine,

ethanol, and saline. Finally, to ensure that the drug-induced responses were different from the activation or inhibition induced by saline injection, we compared the firing variation induced by nicotine or ethanol with that induced by saline.

Statistical analysis

All statistical analyses were done using the R software with home-made routines. Results are plotted as mean $\pm$ SEM. The total number (n) of observations in each group and the statistical tests used for comparisons between groups or within groups are indicated directly on the figures or in the results sections. Comparisons between means were performed with parametric tests such as Student's t-test, or two-way ANOVA for comparing two groups when parameters followed a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test with $p > 0.05$), or Wilcoxon non-parametric test if the distribution was skewed. Holm's sequential Bonferroni post hoc analysis was applied, when necessary. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***), or $p > 0.05$ was considered not to be statistically significant. For the surrogate analyses, nicotine and ethanol responses from the experimental data groups were pooled to reconstruct a new surrogate data set. The percentage of correlation of drug responses from the surrogate was then calculated (number of pairs of responses showing the same polarity for the two drugs). We plotted the density of the percentage correlation from 10,000 surrogates and counted the number of times this percentage reached the level of the percentage of correlation observed with experimental data.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

T.L.B., F.M. and P.F. designed the study. T.L.B. and F.M. analyzed the data. T.L.B., F.M. and C.N. designed, performed and analyzed in vivo juxtacellular electrophysiological recordings. T.L.B. designed, performed and analyzed ex vivo patch clamp recordings. E.V. contributed to ex vivo patch clamp recordings. T.L.B. performed stereotaxic injections (with contribution from C.S.), fiber implantations and behavioral optogenetic experiments (with contribution from E.V. and L.D.). T.L.B., E.V., L.D. performed PFA mice intracardiac perfusion and immunostaining experiments. J.J. and N.G performed recordings and signal treatment for in vivo multi-unit experiments. S.T. contributed to in vivo juxtacellular electrophysiological recordings. C.S., L.M.R. and A.M. contributed to design behavioral optogenetic experiments. S.P., and U.M. provided viruses. E.V.J. provided DAT-D2-knockout (KO) mice. U.M. provided ACNB2-knockout (KO) mice. T.L.B., F.M. and P.F. wrote the manuscript.

REFERENCES

- Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Kremer, E. J., Malenka, R. C., Luo, L., Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping Article Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*, 162(3), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Changeux, J. P., Bertrand, D., Corringier, P. J., Dehaene, S., Edelstein, S., Léna, C., Le Novère, N., Marubio, L., Picciotto, M., & Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Research Reviews*, 26(2–3), 198–216. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00040-4)
- 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(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dongelmans, M., Durand-de Cuttoli, R., Nguyen, C., Come, M., Duranté, E. K., Lemoine, D., Brito, R., Ahmed Yahia, T., Mondoloni, S., Didienne, S., Bousseyrol, E., Hanneesse, B., Reynolds, L. M., Torquet, N., Dalkara, D., Marti, F., Mourot, A., Naudé, J., & Faure, P. (2021). Chronic nicotine increases midbrain dopamine neuron activity and biases individual strategies towards reduced exploration in mice. *Nature Communications*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27268-7>
- Doyon, W. M., Ostroumov, A., Ontiveros, T., Gonzales, R. A., & Dani, J. A. (2021). Ethanol produces multiple electrophysiological effects on ventral tegmental area neurons in freely moving rats. *Addiction Biology*, 26(2). <https://doi.org/10.1111/adb.12899>
- Durand-de-Cuttoli, R. D. De, Mondoloni, S., Marti, F., Lemoine, D., Nguyen, C., Naudé, J., D'izarny-Gargas, T., Pons, S., Maskos, U., Trauner, D., Kramer, R. H., Faure, P., & Mourot, A. (2018). Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. *ELife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.37487>
- Eddine, R., Valverde, S., Tolu, S., Dautan, D., Hay, A., Morel, C., Cui, Y., Lambolez, B., Venance, L., Marti, F., & Faure, P. (2015). A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. *Scientific Reports*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep08184>

- Harada, M., Pascoli, V., Hiver, A., Flakowski, J., & Lüscher, C. (2021). Corticostriatal Activity Driving Compulsive Reward Seeking. *Biological Psychiatry*, 90(12), 808–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.08.018>
- Lammel, S., Andrea, H., Hackel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2008). *Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System*. 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T. H., Changeux, J. P., & Faure, P. (2006). Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors. *Neuron*, 50(6), 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.007>
- Maskos, U., Molles, B. E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloëz-Tayarani, I., Bemelmans, A. P., Mallet, J., Gardier, A. M., David, V., Faure, P., Granon, S., & Changeux, J. P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436(7047), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>
- Mirenowicz, J., & Schultz, W. (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, 379(6564), 449–451. <https://doi.org/10.1038/379449a0>
- Narahashi, T., Aistrup, G. L., Marszalec, W., & Nagata, K. (1999). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: A new target site of ethanol. *Neurochemistry International*, 35(2), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00055-8)
- Nguyen, C., Mondoloni, S., Le Borgne, T., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., Solié, C., Reynolds, L. M., Durand-de Cuttoli, R., Tolu, S., Valverde, S., Didienne, S., Hanneke, B., Fiancette, J. F., Pons, S., Maskos, U., Deroche-Gamonet, V., Dalkara, D., Hardelin, J. P., ... Faure, P. (2021). Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron*, 109(16), 2604-2615.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>
- Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., & Lüscher, C. (2015). Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. *Neuron*, 88(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.017>
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *Journal of Neuroscience Methods*, 65(2), 113–136. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00144-1)

- Schultz, W. (2006). Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual Review of Psychology*, 57, 87–115. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070229>
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K. M., & Lüscher, C. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron*, 73(6), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., Zemdegs, J., Pagès, C., Hay, Y. A. H., Lambolez, B., Caboche, J., Gutkin, B., Gardier, A. M., Changeux, J. P., Faure, P., & Maskos, U. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular Psychiatry*, 18(3), 382–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>
- Tran, K. B., Lang, J. J., Compton, K., Xu, R., Acheson, A. R., Henrikson, H. J., Kocarnik, J. M., Penberthy, L., Aali, A., Abbas, Q., Abbasi, B., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abbastabar, H., Abdelmasseh, M., Abd-El salam, S., Abdelwahab, A. A., Abdoli, G., Abdulkadir, H. A., ... Murray, C. J. L. (2022). The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10352), 563–591. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01438-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01438-6)
- Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic Firing in Dopaminergic Neurons. *Science*, 324(May), 1080–1084.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A., & Uchida, N. (2012). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron*, 74(5), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y. E., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, 97(2), 434–449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>

FIGURE AND LEGENDS

Figure 1: Nicotine and ethanol elicit similar responses in VTA DA neurons.

(A) Intravenous (i.v.) injections of ethanol (EtOH; 250 mg/kg) or nicotine (Nic; 30 μ g/kg) induce activation or inhibition of specific VTA DA neurons in anesthetized mice, as shown in representative recordings. After recording, VTA DA neurons labeled with neurobiotin (NB) were subsequently identified by immunofluorescence, using markers such as tyrosine hydroxylase (TH) and streptavidin-AMCA targeting NB.

(B) Examples of change in firing rate variation (% of baseline) after paired i.v. injection of first nicotine and then ethanol for two VTA DA neurons activated (*top*) and inhibited (*bottom*) by the two drugs, respectively.

(C) Response density after i.v. injection of either ethanol (EtOH; gray, n=72) or nicotine (Nic; black, n=72) expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, $p>0.05$).

(D) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) after ethanol or saline (gray) i.v. injection in activated (EtOH+, red, n=52) and inhibited (EtOH-, blue, n=15) VTA DA neurons. Ethanol induced a significant increase or decrease in firing frequency compared to saline (*left*, paired Wilcoxon test, $***p<0.001$). Comparison of firing rate variation (Hz) between baseline and ethanol injection. Maximum firing rate after i.v. ethanol for EtOH+ neurons or minimum firing rate after i.v. ethanol for EtOH- neurons (*right*, paired Wilcoxon test, $***p>0.001$).

(E) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) after nicotine or saline (gray) i.v. injection in activated (Nic+, red, n=41) and inhibited (Nic-, blue, n=28) VTA DA neurons. Nicotine induced a significant increase or decrease in firing frequency compared to saline (*left*, paired Wilcoxon test, $***p<0.001$). Comparison of firing rate variation (Hz) between baseline and nicotine injection. Maximum firing rate after i.v. nicotine for Nic+ neurons or minimum firing rate after i.v. nicotine for Nic- neurons (*right*, paired Wilcoxon test, $***p>0.001$).

(F) Responses of VTA DA neurons to ethanol (*left*) or nicotine (*right*) i.v. injections. Responses are ranked based on drug response, from most activated (red) to most inhibited (pink).

(G) Correlation between ethanol- and nicotine-induced responses based on the percentage of frequency variation induced by the drugs. The insert shows the density of the percentage correlation obtained on 10000 surrogates. The red line represents the percentage correlation obtained with the experimental data.

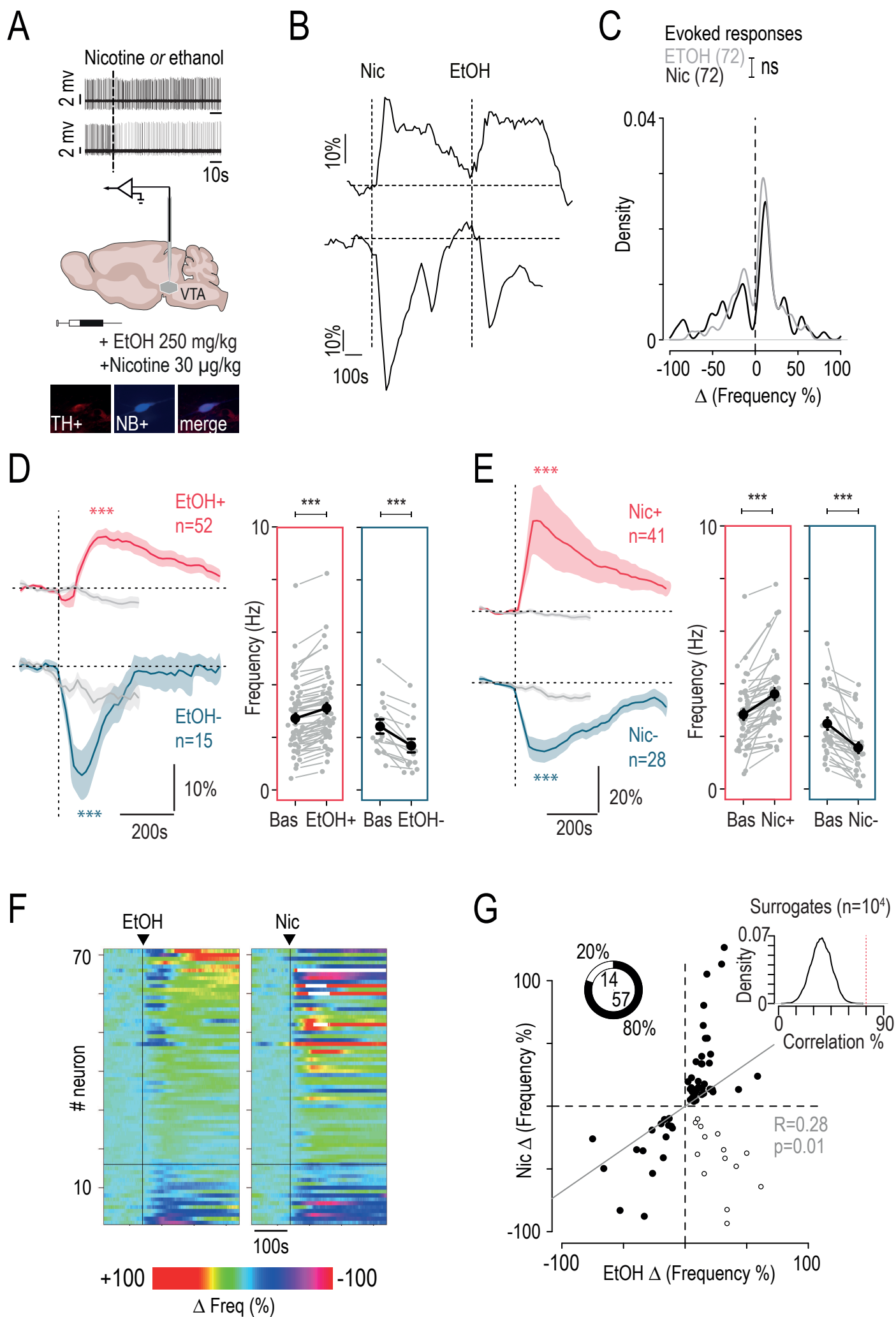


Figure 1

Figure 2: Nicotine and ethanol activate or inhibit the same dopaminergic pathways.

(A) Retrobeads were injected into the nucleus accumbens (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) or in the amygdala (Amg; injection in the basolateral [BLA] + central [CeA] nuclei) and *in vivo* recordings of VTA DA responses to an i.v. ethanol and nicotine injection were performed in anesthetized mice. Post hoc identification of NAc- or Amg-projecting DA neurons was performed by immunofluorescent co-labeling of tyrosine hydroxylase (TH), neurobiotin (NB), and retrobeads (RB).

(B) Response density after i.v. injection of nicotine in NAc- or Amg-projecting VTA DA neurons (brown, n=13; purple, n=16). Responses are expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, ***p<0.001).

(C) Left: Percentage of activated or inhibited VTA DA neurons (*top*) and firing rate variation between baseline and nicotine injection in NAc-projecting cells (*bottom*). Right: Percentage of activated or inhibited VTA DA neurons (*top*) and firing rate variation between baseline and nicotine injection in Amg-projecting cells (*bottom*) (paired Wilcoxon test, **p>0.01).

(D) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) after i.v. injection of nicotine or saline (gray) for activated VTA DA neurons projecting to the NAc (*top*, n=12) and inhibited VTA DA neurons projecting to the Amg (*bottom*, n=15). Nicotine induced a significant increase or decrease in firing frequency compared to saline (paired Wilcoxon test, ***p<0.001).

(E) Response density after i.v. injection of ethanol in NAc- or Amg-projecting VTA DA neurons (brown, n=13; purple, 16). Responses are expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, **p<0.01).

(F) Left: Percentage of activated or inhibited VTA DA neurons (*top*) and firing rate variation between baseline and ethanol injection in NAc-projecting cells (*bottom*). Right: Percentage of activated or inhibited VTA DA neurons (*top*) and firing rate variation between baseline and ethanol injection in Amg-projecting cells (*bottom*).

(G) Time course of mean change in firing frequency (% of baseline) after i.v. injection of ethanol or saline (gray) for activated VTA DA neurons projecting to the NAc (*top*, n=11) and inhibited VTA DA neurons projecting to the Amg (*bottom*, n=13). Ethanol induced a significant increase or decrease in firing frequency compared to saline (paired Wilcoxon test, ***p<0.001).

(H) Correlation between ethanol- and nicotine-induced responses based on percentage of drug-induced frequency change for NAc- and Amg-projecting VTA DA neurons.

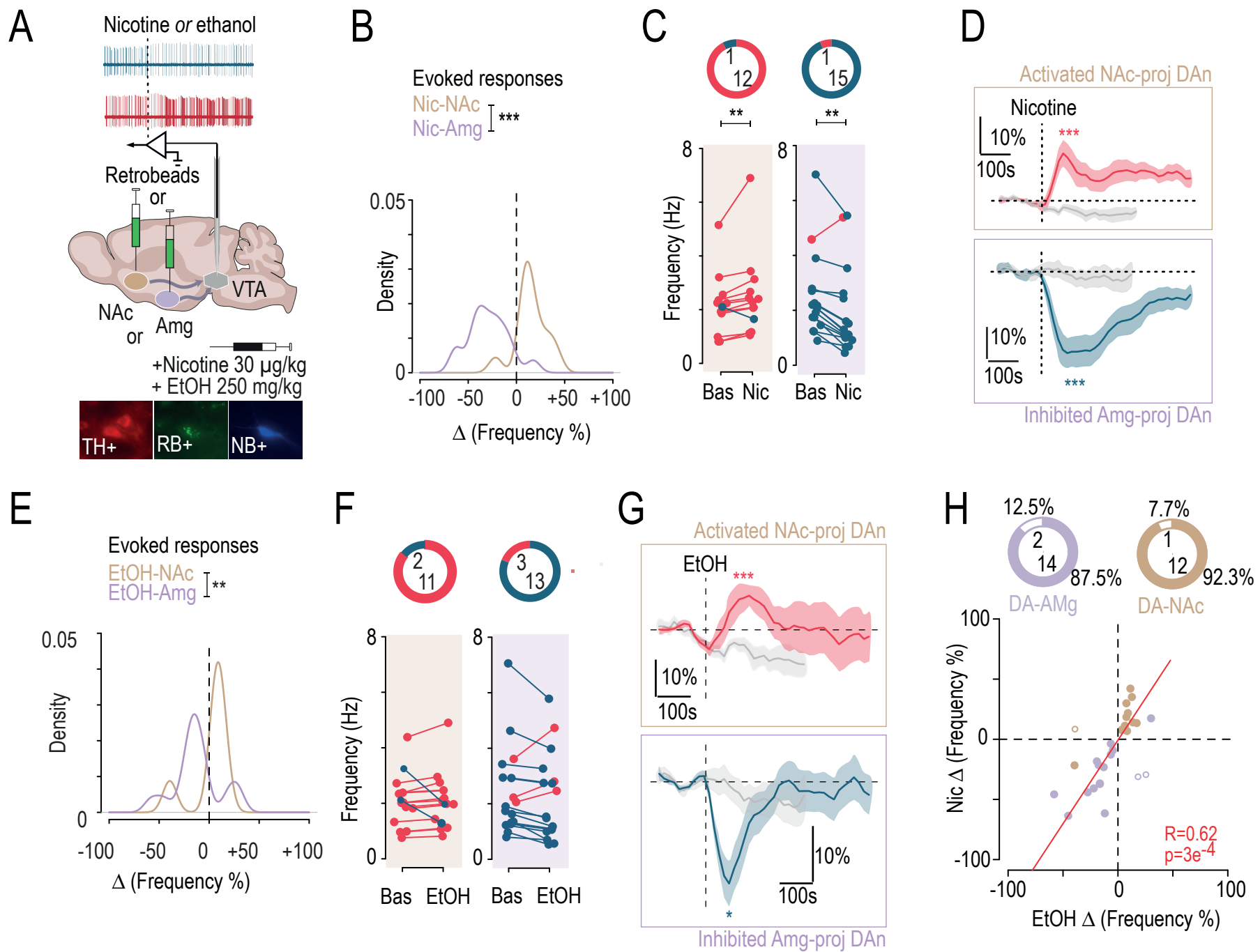


Figure 2

Figure 3: Nicotine-induced inhibition mediated by activation of NAc-projecting DA neurons.

(A) Retrobeads were injected into the NAcLatShell or in the BLA and *ex vivo* patch-clamp recordings of VTA DA neurons were performed. Post hoc identification of NAc- or Amg-projecting DA neurons was performed by immunofluorescent co-labeling of tyrosine hydroxylase (TH), neurobiotin (NB), and retrobeads (RB).

(B) Example electrophysiological traces of nicotinic currents in DA-NAcLatShell or DA-BLA DA neurons at three doses: 10, 30 and 100 μ M (*left*). Mean currents evoked by nicotine in either NAcShellLat-projecting (brown; dose 10 μ M, n=8; dose 30 μ M, n=13; dose 100 μ M, n=11) or BLA-projecting (purple, (dose 10 μ M, n=13; dose 30 μ M, n=8; dose 100 μ M, n=10) VTA DA (*right*, two-way ANOVA: dose effect $F_{2,57}=9.5$, *** $p<0.001$; projection effect, $F_{1,57}=1428.4$, *** $p<0.001$).

(C) Example electrophysiological traces of sIPSC before and after nicotine bath application and associated nicotinic currents (*left*). Mean sIPSC amplitude and frequency before and after nicotine in either BLA-projecting (n=14, right, *top*) or NAcLatShell-projecting (n=17, right, *bottom*) VTA DA neurons (Student's t-test, * $p<0.05$).

(D) AAVretroCre was injected into the nucleus accumbens (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) and lentiviral Cre-dependent re-expression of the $\beta 2$ subunit of nicotinic receptors in the VTA was performed.

(E) Response density after i.v. injection of nicotine or saline in GFP^{NAcVec} (n=19, *top*) or $\beta 2^{\text{NAcVec}}$ (n=32, *bottom*) VTA DA neurons. Responses are expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, * $p<0.05$).

(F) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) after i.v. nicotine or saline (gray) injection for GFP^{NAcVec} (black, *top*) or $\beta 2^{\text{NAcVec}}$ (red and blue, *bottom*) VTA DA neurons. Comparison of firing rate variation from baseline after saline and nicotine injection for nicotine-activated (red) or nicotine-inhibited (blue) VTA DA neurons (n=17 and 15, respectively) (*right*, paired Wilcoxon test, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$).

(G) AAVretroCre was injected into the amygdala (Amg; injection in the basolateral [BLA] + central [CeA] nuclei) and lentiviral Cre-dependent re-expression of the $\beta 2$ subunit of nicotinic receptors in the VTA was performed.

(H) Same as (E) for GFP^{AmgVec} (n=10, *top*) and $\beta 2^{\text{AmgVec}}$ (n=21, *bottom*) (Kolmogorov-Smirnov test, ** $p<0.01$).

(I) Same as (F) for GFP^{AmgVec} (n=10, *top*) and $\beta 2^{\text{NAcVec}}$ (n=12 and 4, respectively) (paired Wilcoxon test, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$).

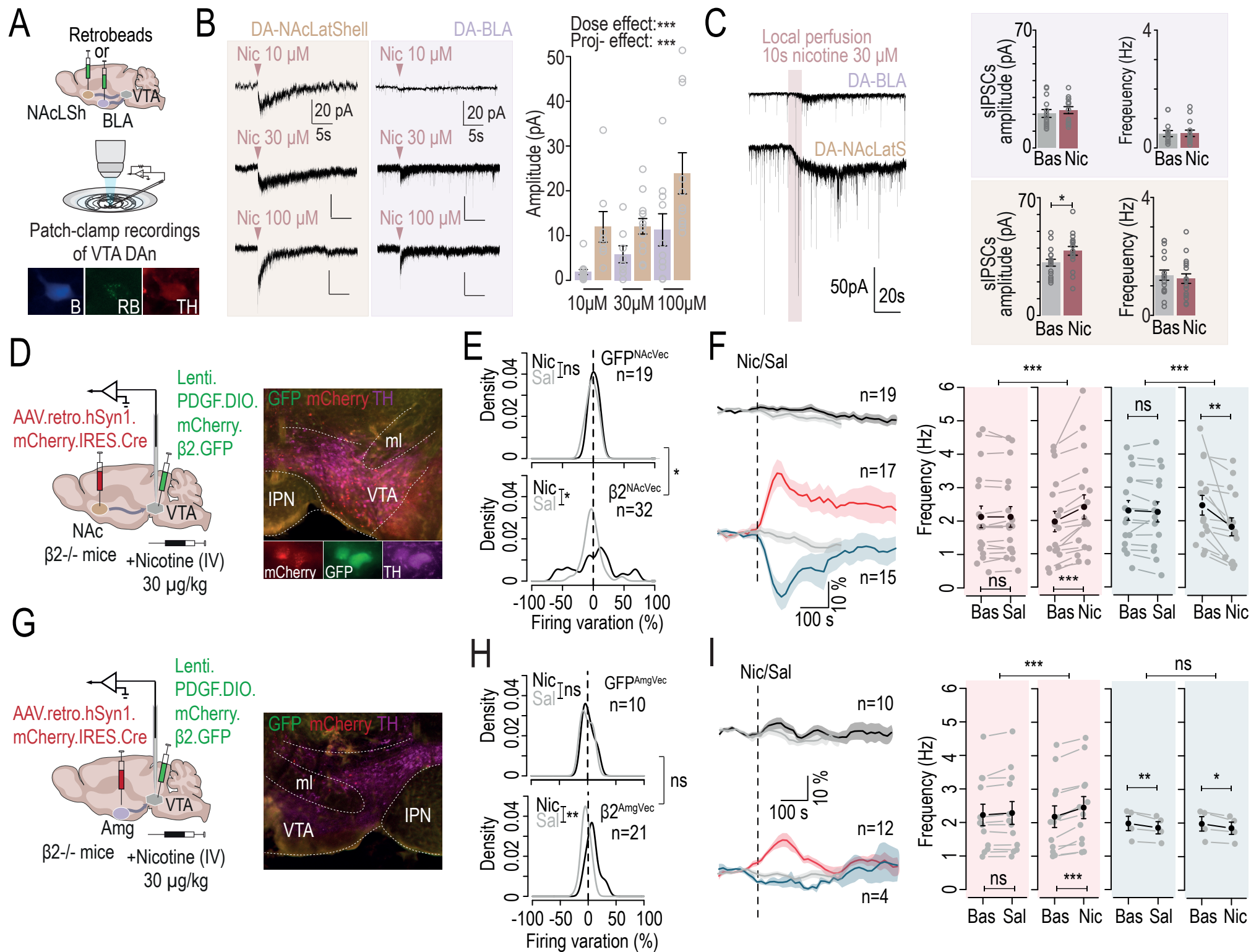


Figure 3

Figure 4: Circuit-based mechanism of pDA inhibition in the VTA.

(A) Retrobeads were injected into the BLA and ChR2 was injected into the NAc (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]).

(B) Example electrophysiological recordings of light-evoked IPSC in BLA-projecting DA neurons. Post hoc identification of BLA-projecting DA neurons by immunofluorescent co-labeling of tyrosine hydroxylase (TH), neurobiotin (NB), and retrobeads (RB).

(C) Synaptic connectivity plotted against the amplitude of light-evoked IPSCs from NAcMedShell, NAcLatShell or NAcCore projections on BLA-projecting VTA DA neurons (n=7/17 neurons, 8/13 neurons and 10/11 neurons, respectively).

(D) AAV for Cre-dependent expression of retroChR2 was injected into the NAc (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) of DAT-Cre mice, and patch-clamp or multi-unit extracellular recordings were performed (*left*). YFP-positive cells recorded in patch-clamp experiments were responsive to 10 and 20 Hz stimulation. Post hoc immunofluorescence verification of co-labeling of TH, YFP and B (*middle*). YFP signal was localized to the medial and lateral parts of the VTA.

(E) Response density following light-evoked stimulation (blue) or depending of baseline variation (gray). Responses are expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (n=43, Kolmogorov-Smirnov test: **p<0.01).

(F) Time course of the average change in firing frequency (% of baseline) upon light stimulation at 10 or 20 Hz in light-activated pDA neurons (red, *left*). Comparison of firing rate variation between baseline and light stimulation for 10 or 20 Hz stimulation pattern (n= 15 and 6, respectively; paired Wilcoxon test: *p<0.05, ***p< 0.001).

(G) Time course of the average change in firing frequency (% of baseline) upon light stimulation at 10 or 20 Hz in light-inhibited pDA neurons (blue, *left*). Comparison of firing rate variation between baseline and light stimulation for 10 or 20 Hz stimulation pattern (n= 13 and 8, respectively; paired Wilcoxon test, **p<0.01, ***p<0.001).

(H) JAWS virus was injected into the NAc (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) and multi-unit extracellular recordings were performed.

(I) Examples of change in firing rate variation (% of baseline) after i.v. nicotine injection, i.v. nicotine injection coupled with light inhibition of NAc terminals in the VTA, light inhibition of NAc terminals alone, or i.v. saline injection.

(J) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) to nicotine of pDA inhibited neurons (n=6) with (orange) or without (black) light inhibition of NAc terminals in the VTA. Comparison of maximum change from baseline between i.v. saline injection, i.v. nicotine injection alone, or i.v. nicotine injection + light stimulation (paired Student's t-test, **p<0.01, *p<0.05).

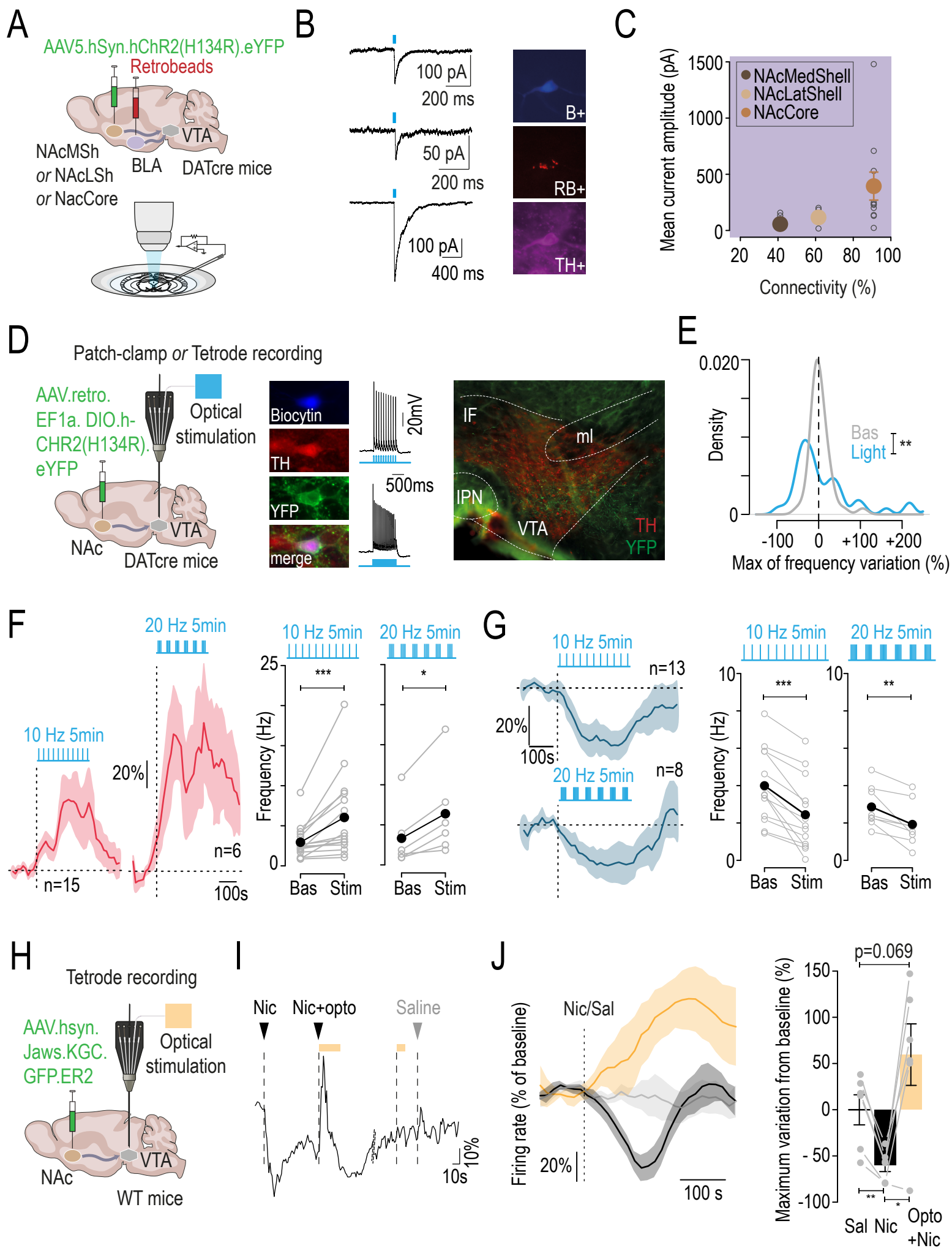


Figure 4

Figure 5: Modulation of the VTA-BLA pathway during optogenetic self-stimulation of DA neurons.

(A) AAVs for Cre-dependent expression of ChR2 and Jaws were injected into the VTA of DAT-Cre mice (one virus in each brain hemisphere), and optical fibers were implanted in the NAcLatShell (ChR2 side) or in the BLA (Jaws side). Mice performed an optogenetic DA neuron self-stimulation task (oDASS), consisting of a box with two levers. When one lever is active, it delivers optogenetic stimulation to DA neurons and is signaled by a light cue. By pressing the active lever, mice receive either activation of dopaminergic terminals in the NAcLatShell (460 nm, 4-ms pulse, 20 Hz, 5-s duration) or BLA (610 nm, continuous, 5-s duration), or both.

(B) A 4-week task protocol in which the active lever is switched daily (week1, conditioning; week2, reward tracking; week3, value-based choice; week4: extinction). Each session lasted 2 hours. During the first week, the active lever triggers VTA_{DA} -NAcLatShell activation and is signaled by a light cue (ON). During the second week, the active lever triggers simultaneous VTA_{DA} -NAcLatShell activation and VTA_{DA} -BLA inhibition. The active and the inactive lever are signaled by the same light cue (ON). In the third week, the two levers are active and signaled by the same light cue (ON). One lever triggers VTA_{DA} -NAcLatShell activation and the second lever triggers simultaneous VTA_{DA} -NAcLatShell activation and VTA_{DA} -BLA inhibition.

(C) Learning curve with sessions plotted against the mean number of lever presses for the active and inactive levers during the 4-week protocol. (n=10 animals, two-way ANOVA for each week: lever and session effect, **p<0.01, ***p<0.001).

(D) Learning curve with sessions plotted against the mean number of lever presses for the active and inactive levers. The first week is a re-conditioning week after the 4-week protocol, with VTA_{DA} -NAcLatShell activation associated only with the active lever signaled by the light cue (ON). In the following second week, the active lever (ON) triggers only VTA_{DA} -BLA inhibition (n=10 animals, two-way ANOVA for each week: lever and session effect, **p<0.01, ***p<0.001).

(E) Same as (A) but, AAVs for Cre-dependent expression of ChR2 were injected into both sides of the VTA of DAT-Cre mice. By pressing the active lever, mice receive activation of either NAcLatShell or BLA dopaminergic terminals, or both (ChR2 stimulation: 460 nm, 4-ms pulse, 20 Hz, 5-s duration; JAWS stimulation: 610 nm, continuous, 5-s duration).

(F) Same as (B), but with activation of VTA_{DA} -BLA dopaminergic terminals.

(G) Same as (C), but with activation of VTA_{DA} -BLA dopaminergic terminals (n=8 animals, two-way ANOVA for each week: lever and session effect, **p<0.01, ***p<0.001).

(H) Same as (D), but with activation of VTA_{DA} -BLA dopaminergic terminals (n=8 animals, two-way ANOVA for each week: lever and session effect, **p<0.01, ***p<0.001).

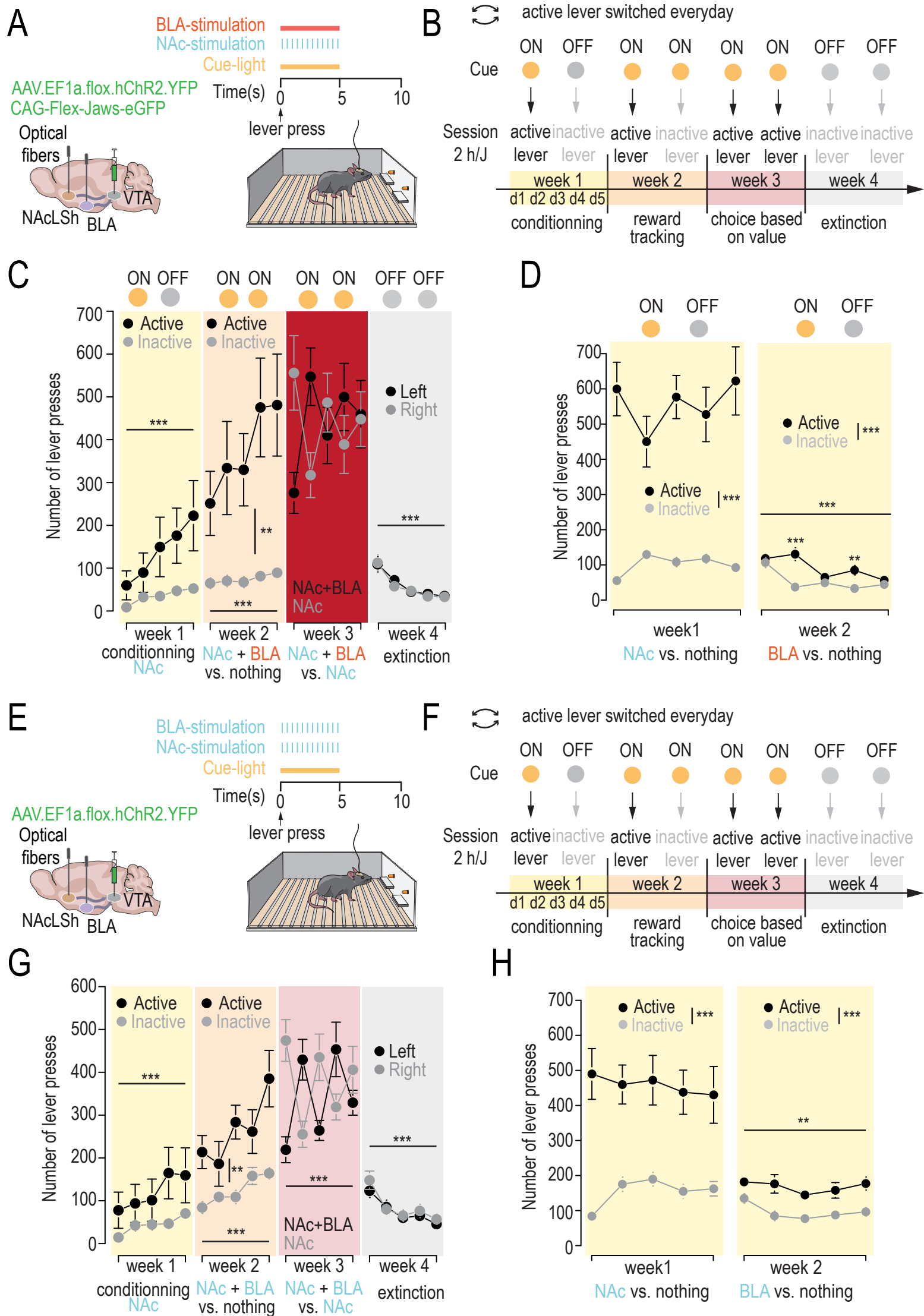


Figure 5

SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS

Figure S1: *In vivo* juxtacellular recordings of VTA DA neurons in response to nicotine and ethanol. Related to Figure 1.

(A) Response density after i.v. injection of either ethanol (EtOH; black, n=72) or saline (Sal; gray, n=72) expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, ***p<0.001).

(B) Response density after i.v. injection of either nicotine (Nic; black, n=72) or saline (Sal; gray, n=72) expressed as a percentage of the change in firing frequency induced by the injection (Kolmogorov-Smirnov test, ***p<0.001).

(C) Localization of activated (EtOH+) and inhibited (EtOH-) DA neurons by i.v. injection of ethanol, positioned on a Paxinos atlas slice at 3.3 mm from bregma, from neurobiotin-filled cell bodies of all recorded neurons (red, activated neurons, n = 52; blue, inhibited neurons, n = 15). EtOH- neurons had a more medial distribution within the VTA than EtOH+ neurons (Wilcoxon test, **p=0.005), but neither anteroposterior (Wilcoxon test, p=0.7) nor dorsoventral (Wilcoxon test, p=0.32) differences in their distribution were observed.

(D) Time course of mean change in firing frequency (% of baseline) after i.v. injection of different doses of ethanol for activated VTA DA neurons (EtOH+; red) and inhibited (EtOH-; blue) VTA DA neurons (*left*; 125, 250, 500 and 750 mg/kg; n= 6/10, 9/10, 9/11 and 6/8, respectively for EtOH+ and EtOH- DA neurons). Dose-response curves in EtOH+ (red) and EtOH- (blue) VTA DA neurons. Responses to different doses of ethanol are expressed as percentage of variation from baseline (*right*; two-way ANOVA: dose effect $F_{4,55}=10.83$, ***p<0.001 and $F_{4,73}=20.64$, ***p<0.001, respectively for EtOH+ and EtOH- DA neurons).

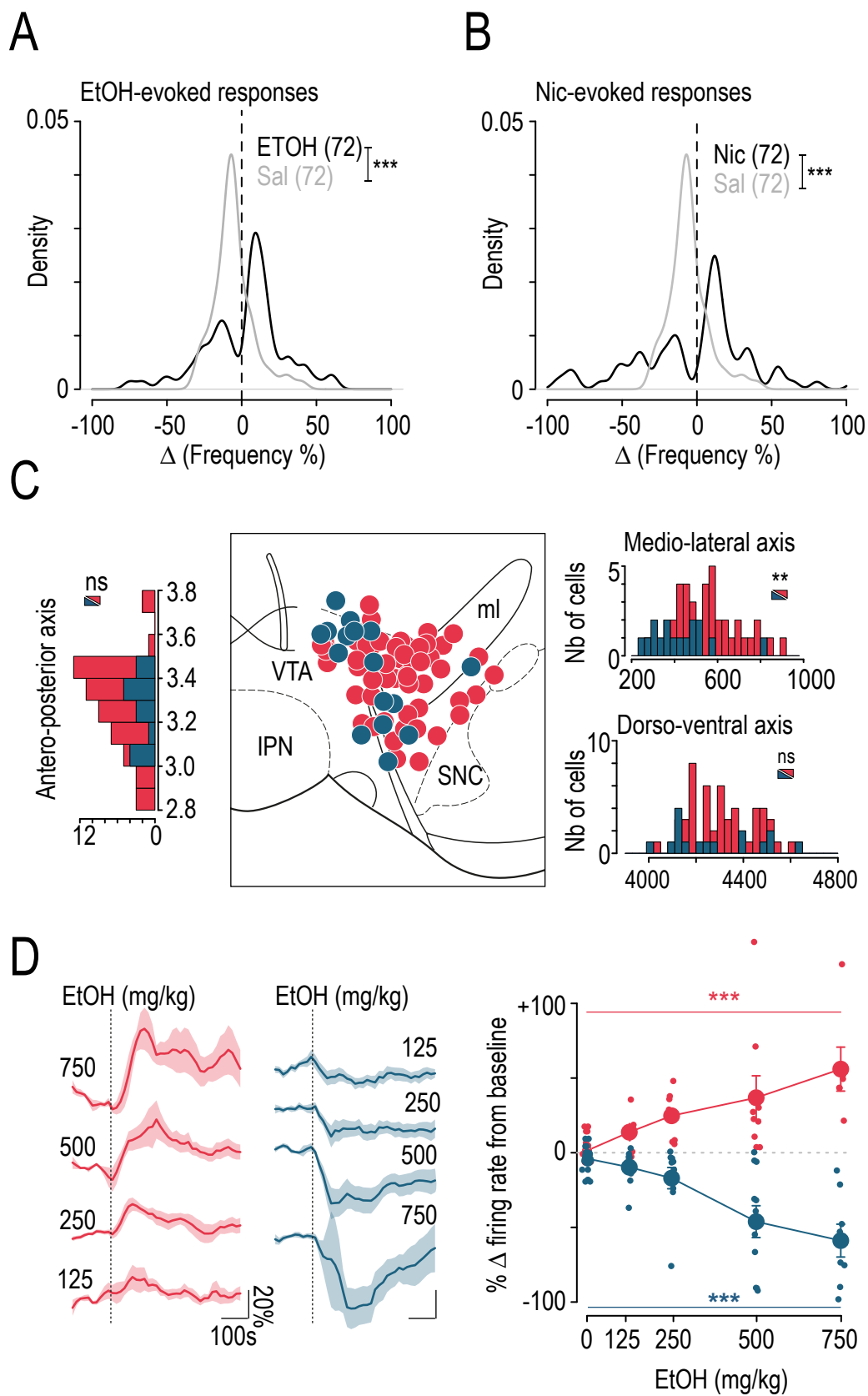


Figure S1

Figure S2: Identification of NAc- and Amg-projecting DA neurons. Related to Figure 2.

(A) Injection site of retrobeads (RB) injection in the amygdala (Amg), reported onto Paxinos atlas slice.

(B) Representative immunofluorescence image of VTA slices (TH+, red) revealing neurons containing RB (RB+, green) after RB injection into the Amg.

(C) Injection site of retrobeads (RB) injection in the nucleus accumbens (NAc), reported onto Paxinos atlas slice.

(D) Same as (B) but after RB injection into the NAc.

(E) Localization of Amg-projecting (purple) and NAc-projecting (brown) VTA DA neurons after i.v. injection of ethanol, positioned on a Paxinos atlas slice at 3.3 mm from bregma, from neurobiotin-filled cell bodies of all recorded neurons (purple, Amg-proj neurons, n=16; brown, NAc-proj neurons, n=13). Amg-proj DA neurons had a more medial distribution within the VTA than NAc-proj DA neurons (Wilcoxon test, *p=0.03), but neither anteroposterior (Wilcoxon test, p=0.13) nor dorsoventral (Wilcoxon test, p=0.38) differences in their distribution were observed.

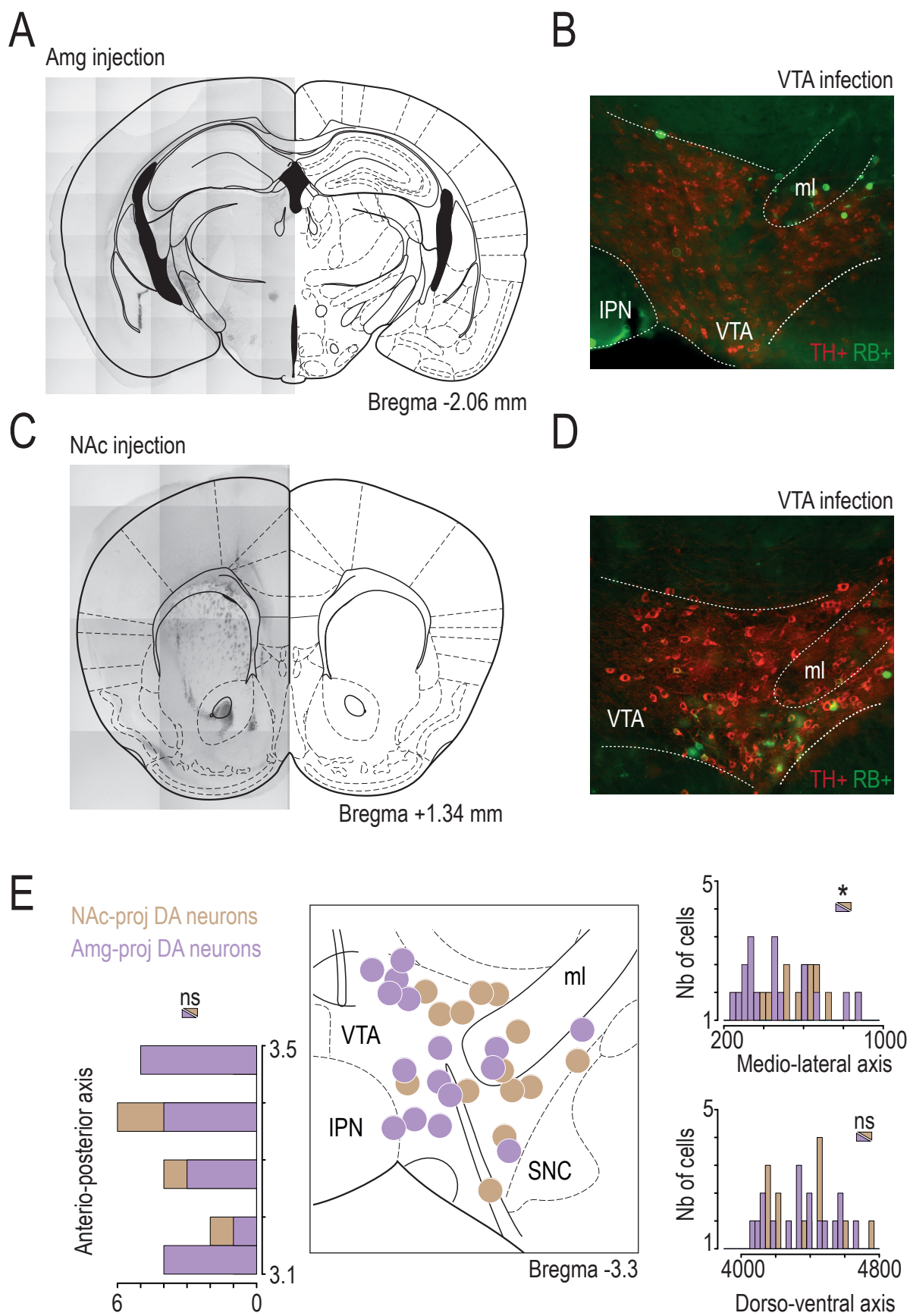
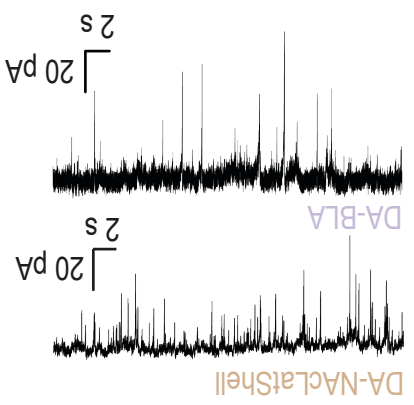


Figure S2

Figure S3: Local GABAergic inputs onto VTA DA neurons in patch-clamp recordings. Related to Figure 3.

- (A)** Example electrophysiological traces of mIPSCs from NAcLatShell- or BLA-projecting VTA DA neurons. Cumulative probability and mean plots of mIPSC amplitudes and frequencies from NAcLatShell- (brown) or BLA-projecting (purple) VTA DA neurons (Kolmogorov-Smirnov test, *** $p < 0.001$).
- (B)** Density plots of amplitudes (pA) from NAcLatShell- and BLA-projecting VTA DA neurons.
- (C)** Cumulative probability and mean plots of sIPSC amplitudes and frequencies, before (gray) and after (red) nicotine, from NAcLatShell- (brown) or BLA-projecting (purple) VTA DA neurons (Kolmogorov-Smirnov test, *** $p < 0.001$, ** $p = 0.01$; Student's t-test, * $p = 0.04$).
- (D)** Mean currents evoked by nicotine in either NAcShellLat-projecting (brown; $n = 17$) or BLA-projecting (purple, $n = 14$) VTA DA (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$).

A



C

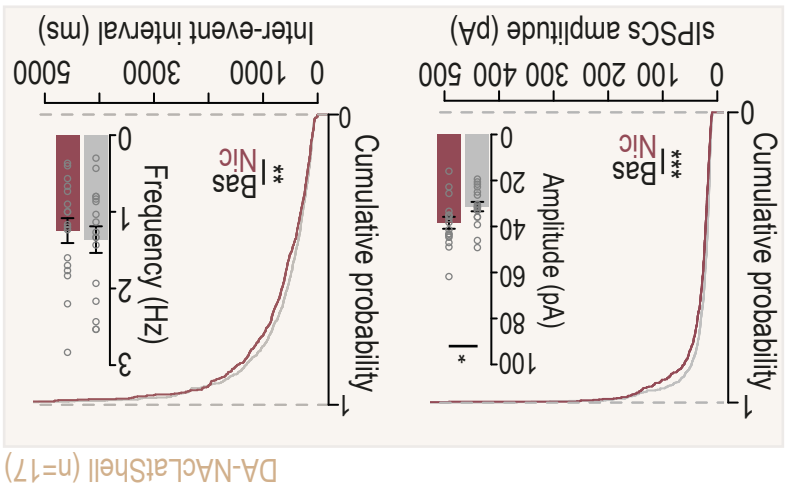


Figure S3

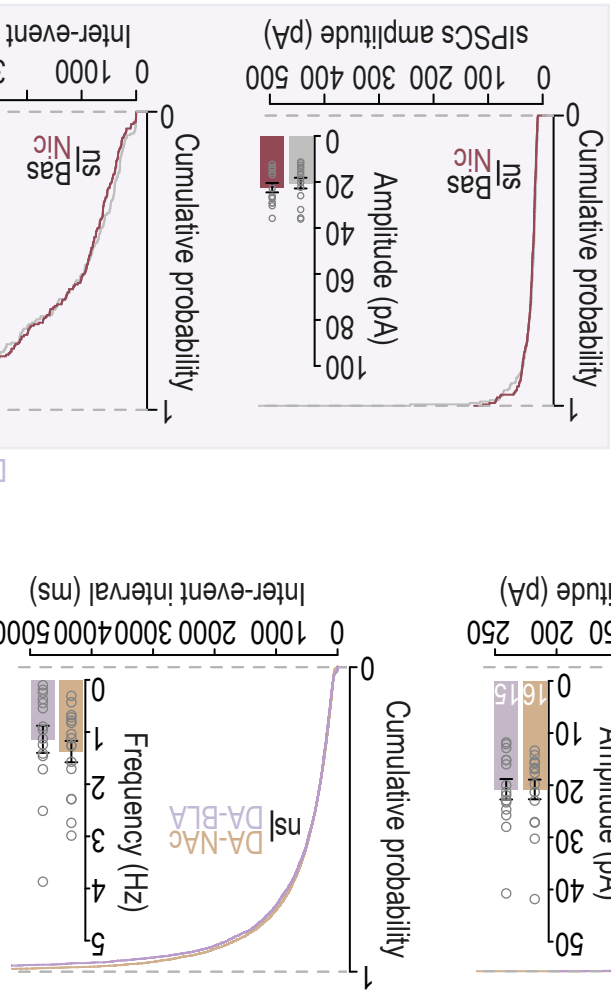


Figure S4: Nicotine-induced responses in DATD2^{-/-} mice. Related to Figure 3.

(A) *In vivo* juxtacellular recordings were performed on DATD2^{-/-} mice with i.v. injections of quinpirole (1mg/kg), eticlopride (1mg/kg) or nicotine (30 µg.kg).

(B) Examples and quantification of change in firing rate variation (% of baseline) after i.v. quinpirole and eticlopride injection, on wild-type (WT) or DATD2^{-/-} mice.

(C) Representative recordings of VTA DA neurons activated (*top*) or inhibited (*bottom*) by i.v. injection of nicotine.

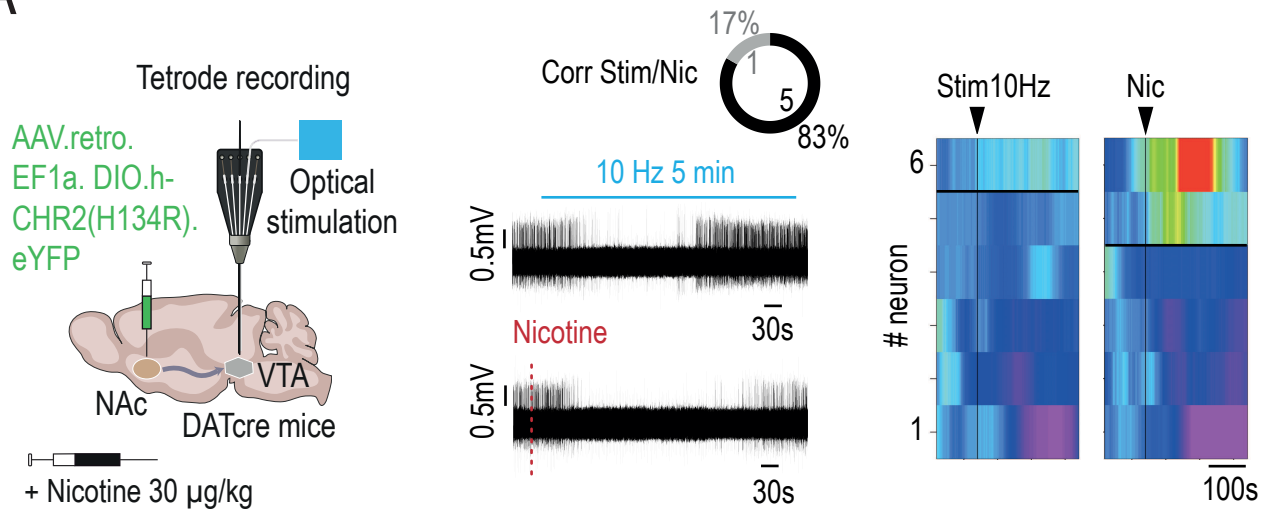
(D) Time course of the mean change in firing frequency (% of baseline) after nicotine (red or blue) i.v. injection in activated (Nic+, n=28; red) and inhibited (Nic-, n=9; blue) VTA DA neurons. Comparison of firing rate variation (Hz) between baseline (Bas) and saline (Sal) or nicotine (Nic) injection, in Nic+ and Nic- DA neurons. Maximum firing rate after i.v. nicotine for Nic+ neurons or minimum firing rate after i.v. nicotine for Nic- neurons (paired Student's t-test: between Bas vs Sal+, ***p<0.001, Bas vs Nic+, ***p<0.001, Bas vs Sal-, *p=0.037, Bas vs Nic-, *p=0.017; paired Wilcoxon test: between Bas-Sal vs Bas-Nic, ***p>0.001 and **p=0.008 respectively for Nic+ and Nic- neurons).

Figure S5: Multiunit recordings of VTA pDA neurons under nicotine and optogenetic modulation of VTA-NAc reciprocal pathways. Related to Figure 4.

(A) AAV for Cre-dependent expression of retroChR2 was injected into the NAc (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) of DAT-Cre mice, and multi-unit extracellular recordings coupled with i.v. injection of nicotine were performed (*left*). Representative recordings of VTA DA neurons inhibited by 10 Hz optogenetic VTA-NAc activation (*middle, top*) or inhibited by i.v. injection of nicotine (*middle, bottom*). Responses of VTA DA neurons to 10 Hz or nicotine i.v. injections (*right*). Responses are ranked based on 10 Hz photostimulation and nicotine response, from most activated (red) to most inhibited (pink) (*right*; n=6 neurons).

(B) AAV for expression of JAWS was injected into the NAc (NAc; injection in the lateral shell [NAcLatShell] + medial shell [NAcMedShell] + core [NAcCore]) of WT mice, and multi-unit extracellular recordings coupled with i.v. injection of nicotine were performed (*left*). Comparison of firing rate variation (Hz) between baseline (Bas; n=6) and 10 Hz photostimulation (Opto; n=6) or saline (Sal; n=6) or nicotine (Nic; n=6) or 10 Hz photostimulation coupled with nicotine (Opto+Nic; n=6) injection (paired Student's t-test: Bas vs Opto, p=0.31; Bas vs Sal, p=0.45; Bas vs Nic, *p=0.016; Bas vs Opto+Nic, p=0.25).

A



B

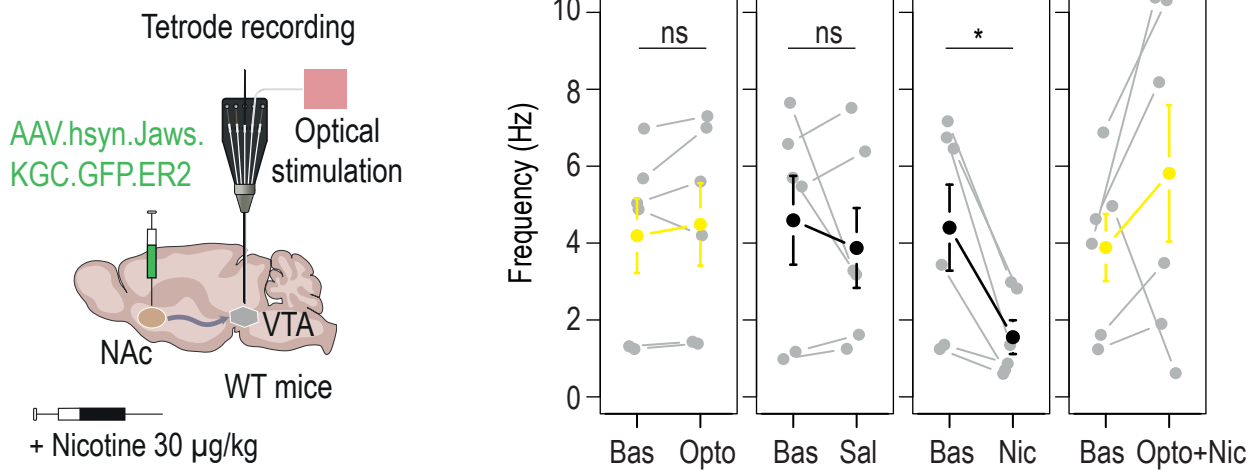


Figure S5

Figure S6: Optogenetic self-stimulation task of NAcLatShell-projecting DA neurons. Related to Figure 5.

(A) AAV for Cre-dependent expression of ChR2 was injected into the VTA of DAT-Cre mice and optical fibers were implanted in the NAcLatShell (ChR2 side). Mice performed an optogenetic DA neuron self-stimulation (oDASS) task, consisting of a box with two levers. When one lever is active, it delivers optogenetic stimulation to DA neurons and is signaled by a light cue. By pressing the active lever, mice receive activation of dopaminergic terminals in the NAcLatShell (460 nm, 4-ms pulse, 20 Hz, 5-s duration). After 5-s of stimulation, there is 5-s refractory period during which the mouse can press but does not receive stimulation.

(B) Optical fibers were implanted in the NAcLatShell (*top*) of DAT-Cre mice injected with ChR2 in the VTA (*bottom*). Representative immunofluorescence image of VTA slices (TH+, red) revealing neurons expressing ChR2 (YFP+, green).

(C) A 4-week task protocol in which the active lever is switched daily (week1, conditioning; week2, reward tracking; week3, value-based choice; week4: extinction). Each session lasted 2 hours.

(D) During the first week, the active lever triggers VTA_{DA}-NAcLatShell activation and is signaled by a light cue (ON) (N=10 animals; two-way ANOVA: lever effect, $F_{1,18}=5.8$, $*p=0.03$; session effect, $F_{4,72}=11.6$, $***p<0.001$). During the second week, the active lever triggers VTA_{DA}-NAcLatShell activation but the two cues are ON (N=10 animals; two-way ANOVA: lever effect, $F_{1,18}=7.2$, $*p=0.015$). The active and the inactive lever are signaled by the same light cue (ON). In the third week, the two levers are active, triggering VTA_{DA}-NAcLatShell activation, and signaled by the same light cue (ON) (N=10 animals; two-way ANOVA: no difference is observed). Finally, mice rapidly stopped pressing the levers during extinction (N=10 animals; two-way ANOVA: lever effect, $F_{1,18}=4.6$, $*p=0.05$, session effect, $F_{4,72}=32.3$, $***p<0.001$).

(E) Same three first weeks as in (D), but with reinforcers only (excluding lever presses during the refractory period) (N=10 animals; one-way ANOVA for week1: session effect, $F_{4,36}=7.8$, $***p<0.001$).

(F) Discrimination index during the three first weeks, i.e. the number of active levers out of the total number of lever presses.

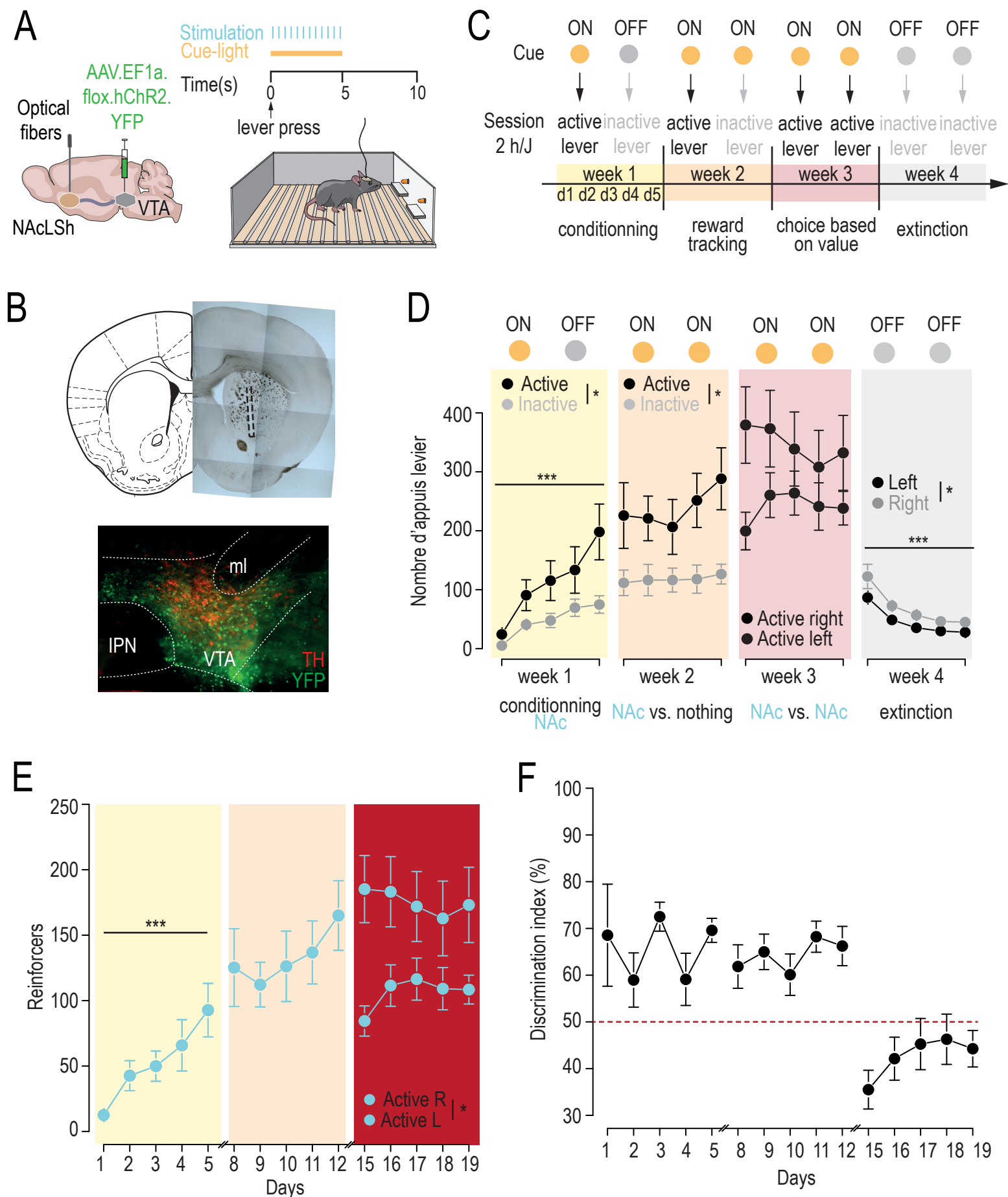


Figure S6

Discussion

Chapitre 6 : Discussion générale

Le système de récompense joue un rôle important dans de nombreux aspects de nos comportements tels que nos apprentissages, notre motivation ou encore nos prises de décision. Le fonctionnement de ce système est en partie lié à la DA provenant de la VTA, libérée de manière phasique en réponse à des récompenses et renforçant les comportements associés. Les substances addictives ont la capacité d'activer ce système en provoquant également une libération de DA, se substituant ainsi aux récompenses naturelles. Une consommation de drogue comme la nicotine peut alors conduire à un renforcement à cette dernière, menant par la suite à une perte de contrôle de la consommation malgré des conséquences négatives également engendrées par la prise. La satisfaction immédiate engendrée par les drogues perturbe le fonctionnement physiologique du système de récompense. Comprendre les mécanismes d'action de ces drogues est donc essentiel pour éclairer notre compréhension de la susceptibilité à la dépendance.

Mes travaux ont souligné l'hétérogénéité de la VTA, notamment en réponse aux drogues. Cet aspect sera discuté à la lumière des résultats obtenus. Dans un premier temps, nous aborderons la question de l'émergence d'une inhibition des neurones dopaminergiques en réponse à deux drogues distinctes, la nicotine et l'alcool ; puis étayerons l'hypothèse pouvant expliquer le mécanisme sous-tendant ces résultats. Enfin, nous examinerons le rôle de ce mécanisme dans le contexte de la dépendance, et étudierons son éventuelle implication dans des contextes non liés aux substances addictives.

I. Mécanisme de l'inhibition des neurones dopaminergiques dans un contexte de prise de drogues : l'hypothèse d'une boucle de rétroaction inhibitrice

À l'aide d'enregistrements juxtacellulaires *in vivo* effectués sur des souris, nous avons identifié une hétérogénéité de réponses provoquée par la nicotine au sein de deux populations distinctes de neurones dopaminergiques de la VTA. En plus de l'activation d'une sous-population, conformément à ce qui avait été traditionnellement décrit, la nicotine induit également une inhibition d'une autre sous-population, quel que soit le dosage administré. Ces résultats confirment des travaux précédents de l'équipe (Eddine et al., 2015), et reflètent l'importante diversité retrouvée au sein de la VTA. Nos résultats ont également mis en évidence une ségrégation anatomique de ces deux populations, avec la population inhibée située en partie médiale de la VTA. De plus, ces deux sous-populations projettent vers des régions distinctes : l'une vers le noyau accumbens (NAc) et l'autre vers l'amygdale (Amg).

Mes travaux de thèse ont permis d'étoffer la compréhension des mécanismes sous-jacents à une action opposée de la nicotine sur deux sous-circuits de la VTA. Dans un premier temps, c'est la compréhension du mécanisme de l'inhibition à la nicotine qui a motivé mes travaux de recherche. Le raisonnement associé au découpage de ce mécanisme s'articule autour de plusieurs résultats clefs.

Tout d'abord, il faut rappeler que la nicotine, en agissant au niveau des récepteurs nicotiques (nAChR), a une action dépolarisante sur les neurones qui les expriment. De ce fait, la nicotine ne peut directement inhiber une population neuronale. Nous avons montré une abolition complète des réponses à la nicotine – activées comme inhibées – chez les souris $\beta 2^{KO}$ (Chapitre 4). Une réexpression globale de la sous-unité $\beta 2$ dans la VTA (i.e sur toutes les populations neuronales) de souris $\beta 2^{KO}$ a montré une restauration des deux types de réponse. Ces résultats révèlent que l'activation et l'inhibition à la nicotine sont toutes deux dépendantes d'une action locale de la nicotine au niveau de la VTA.

Comme présenté en introduction, des résultats antérieurs de l'équipe montrent que, chez des souris $\beta 2^{KO}$, seule la double réexpression dans les neurones dopaminergiques et GABAergiques de la VTA restaure la réponse des neurones à la drogue ainsi que les comportements d'auto-administration à la nicotine (Tolu et al., 2013). Lorsque la sous-unité $\beta 2$ est réexprimée uniquement sur les neurones dopaminergiques de la VTA, cela rétablit principalement les réponses « excitatrices » (en fréquence mais pas en bouffées) alors qu'une réexpression uniquement sur les neurones GABAergiques déclenche une réponse « inhibitrice » au niveau de l'ensemble des neurones dopaminergiques (Tolu et al., 2013). Une réexpression de la sous-unité $\beta 2$ sur un type neuronal donné (DA ou GABA) va donc médier des réponses différentes à la nicotine. Ces résultats suggèrent que l'activation découle d'un effet direct de la nicotine sur les neurones dopaminergiques, tandis que les neurones GABAergiques pourraient être responsables de l'inhibition par un mécanisme indirect. De plus, cela pourrait supposer l'implication de sous-réseaux, présentant des différences d'expression de la sous-unité $\beta 2$ au sein de la VTA, dans l'inhibition à la nicotine. On peut alors poser deux questions. Est-ce que tous les neurones dopaminergiques répondent de la même façon à une action somatique de la nicotine ? Et y-a-t-il une sous-population de neurones dopaminergiques ciblée préférentiellement par une population GABAergique exprimant la sous-unité $\beta 2$?

Nous avons identifié deux sous-populations de neurones dopaminergiques en réponse à la nicotine. L'utilisation de traceurs rétrogrades (retrobeads) nous a permis de montrer que les sites de projection de ces deux populations de neurones n'étaient pas homogènes et que la proportion d'inhibés et d'activés varie considérablement selon la projection. En accord

avec la littérature qui montre l'importance des projections dopaminergiques vers le NAc ou l'Amg (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008, 2011), nous démontrons qu'une majorité des neurones projetant vers le NAc est activée alors qu'une majorité projetant vers l'Amg est inhibée par la nicotine. Cette démonstration nous a alors permis d'utiliser ce critère de projection pour analyser les propriétés des neurones activés ou inhibés dans des expériences sur tranches de cerveau, où ces neurones peuvent être ciblés grâce à des marqueurs rétrogrades. L'inhibition à la nicotine mise en évidence *in vivo* n'a pas pu être observée *ex vivo*. En revanche, ces expériences en *patch-clamp* nous ont offert la possibilité d'étudier différentes propriétés de neurones dopaminergiques marqués selon leur projection.

Dans ma première publication en tant que co-auteure, la proportion des courants nicotiques entre les deux sous-populations, projetant respectivement vers le NAc ou l'Amg, avait été analysée et aucune différence significative n'avait été détectée. Toutefois, dans ces premiers travaux, les populations des trois sous-noyaux du NAc (NAcShellLat + NAcShellMed + NAcCore) et des deux sous-noyaux de l'Amg (BLA + CeA) étaient ciblées globalement et une seule dose de nicotine (élevée, 100 μ M) était utilisée, ne permettant pas de conclure fermement sur une potentielle expression différentielle de la sous-unité $\beta 2$ (Chapitre 4). J'ai par la suite réalisé des expériences complémentaires, en ciblant cette fois spécifiquement les voies VTAD_A-NAcShellLat et VTAD_A-BLA. Nous avons ainsi pu tester plusieurs doses de nicotine, notamment plus faibles que celles utilisées précédemment, et avons montré une différence entre ces deux populations. La population VTAD_A-NAcShellLat est plus sensible à une activation directe de la nicotine, et ce, même pour des faibles doses (Chapitre 5). Ces résultats suggèrent donc : i) une différence d'expression de sous-unités nicotiques, avec par exemple la voie VTAD_A-NAcShellLat exprimant préférentiellement la sous-unité $\beta 2$ contrairement à la voie VTAD_A-BLA qui en exprimerait une(d') autre(s), ou ii) une différence du nombre de récepteurs nicotiques contenant la sous-unité $\beta 2$ exprimés à la membrane. Il n'est pas possible de conclure précisément sur l'une ou l'autre de ces deux hypothèses mais ces résultats mettent en évidence une différence d'efficacité directe de la nicotine au niveau somatique des neurones dopaminergiques de ces voies. Des différences d'expression de nAChR et des courants associés, entre les neurones de la VTA, ont déjà été décrites mais pas de manière voie-spécifique (Eddine et al., 2015; K. Yang et al., 2009). Pour aller plus loin, il serait intéressant de déterminer les sous-unités nicotiques préférentiellement exprimées dans les deux populations, à l'aide par exemple de techniques de *single-cell* qRT-PCR. Néanmoins, on observe une différence dans la balance excitation/inhibition entre la population VTAD_A-NAcShellLat qui apparaît plus activable par la nicotine que la population VTAD_A-BLA qui serait alors plus sensible à une potentielle source d'inhibition ciblant les neurones dopaminergiques de la VTA.

A la suite de cette première série de travaux, nous avons pu émettre plusieurs hypothèses pour expliquer l'émergence d'une réponse inhibitrice au sein de la VTA.

1. La première hypothèse est la plus intuitive, et découle des travaux précédents de l'équipe (Tolu et al., 2013). Elle suggère une inhibition indirecte qui serait médiée par des interneurons GABAergiques de la VTA, exprimant également des récepteurs nicotiniques, en particulier la sous-unité $\beta 2$ au niveau somatique. Cette hypothèse impliquerait l'existence de sous-réseaux GABAergiques locaux, ciblant différenciellement les sous-populations projetant respectivement vers le NAc ou l'Amg.
2. La seconde hypothèse se base sur l'observation que la nicotine active davantage la voie $VTADA-NAc$, et sur la capacité des neurones à libérer de la DA au niveau somato-dendritique, c'est-à-dire localement dans la VTA (Adell & Artigas, 2004; Kita et al., 2009; Rice et al., 1997). Il a notamment été montré une libération de DA intra-VTA induite par l'action de drogues et en particulier de nicotine (Rahman et al., 2004). Une explication possible à l'inhibition serait donc une action directe inhibitrice de la DA sur les autorécepteurs D2 des neurones dopaminergiques, présents peut être préférentiellement sur les neurones projetant vers l'Amg. Cette hypothèse est renforcée par la démonstration qu'un blocage systémique des effets de la DA bloque l'inhibition (Eddine et al., 2015).
3. La dernière hypothèse repose sur une combinaison d'éléments. La nicotine semble médier son action activatrice directe principalement sur la population projetant au niveau du NAc. La nicotine déclencherait donc en premier lieu une libération de DA dans le NAc pouvant dépolariser les D1-MSN. Nous l'avons vu en introduction, une importante interconnexion existe entre le NAc et la VTA (Beier et al., 2015; Lammel et al., 2008, 2011; Yang et al., 2018). Les MSN du NAc pourraient ainsi constituer une source d'inhibition GABAergique distale. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une boucle de rétrocontrôle inhibiteur du NAc sur la VTA, activée par une libération distale de DA, pouvait être impliquée dans l'inhibition à la nicotine des neurones de la voie $VTADA-Amg$.

Ces hypothèses ne sont a priori pas mutuellement exclusives et l'on peut imaginer avoir des mécanismes qui combinent ces actions. Néanmoins, je vais maintenant vous détailler les arguments qui nous ont mené à postuler la prévalence d'une hypothèse par rapport aux deux autres.

a. L'hypothèse GABAergique locale

Le moyen le plus intuitif de tester l'hypothèse GABAergique locale a été de débiter par des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* (patch-clamp). Le but était alors de retrouver sur tranches l'activation et l'inhibition à la nicotine observées *in vivo* et de combiner à ces expériences, l'application d'antagonistes spécifiques (des récepteurs GABA_A par exemple). L'activité spontanée des neurones dopaminergiques sur tranches étant nettement diminuée voire abolie, en comparaison à celle retrouvée *in vivo*, il était donc difficile de reproduire les conditions nécessaires pour observer une baisse de fréquence de décharge à la suite d'une application de nicotine. Nous avons donc décidé d'enregistrer les courants inhibiteurs reçus par les neurones dopaminergiques, en fonction de leur région de projection. Aucune différence en termes d'entrées synaptiques GABAergiques (mIPSC) n'a été observée au niveau basal entre les deux populations, n'indiquant pas à première vue, que ces neurones s'intègrent dans des réseaux GABAergiques différents. En revanche, j'ai noté une augmentation du tonus spontané (sIPSC) après application de nicotine dans le bain chez les neurones projetant vers le NAcShellLat (activés *in vivo*) mais pas sur les neurones projetant vers la BLA (inhibés *in vivo*). Ces résultats, au premier abord contre-intuitifs, révèlent cependant un contrôle inhibiteur de l'activité dopaminergique par les interneurones, qui pourrait être différent entre les deux populations. Ce *feedback* inhibiteur par les interneurones permettrait de maintenir une activité dans un certain régime, et donc participerait à la réponse à la nicotine. En effet, ces interneurones permettent de maintenir une synchronisation de l'activité des neurones dopaminergiques activés par la nicotine (Bouarab et al., 2019; Omelchenko & Sesack, 2009), qui pourrait par exemple s'avérer nécessaire pour induire une libération phasique de DA et donc un renforcement à plus grand échelle. De plus, comme nous l'avons vu, l'activation des interneurones GABAergiques est indispensable à l'augmentation des bouffées de PA durant la réponse à la nicotine et ce phénomène est nécessaire au renforcement (Tolu et al., 2013). Il n'est donc pas surprenant de constater que la nicotine induit une augmentation de la signalisation GABAergique chez les neurones de la voie VTAD_A-NAcShellLat, connus pour s'activer *in vivo* en réponse à la drogue.

Quoi qu'il en soit, les différences d'entrées GABAergiques induites par la nicotine au niveau des voies VTAD_A-NAcShellLat et VTAD_A-BLA, ne constituent pas un élément de réponse concernant le mécanisme de l'inhibition observé *in vivo*. En résumé, ces expériences suggèrent que la voie VTAD_A-BLA est peu activée par la nicotine mais également peu inhibée par les neurones GABAergiques locaux, ou du moins par les terminaisons GABAergiques toujours présentes en tranches.

b. L'hypothèse de l'activation qui entraîne l'inhibition

Une seconde hypothèse serait que l'inhibition d'une population de neurones dopaminergiques découle de l'activation de la population voisine. Cette inhibition pourrait être médiée par : i) une libération locale de DA, entraînant l'activation d'autorécepteurs D2 inhibiteurs qui pourraient être préférentiellement exprimés sur les neurones de la voie VTADA-BLA, ou ii) résultant d'une libération de DA dans une région distale présentant des neurones de projection inhibiteurs, qui une fois activés, pourraient inhiber en retour une partie de la VTA. Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de réexprimer la sous-unité $\beta 2$ chez des souris $\beta 2^{KO}$, uniquement dans les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc ($\beta 2^{NAcVec}$). La restauration spécifique de l'activation à la nicotine des neurones de la voie VTA-NAc est suffisante pour induire l'inhibition d'une population de neurones dans la VTA. Nous avons également réexprimé la sous-unité $\beta 2$ cette fois uniquement dans la voie VTA-Amg ($\beta 2^{AmgVec}$) et n'avons observé qu'une seule population de neurones, répondant par une activation à la nicotine. L'absence d'une population inhibée chez les souris $\beta 2^{AmgVec}$ suggère que l'inhibition des neurones de la voie VTADA-Amg dans les souris sauvages, nécessite l'activation des neurones de la voie VTADA-NAc. Une inhibition dépendante de la voie VTADA-NAc peut être induite par un effet local ou bien par l'activation d'un relai distal.

i. L'inhibition à la nicotine médiée par une libération locale de dopamine

Des résultats antérieurs à mes travaux de thèse ont montré *in vivo* que les neurones inhibés par une injection intraveineuse de nicotine, répondent aux agonistes (quinpirole) et antagonistes (éticlopride) des récepteurs D2 (Eddine et al., 2015), indiquant que ces neurones expriment des autorécepteurs D2. De plus, un blocage de ces récepteurs D2 abolit la réponse inhibitrice de la nicotine, suggérant que l'inhibition des neurones de la voie VTADA-Amg pourrait être médiée par une libération locale de DA. Toutefois, ces résultats sont à nuancer. En effet, il a été montré que l'application d'éticlopride augmente significativement l'activité spontanée des neurones dopaminergiques de la VTA (Barik et al., 2013). Le blocage en systémique de ces récepteurs peut avoir affecté d'autres paramètres peut être non spécifiques à l'inhibition (Eddine et al., 2015) tels que la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques (Barik et al., 2013) ou encore d'autres cibles impliquées exprimant ce récepteur et perturbant le fonctionnement « physiologique ». Ces phénomènes pourraient donc prendre le dessus sur une inhibition distale potentielle et masquer son effet sur l'activité des neurones. Pour tester plus directement le rôle des autorécepteurs D2, nous avons enregistré *in vivo* la réponse à la nicotine de neurones

dopaminergiques chez des souris DAT-D2^{KO}, c'est-à-dire n'exprimant plus le récepteur D2 au sein des neurones dopaminergiques spécifiquement. Nous avons alors montré que la délétion de ce récepteur n'altère pas l'inhibition induite par la nicotine, toujours présente chez certains neurones. Ces résultats indiquent que les récepteurs D2 ne sont pas, à eux seuls, responsables de l'inhibition à la nicotine observée *in vivo*. On ne peut néanmoins pas exclure que des processus de compensation, liés à l'absence de récepteurs D2 sur les neurones dopaminergiques, puissent émerger chez les souris DAT-D2^{KO} et permettre une inhibition via la dopamine locale par d'autres mécanismes.

ii. L'inhibition à la nicotine médiée par une inhibition GABAergique distale

Ces différents travaux nous ont finalement mené à la troisième hypothèse, celle d'un mécanisme de réseau basé sur une boucle de rétrocontrôle inhibiteur (**Figure 6.1**). La population activée par la nicotine, projetant vers le NAc, libère de la DA dans cette région cible qui peut activer en retour des neurones GABAergiques MSN de projection. Il a été montré que les neurones MSN qui projettent sur la VTA expriment le récepteur D1 (Bocklisch et al., 2013; Edwards et al., 2017; H. Yang et al., 2018). Ces derniers seraient donc activables par une libération phasique de DA provoquée par l'action de la nicotine sur les neurones de la voie VTADA-NAc et pourraient, en retour, exercer un contrôle inhibiteur sur la VTA. Également, on ne peut exclure une potentielle action de la nicotine directement sur les D1-MSN bien qu'il soit plutôt montré une expression des récepteurs cholinergiques muscariniques sur ces derniers (Kreitzer, 2009).

Il faut rappeler qu'il existe une importante interconnexion entre la VTA et le NAc. En effet, nous l'avons vu en introduction, les neurones dopaminergiques projetant vers les sous-noyaux du NAc sont contactés en retour par des projections GABAergiques en provenance de ces mêmes sous-noyaux. Toutefois, nous ignorons si les neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg étaient également contactés par ces projections GABAergiques du NAc. Dans un premier temps j'ai donc démontré, par des expériences d'optogénétique sur tranches, que l'activation distincte des terminaisons GABAergiques en provenance des trois sous-parties du NAc (NAcShellMed, NAcCore, NAcShellLat) induisait des courants inhibiteurs dans les neurones de la voie VTADA-BLA. Les neurones de projection GABAergiques des trois noyaux du NAc contactent donc les neurones dopaminergiques projetant vers la BLA. Dans le but de tester la fonctionnalité de cette boucle, nous avons effectué des enregistrements extracellulaires multi-unitaires *in vivo* et activé par optogénétique uniquement les neurones de la voie VTADA-NAc afin de mimer les effets de la nicotine. De manière attendue, nous avons constaté une population de neurones

dopaminergiques activée à la suite de la stimulation lumineuse, probablement ceux exprimant l'opsine activatrice et projetant vers le NAc. Mais, surtout, nous avons observé une population de neurones dopaminergiques inhibée à la suite de l'activation lumineuse des neurones de la voie VTADA-NAc. Ces résultats démontrent que l'activation optogénétique spécifique de la voie VTADA-NAc est suffisante pour induire l'inhibition d'une autre population de la VTA, et confirment ainsi l'existence d'une boucle inhibitrice fonctionnelle entre la VTA et le NAc.

Malheureusement ici, les neurones n'ayant pas été identifiés par leurs projections, il nous a été impossible d'associer catégoriquement les deux types de réponses aux neurones des voies VTADA-NAc ou VTADA-Amg. En effet, ces deux populations recevant des connexions directes des MSN du NAc, on ne peut exclure que des neurones de la voie VTADA-NAc, n'ayant pas été infectés par le virus, s'inhibent alors de la même manière que les neurones VTADA-Amg lors des stimulations lumineuses. Néanmoins, les neurones inhibés par l'activation optogénétique de la voie VTA-NAc étaient également majoritairement inhibés par la nicotine.

Afin de s'assurer que l'inhibition induite par la nicotine était bien causée par l'activation de cette boucle inhibitrice, nous avons inhibé par optogénétique les projections NAc-VTA pendant une injection de nicotine. Nous avons alors observé qu'un neurone dopaminergique de la VTA inhibé par une première injection de nicotine, ne l'était plus lorsque l'injection de drogue était couplée à une inhibition des terminaisons GABAergiques du NAc ciblant la VTA. Ainsi, nos démonstrations suggèrent que l'inhibition de la population projetant vers l'Amg, induite par la nicotine, est une conséquence indissociable de l'activation de celle projetant vers le NAc.

Nous disposons donc d'un ensemble d'expériences suggérant fortement que l'inhibition à la nicotine observée *in vivo* est la résultante d'un mécanisme de réseau (**Figure 6.1**). Les neurones dopaminergiques projetant vers le NAc reçoivent, tout comme ceux projetant vers l'Amg, des retours inhibiteurs GABAergiques des MSN. Ainsi, l'inhibition reposerait sur une différence dans la balance excitation/inhibition induite par la nicotine sur ces deux voies. La nicotine ayant davantage une action directe excitatrice sur les neurones de la voie VTADA-NAc, cela l'emporterait sur une rétro-inhibition en provenance du NAc. Celle-ci pourrait cependant participer à la régulation de cette activation en la maintenant dans des gammes « contrôlées ». Enfin, une inhibition de la voie VTA-Amg étant consécutive à une activation de la voie VTA-NAc, ce mécanisme de rétro-inhibition pourrait s'appliquer à

d'autres drogues ou types de stimuli et avoir des fonctions dépassant le cadre du renforcement à la nicotine.

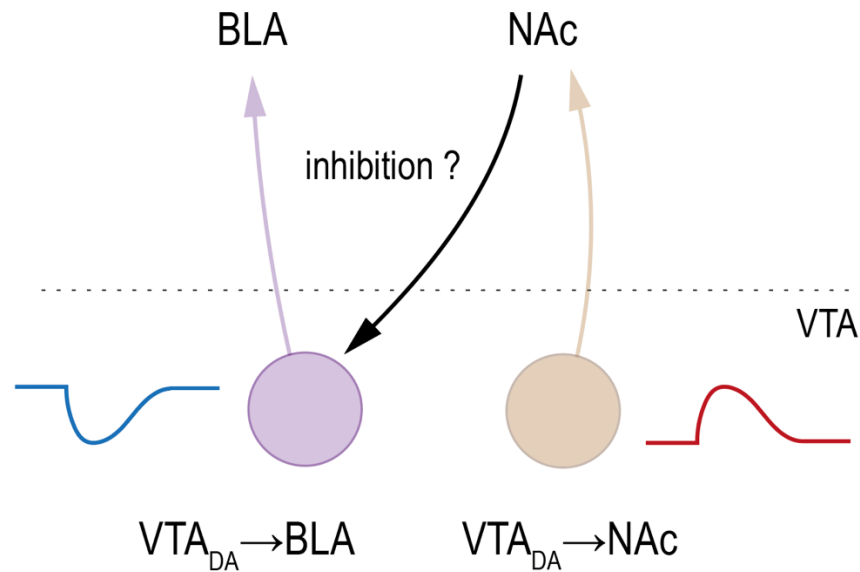


Figure 6.1. Hypothèse d'un mécanisme de réseau | Schéma synthétique illustrant l'hypothèse d'une activation dopaminergique dans la VTA en réponse à la nicotine, qui induirait l'inhibition d'une population voisine. L'activation de la voie $VTA_{DA} \rightarrow NAc$ induirait l'activation du NAc et donc un rétrocontrôle inhibiteur de ce dernier sur les neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg, inhibés *in vivo* à la nicotine.

II. Mécanisme de l'inhibition : points communs avec d'autres drogues d'abus

A la lumière de notre hypothèse mécanistique de l'inhibition dopaminergique à la nicotine, une nouvelle question peut naturellement être posée. Peut-on généraliser ce mécanisme d'inhibition, reposant sur un rétrocontrôle inhibiteur du NAc, à d'autres drogues en dehors de la nicotine ?

Nous avons démontré que l'alcool induit également une inhibition de la voie $VTA_{DA} \rightarrow Amg$ et une activation de la voie $VTA_{DA} \rightarrow NAc$ (Chapitre 5). Ces résultats renforceraient l'hypothèse de réseau de l'inhibition dans la mesure où, a priori, alcool et nicotine n'utilisent pas les mêmes voies moléculaires. Contrairement à la nicotine qui cible spécifiquement les nAChR, l'alcool n'a pas de cible moléculaire précise identifiée. Il a cependant parfois été suggéré que l'éthanol pourrait cibler les récepteurs nicotiques (Narahashi et al., 1999). Nous avons donc tout d'abord voulu évaluer l'impact d'une délétion de la sous-unité $\beta 2$ sur les réponses induites par l'alcool dans la VTA. Pour ce faire, nous avons réalisé des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* et avons montré une hétérogénéité des réponses inchangée chez les

souris $\beta 2^{KO}$ en comparaison aux souris contrôle, à la suite d'une injection intraveineuse d'éthanol (**Figure 6.2**). Comme attendu, la sous-unité $\beta 2$ n'est pas une cible moléculaire de l'alcool et ne peut donc pas expliquer la similarité de l'activation et de l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA induites par la nicotine et l'alcool.

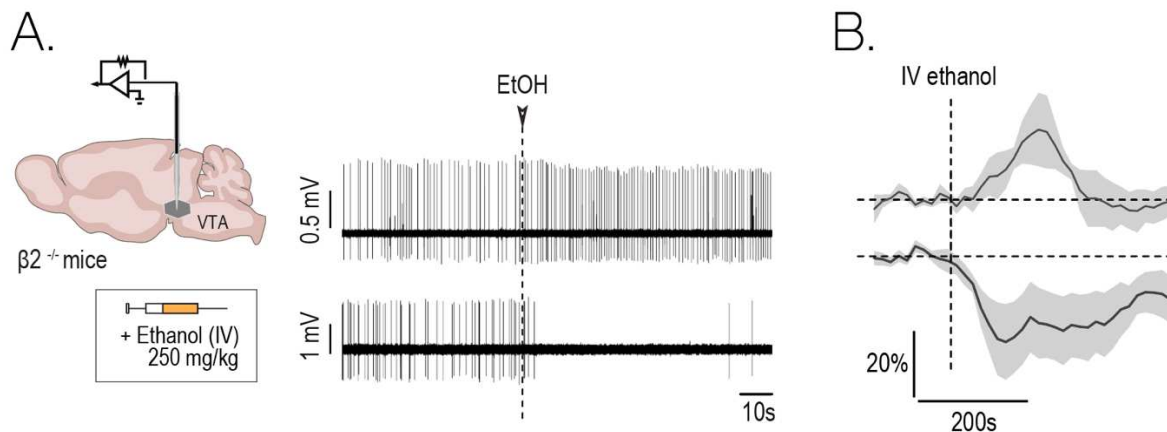


Figure 6.2. Implication de la sous-unité $\beta 2$ dans les réponses dopaminergiques à l'alcool | **A.** Schéma représentatif d'enregistrements juxtacellulaires *in vivo* sur souris anesthésiées avec injection intraveineuse d'éthanol 250 mg/kg (*gauche*). Traces brutes d'un neurone activé (*droite, haut*) et d'un neurone inhibé (*droite, bas*) par l'injection d'éthanol. **B.** Réponses moyennes en pourcentage de variation de la fréquence de décharge après injection d'éthanol pour la population activée (*haut*) ou inhibée (*droite*).

Le point de départ de notre mécanisme d'inhibition dopaminergique, basé sur la boucle de rétrocontrôle inhibiteur, suppose une excitation différentielle des deux voies au profit de celle projetant vers le NAc. Là aussi, plusieurs arguments dans la littérature et dans nos données expérimentales vont dans ce sens. Il a été montré *in vivo* chez le rat, une activation plus forte en réponse à l'éthanol sur des neurones dopaminergiques situés en partie latérale de la VTA, en comparaison à ceux présents en médial (Doyon et al., 2021). Cette population plus activée correspond anatomiquement à la localisation des neurones projetant vers le NAc, cohérent avec une activation de la voie sous éthanol qui primerait sur une potentielle source d'inhibition. En effet, l'alcool induit une augmentation de la libération de DA au niveau du NAc, tout comme la nicotine (Di Chiara & Imperato, 1988). De plus, dans la VTA, nous savons que l'alcool réduit la transmission synaptique GABAergique sur les neurones dopaminergiques (Xiao & Ye, 2008). Il serait donc intéressant de regarder sur tranches l'impact d'une application d'éthanol en enregistrant les courants post-synaptiques inhibiteurs (sIPSC) reçus par les neurones dopaminergiques des deux populations. Nous pourrions alors observer une désinhibition préférentiellement dans les neurones de la voie VTADA-

NAc. Pour tenter de répondre à cette question, j'ai effectué des expériences préliminaires. L'application d'éthanol pendant 10 secondes n'induit pas de changement au niveau des entrées inhibitrices reçues sur les neurones des deux populations (VTA_{DA}-NAcLatShell, VTA_{DA}-BLA). Il serait maintenant intéressant de tester des applications plus longues, l'éthanol ayant peut-être une action moins aiguë que la nicotine. Par ailleurs, il existe deux types de transmission synaptique GABAergique : l'une phasique correspondant à une transmission synaptique, l'autre tonique correspondant à une transmission extrasynaptique (Farrant & Nusser, 2005; Valtcheva et al., 2017). Nous pourrions regarder plus précisément les modes de transmission GABAergique ciblant ces deux populations, afin d'identifier si une différence de circuiterie GABAergique pourrait être à la base du mécanisme montrant l'activation majoritaire des neurones de la voie VTA_{DA}-NAc en réponse à l'éthanol. Enfin, nous avons débuté des expériences pour montrer, comme dans le cas de la nicotine, qu'une inhibition en réponse à une injection systémique d'éthanol peut être bloquée lorsqu'on inhibe les terminaisons GABAergiques du NAc via une opsine inhibitrice. Ces expériences permettraient de définitivement montrer que le mécanisme de réseau que nous proposons, n'est pas « substrat moléculaire spécifique » et pourrait tout à fait s'appliquer à une drogue comme l'alcool, capable de produire une activation préférentielle de la voie VTA_{DA}-NAc en comparaison à la voie VTA_{DA}-Amg. La question de la généralisation à toutes les drogues devra être testée par des études avec des substances qui ont des modes d'actions très différents, telles que la cocaïne.

III. Implication fonctionnelle de cette boucle de rétroaction inhibitrice dans l'addiction

La première publication suggère que les deux sous-réseaux dopaminergiques, VTA_{DA}-NAcShellLat et VTA_{DA}-BLA, portent des messages fonctionnels différents. L'un semble être impliqué dans des comportements de préférence et de renforcement tandis que l'autre joue un rôle dans les comportements liés à l'anxiété. Il faut noter ici que, bien que les expériences *in vivo* en juxtacellulaire ciblaient les trois sous-noyaux du NAc (NAcShellMed, NAcCore, NAcShellLat) ou les deux de l'Amg (BLA, CeA) indifféremment, les résultats de comportement ont montré que c'était précisément l'activation de la voie VTA_{DA}-NAcShellLat qui portait le message renforçant et l'inhibition de la voie VTA_{DA}-BLA qui portait le message anxiogène. Ces expériences ont été réalisées par optogénétique et miment l'effet aigu de la nicotine sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Bien que cette approche optogénétique ne permette pas de mimer entièrement l'action complexe et les effets hors-VTA de la nicotine, cela a permis d'étudier séparément l'implication comportementale de

chacune de ces deux voies. La seconde publication démontre que l'activation et l'inhibition à la nicotine sont intrinsèquement liées l'une à l'autre et que l'activation sans l'inhibition (et inversement) ne sont pas des situations « normales ». En effet, nous avons montré que l'activation de la voie $VTA_{DA}-NAc$ suffit à induire une inhibition dopaminergique dans la VTA.

Dans le but de tester davantage la fonctionnalité de cette boucle au niveau comportemental, il serait donc intéressant de faire des expériences supplémentaires. Si notre raisonnement est correct, la seule activation des projections dopaminergiques vers le NAc devrait induire de l'anxiété. Pour tester cela, il serait possible d'injecter une opsine activatrice rétrograde dans les trois sous-noyaux du NAc afin d'obtenir une expression au niveau somatique des neurones dopaminergiques de la VTA y projetant. Nous pourrions alors évaluer si l'activation optogénétique de cette population dopaminergique dans un paradigme de O-Maze produit un effet anxiogène. Si cette expérience s'avère concluante, il serait également pertinent de bloquer le retour inhibiteur du NAc. Puisque nous savons que l'injection intrapéritonéale de nicotine a un effet anxiogène, nous pourrions tenter de bloquer cet effet en injectant une opsine inhibitrice au niveau du NAc et en implantant une fibre optique au niveau de la VTA, pour inhiber spécifiquement les terminaisons inhibitrices ciblant la voie $VTA_{DA}-BLA$. Nous prévoyons de réaliser ces expériences prochainement, ce qui nous permettrait de conclure fermement sur le mécanisme de rétroaction inhibitrice en provenance du NAc.

Au niveau comportemental, chez la souris, une injection de nicotine induit à la fois un effet renforçant et un effet aversif, non dissociables. Nous pouvons alors nous interroger sur le rôle d'un tel mécanisme.

a. Conséquence d'une baisse de dopamine au niveau de l'amygdale

L'Amg joue un rôle prépondérant dans les processus en lien avec la mémoire émotionnelle. Il est donc possible que l'anxiété provoquée par une première prise de nicotine permette d'associer une saillance ou une valeur particulière à cette expérience. Ainsi, une signalisation dopaminergique modifiée dans cette région au moment d'une prise de drogue pourrait changer la valeur émotionnelle de cet événement. Nous n'avons pas connaissance des mécanismes précis qui opèrent au niveau de l'Amg, et plus précisément au niveau de la BLA, pour induire l'effet anxiogène de la nicotine, observé à la suite d'une baisse d'activité des neurones dopaminergiques y projetant. Toutefois, il a été montré par optogénétique chez la souris, qu'une activation de la voie $BLA-CeA$ avait un effet anxiolytique alors qu'une inhibition de cette même voie avait un effet anxiogène (Tye et al., 2011). De plus, la BLA

présente une structure *cortical-like* exprimant majoritairement le récepteur D1 alors que la CeA est plutôt *striatal-like* présentant les deux types de récepteurs dopaminergiques (D1 et D2 ; Scibilia et al., 1992). Par ailleurs, la DA augmente l'excitabilité des neurones projetant de la BLA via la signalisation des récepteurs D1 (Kröner et al., 2005; Lutas et al., 2019). En essayant de rassembler ces informations, on peut donc supposer qu'une baisse de libération de DA au niveau de la BLA, à la suite d'une injection de nicotine, induirait une baisse d'activité des neurones de la voie BLA-CeA, conduisant à une augmentation du niveau d'anxiété. Nous avons également vu en introduction qu'une forte proportion des neurones dopaminergiques de la VTA projetant vers l'Amg co-libère du glutamate (Lutas et al., 2019; Taylor et al., 2014). Il n'est donc pas exclu que ce neurotransmetteur puisse jouer un rôle au niveau des sous-noyaux de l'Amg, en synergie avec la DA, pour orienter la balance vers des effets anxiogènes ou anxiolytiques. Cela reste tout à fait hypothétique, mais il pourrait être intéressant d'y apporter un intérêt tout particulier à l'avenir.

b. Rôle de l'effet anxiogène médié par la nicotine

L'activation de la voie $VTADA-NACShellLat$ et l'inhibition de la voie $VTADA-BLA$ génèrent, respectivement, du renforcement ou de l'anxiété. Ces deux effets ne sont pas « isolables » en réponse à la drogue : l'inhibition ne peut être observée sans l'activation et vice versa. Par contre, ils sont dissociables comportementalement, dans le sens où une même dose de nicotine produit un effet anxiogène dans un paradigme de O-Maze (Chapitre 4) et un effet récompensant dans un test de préférence de place conditionnée (en comparaison avec une injection de saline ; Durand-de-Cuttoli et al., 2018). Ces résultats montrent donc qu'un dosage identique de nicotine peut provoquer des effets distincts sur le comportement en fonction du contexte. Aussi, quel est le rôle de cette balance dans une consommation à long-terme de drogue ? Et, peut-on imaginer qu'un changement d'équilibre entre ces deux voies puisse mener à l'addiction ?

Les consommateurs de drogues, nous l'avons vu, ne sont pas tous égaux face à la dépendance. Pour certains consommateurs, la première expérience va être désagréable (valeur aversive) alors que pour d'autres elle peut apparaître plaisante (valeur renforçante). Le ressenti lors de la première exposition va donc influencer une consommation future potentielle. Nos résultats suggèrent que la voie $VTADA-BLA$ porte un fort message anxiogène, qui pourrait s'avérer limitant à la prise de drogue. La balance entre ces deux effets pourrait donc jouer dans l'installation ou non d'une dépendance. La prise de drogues comme la nicotine induit des changements profonds au niveau du NAc. Aussi, il n'est pas exclu qu'une exposition chronique à la nicotine puisse impacter le retour inhibiteur du NAc

sur la VTA. Une baisse de ce rétrocontrôle sur les neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg pourrait donc « désinhiber » cette voie, conduisant à une baisse de l'effet anxiogène lié à la prise de drogue. Il serait intéressant de tester cette hypothèse *in vivo* et de regarder si la réponse inhibitrice de la voie VTA_{DA}-Amg est impactée sous nicotine chronique. Les souris pourraient être implantées avec des mini-pompes osmotiques ou exposées à la nicotine via l'eau de leur boisson; et l'on pourrait effectuer des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* afin de déterminer si les neurones projetant vers l'Amg sont toujours inhibés par une injection intraveineuse de nicotine. Une baisse de la force anxiogène médiée par cette voie pourrait ainsi être un élément additionnel expliquant la mise en place d'une addiction à la nicotine. Bien sûr, on compte d'autres effets indésirables à long-terme comme l'expression des symptômes de manque qui semblent être médiés, entre autres, par la voie MHb-IPN et conduiraient à consommer toujours davantage la drogue pour en masquer les conséquences négatives. Il serait néanmoins intéressant de déterminer si l'anxiété accrue associée au sevrage à la nicotine n'implique pas également une altération de l'activité de la voie VTA_{DA}-Amg.

c. L'alcool induit-il un effet anxiogène ?

Une consommation d'alcool ou de nicotine ne produit pas du tout les mêmes effets sur les individus. Nous pouvons donc nous demander si l'alcool, qui induit les mêmes réponses que la nicotine au niveau électrophysiologique sur les neurones dopaminergiques de la VTA, médie également un effet anxiogène. Pour cela, j'ai reproduit les mêmes expériences qu'avec la nicotine, en utilisant un paradigme de O-Maze, afin d'observer les niveaux d'anxiété induits par l'éthanol. Contrairement à la nicotine, on observe un important effet anxiolytique après injection intrapéritonéale d'éthanol. Les souris étaient en effet beaucoup plus actives directement après l'injection de la drogue. Il est connu que les effets de l'alcool et la nicotine sont distincts sur le comportement. Aussi, on peut supposer que cet effet anxiolytique observé durant les 6 premières minutes du test pourrait être dû à un effet locomoteur périphérique. Afin d'évaluer le rôle spécifique des neurones dopaminergiques dans ce comportement, j'ai ensuite reproduit la même expérience mais avec une infusion intracrâniale d'éthanol directement au niveau de la VTA. Aucune différence significative n'a été alors observée. Cela pourrait aller dans le sens d'un effet périphérique lorsque l'éthanol est injecté de façon non spécifique, ou bien dépendre de la dose utilisée. Nous avons choisi une dose considérée renforçante dans un paradigme de préférence de place chez le rat (Campos-Jurado et al., 2020), mais il n'est pas exclu que cette dernière n'ait pas les mêmes effets chez la souris. Enfin, nous pouvons ajouter que, bien que nous ayons démontré une forte corrélation des réponses induites par les deux drogues chez les

neurones des voies VT_{DA} -NAc et VT_{DA} -Amg, l'alcool n'induit pas exactement les mêmes réponses que la nicotine chez tous les neurones dopaminergiques. En effet, dans nos enregistrements juxtacellulaires *in vivo*, les injections paires des deux drogues ont révélé une population non-identifiée qui est inhibée par la nicotine mais activée par l'éthanol. On peut alors se demander si cette population ne pourrait pas expliquer en partie les résultats comportementaux obtenus avec l'éthanol dans le O-Maze. Une proportion plus importante de neurones pourrait être activée en réponse à l'infusion intracrâniale d'alcool (par rapport à l'infusion de nicotine) et ainsi masquer un effet anxiogène sous-jacent d'une inhibition de la voie VT_{DA} -Amg.

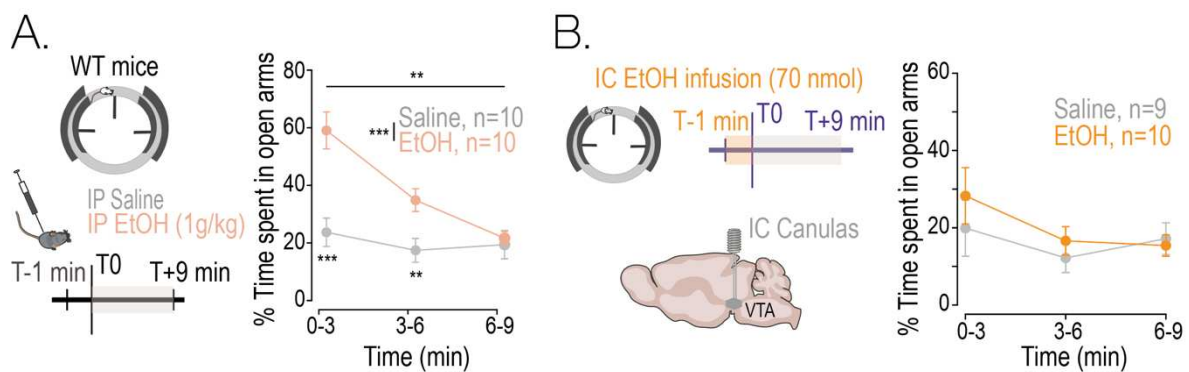


Figure 6.3. Effet comportemental de l'alcool dans un paradigme de O-Maze | A. Une injection intrapéritonéale d'alcool (1g/kg) une minute avant le test, induit un effet anxiolytique au début de la tâche (two-way ANOVA : interaction traitement x temps, $F_{2,36}=13.4$, *** $p<0.001$; effet du traitement, $F_{1,18}=11.7$, ** $p=0.003$; effet du temps, $F_{2,36}=22.7$, *** $p<0.001$). **B.** Une injection intra-VTA d'alcool (70 nmol) n'induit pas d'effet sur le comportement dans la tâche.

d. L'inhibition de la voie VTA-BLA influe-t-elle sur le renforcement ?

L'exposition aux drogues impacte également les processus motivationnels et de prise de décision, indépendamment de leur recherche et de leur consommation. La première publication (Chapitre 4) a montré que l'inhibition de la voie VT_{DA} -BLA induisait un évitement alors que l'activation de la voie VT_{DA} -NAc induisait au contraire une préférence de place. Ces données suggèrent que des messages dopaminergiques aversifs et appétitifs coexistent lors de la prise de nicotine, ce qui pourrait avoir des conséquences sur les processus de renforcement. Afin d'évaluer l'implication de l'inhibition de la voie VT_{DA} -BLA dans ces processus, j'ai mis au point une tâche de comportement opérant d'auto-administration optogénétique, où les souris avaient le choix entre deux leviers (Harada et al., 2021). Les animaux ont été conditionnés grâce à l'activation optogénétique de la voie VT_{DA} -NAcShellLat pendant une semaine. Nous avons ainsi montré que seule l'activation

d'une sous-population projetant vers le NAc suffit à induire un renforcement dans un paradigme d'auto-administration.

Notre but était de déterminer si l'inhibition de la voie $VT_{DA}-BLA$ pouvait changer la valeur attribuée à un levier. Nos trois hypothèses étaient alors :

- $VT_{DA}-NAc^+ = VT_{DA}-NAc^+ + VT_{DA}-BLA^-$
- $VT_{DA}-NAc^+ < VT_{DA}-NAc^+ + VT_{DA}-BLA^-$
- $VT_{DA}-NAc^+ > VT_{DA}-NAc^+ + VT_{DA}-BLA^-$

De façon surprenante, nous avons observé que l'inhibition de la voie $VT_{DA}-BLA$ ne module pas l'apprentissage par renforcement. Puisque l'activation de la voie $VT_{DA}-NAc_{ShellLat}$ peut induire en conséquence l'inhibition de voie $VT_{DA}-BLA$, il est possible que notre inhibition optogénétique des terminaisons dopaminergiques en condition « $VT_{DA}-NAc^+ + VT_{DA}-BLA^-$ » n'ait pas réussi à amplifier l'effet du rétrocontrôle inhibiteur déjà présent en condition « $VT_{DA}-NAc^+$ ». Cependant, « contrer » ce rétrocontrôle inhibiteur en activant cette fois directement les terminaisons de la voie $VT_{DA}-BLA$, n'a également pas engendré de différence dans les choix des souris. L'inhibition seule de la voie $VT_{DA}-BLA$ induit une forte baisse des appuis leviers, montrant qu'elle ne reflète pas une valeur positive dans un paradigme d'apprentissage par renforcement. Les mêmes résultats sont observés avec l'activation de la voie $VT_{DA}-BLA$. Cette voie ne semble donc pas jouer un rôle dans l'apprentissage par renforcement, contrairement à la voie $VT_{DA}-NAc$. Plusieurs éléments peuvent être discutés. Peut-être que ces résultats nous indiquent que l'inhibition de la voie $VT_{DA}-BLA$ est importante dès la première stimulation, pour mimer plus fidèlement les effets des drogues et notamment ceux de la nicotine. Peut-être qu'une inhibition de la voie dès la première semaine de conditionnement aurait impacté l'apprentissage et les choix futurs des animaux. On peut également se demander si une inhibition optogénétique de 5s, comme celle utilisée, est suffisante pour mimer les effets d'une drogue. On sait en effet que la nicotine induit une inhibition durant plusieurs minutes. Une activation phasique de 5s, en terminal, des neurones projetant vers le NAc apparaît suffisante pour induire un renforcement mais ce n'est peut-être pas le cas de l'inhibition optogénétique. Nous pourrions ainsi envisager de mimer cette inhibition plutôt par chémogénétique afin d'obtenir un effet peut-être plus en adéquation avec une prise de drogue répétée (reproduit par le nombre d'appuis sur le levier).

Par ailleurs, on peut émettre l'hypothèse que cette voie jouerait plutôt un rôle dans la motivation des souris à obtenir une récompense. Pour tester cela, nous pourrions utiliser les mêmes protocoles d'auto-administration optogénétique (ou chémogénétique), avec

cette fois un seul levier, et une augmentation progressive de l'effort à fournir pour obtenir la stimulation (FR1, FR3, FR5, PR : *breaking point*).

IV. Implication fonctionnelle de cette boucle de rétroaction inhibitrice dans le cas de récompenses naturelles

Qu'en est-il de cette boucle de rétrocontrôle en provenance du NAc dans le cadre des récompenses naturelles ? Dans la mesure où nos interprétations penchent pour un mécanisme principalement de réseau, l'activation de la voie $VT_{DA}-NAc$ devrait de manière générale aboutir à une inhibition de la voie $VT_{DA}-Amg$. Cette question reste très ouverte et je n'ai aucune expérience réalisée durant ma thèse à vous présenter dans cette partie de discussion. Il a été montré, après conditionnement, que les neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg sont activés à la fois par des indices prédictifs de récompense ou de punition alors que ceux projetant vers le NAc sont activés par une récompense et inhibés par une punition (Lutas et al., 2019). On peut également noter qu'avant apprentissage, les neurones de la voie $VT_{DA}-BLA$ répondent par une activation après consommation de nourriture (Lutas et al., 2019). De plus, les neurones dopaminergiques projetant vers l'Amg, plus précisément vers la BA, sont activés par des chocs à la patte (*footshocks*) et contribuent au conditionnement à la peur prédit par des indices auditifs, qui est impacté lorsque la voie $VT_{DA}-BLA$ est inhibée. Une activation des neurones dopaminergiques de la VTA projetant vers l'Amg semble donc nécessaire dans la formation de la mémoire à la peur (Tang et al., 2020). Ces résultats et une première conviction, nous font penser que cette inhibition de la voie $VT_{DA}-Amg$ pourrait être spécifique des drogues d'abus. Cela supposerait : i) que les récompenses naturelles compensent l'inhibition de la voie $VTA-Amg$ ou ii) que les drogues font pencher la balance par un mécanisme non identifié. Les récompenses naturelles pourraient masquer cette inhibition en activant peut être d'autres entrées excitatrices ou en libérant d'autres neuromodulateurs visant la VTA. On peut aussi supposer que les projections dopaminergiques vers les trois sous-noyaux du NAc sont toutes activées massivement par les drogues alors que dans le cas de récompenses naturelles il pourrait y avoir une spécificité plus restreinte (Reynolds & Berridge, 2002). Une activation plus massive des trois sous-noyaux du NAc indistinctement par les drogues, pourrait induire un retour inhibiteur plus important sur la VTA et potentiellement être à l'origine de l'inhibition de la population dopaminergique projetant vers l'Amg.

Dans ce cadre, l'inhibition de la voie $VT_{DA}-Amg$ médie un effet anxiogène, qui pourrait être interprété comme un frein à la dépendance. Sur ce principe, comment peut-on

expliquer que cette inhibition dopaminergique est spécifique des drogues d'abus alors que ces dernières ont des propriétés bien plus addictives que les récompenses naturelles ? Ce point met en évidence que, même si notre compréhension des mécanismes liés à la consommation de drogues s'étoffe, de nombreuses questions demeurent. Ces interrogations montrent également l'importance des recherches sur l'addiction aux drogues, pour tenter d'affiner notre compréhension de la mise en place d'une dépendance et surtout pourquoi certains consommateurs apparaissent plus sensibles que d'autres à une exposition à ces substances.

V. Conclusion générale

En conclusion, les travaux que je vous ai présentés mettent en lumière la diversité des réponses aux drogues des neurones dopaminergiques de la VTA. Ces derniers montrent que les réponses à la nicotine et à l'alcool, qu'il s'agisse d'une activation ou d'une inhibition, dépendent de circuits différents. Les neurones activés par la nicotine et l'alcool projettent au niveau du NAc alors que les neurones inhibés par ces deux drogues projettent vers l'Amg. Nous avons également montré que ces réponses sont, non seulement concomitantes, mais apparaissent intrinsèquement liées l'une à l'autre : l'activation semblerait induire l'inhibition. Le mécanisme de boucle de rétroaction inhibitrice que nous avons identifié, nécessite des expériences supplémentaires pour évaluer l'impact sur le comportement de cette dernière. Nous avons tout de même montré que, quand elles sont isolées séparément, ces deux voies de projection peuvent porter des messages fonctionnels différents au niveau comportemental. L'activation de la voie VTA-NAc est impliquée dans le renforcement alors que l'inhibition de la voie VTA-Amg est associée à un effet anxiogène. Toutefois, dans un processus d'apprentissage par renforcement, à la base de la mise en place d'une addiction, nous n'avons pas pu évaluer l'impact de cette inhibition. Enfin, dans les deux publications que je vous ai exposées, nous avons séparé la fonction de sous-réseaux dopaminergiques. Il est donc important de noter les limites de ce découpage car, même si dans le cas de la nicotine cela semble être initié au niveau de la VTA, on ne peut se limiter à l'étude de deux sous-circuits dopaminergiques pour expliquer la mise en place d'une addiction.

Bibliographie

- Adell, A., & Artigas, F. (2004). The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(4), 415–431. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.001>
- Agnati, L. F., Zoli, M., Strömberg, I., & Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, 69(3), 711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)
- Ahmed, S. H. (2018). Individual decision-making in the causal pathway to addiction: contributions and limitations of rodent models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 164(July 2017), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.07.005>
- Aitken, T. J., Greenfield, V. Y., & Wassum, K. M. (2016). Nucleus accumbens core dopamine signaling tracks the need-based motivational value of food-paired cues. *Journal of Neurochemistry*, 136(5), 1026–1036. <https://doi.org/10.1111/jnc.13494>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Al-Hasani, R., Gowrishankar, R., Schmitz, G. P., Pedersen, C. E., Marcus, D. J., Shirley, S. E., Hobbs, T. E., Elerding, A. J., Renaud, S. J., Jing, M., Li, Y., Alvarez, V. A., Lemos, J. C., & Bruchas, M. R. (2021). Ventral tegmental area GABAergic inhibition of cholinergic interneurons in the ventral nucleus accumbens shell promotes reward reinforcement. *Nature Neuroscience*, 24(10), 1414–1428. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00898-2>
- Allichon, M. C., Ortiz, V., Pousinha, P., Andrianarivelo, A., Petitbon, A., Heck, N., Trifilieff, P., Barik, J., & Vanhoutte, P. (2021). Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 13(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.799274>
- Allison, D. W., Ohran, A. J., Stobbs, S. H., Mameli, M., Valenzuela, C. F., Sudweeks, S. N., Ray, A. P., Henriksen, S. J., & Steffensen, S. C. (2006). Connexin-36 gap junctions mediate electrical coupling between ventral tegmental area GABA neurons. *Synapse*, 60(1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/syn.20272>
- Ambroggi, F., Ishikawa, A., Fields, H. L., & Nicola, S. M. (2008). Basolateral Amygdala Neurons Facilitate Reward-Seeking Behavior by Exciting Nucleus Accumbens Neurons. *Neuron*, 59(4), 648–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.004>

- Anderson, S. M., & Brunzell, D. H. (2015). Anxiolytic-like and anxiogenic-like effects of nicotine are regulated via diverse action at $\beta 2$ *nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 172(11), 2864–2877. <https://doi.org/10.1111/bph.13090>
- Anstrom, K. K., Miczek, K. A., & Budygin, E. A. (2009). Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience*, 161(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.023>
- Azam, L., Chen, Y., & Leslie, F. M. (2007). Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*, 144(4), 1347–1360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.011>
- Azam, L., Winzer-Serhan, U. H., Chen, Y., & Leslie, F. M. (2002). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 444(3), 260–274. <https://doi.org/10.1002/cne.10138>
- Balerio, G. N., Aso, E., & Maldonado, R. (2006). Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology*, 184(3–4), 504–513. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0251-9>
- Balfour, D. J. K., Benwell, M. E. M., Birrell, C. E., Kelly, J., & Al-Aloul, M. (1998). Sensitization of the mesoaccumbens dopamine response to nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), 1021–1030. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00537-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00537-6)
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S. P., Lanteri, C., Godeheu, G., Tassin, J., Mombereau, C., Faure, P., & Tronche, F. (2013). Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminoreceptive Neurons. *Science*, 339(Mi), 5–24.
- Bassareo, V., Tanda, G., Petromilli, P., Giua, C., & Di Chiara, G. (1996). Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology*, 127(3), 289–290. <https://doi.org/10.1007/bf02246138>
- Baxter, M. G., & Murray, E. A. (2002). The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), 563–573. <https://doi.org/10.1038/nrn875>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 182–211. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642.182>
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Kremer, E. J., Malenka, R. C., Luo, L., Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping Article Circuit Architecture of VTA

- Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input–Output Mapping. *Cell*, 162(3), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bennett, B. D., Callaway, J. C., & Wilson, C. J. (2000). in Neostriatal Cholinergic Interneurons. *Neuroscience Research*, 20(22), 8493–8503.
- Benwell, M. E. M., Balfour, D. J. K., & Anderson, J. M. (1988). Evidence that Tobacco Smoking Increases the Density of (–)-[3H]Nicotine Binding Sites in Human Brain. *Journal of Neurochemistry*, 50(4), 1243–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb10600.x>
- Berrettini, W., Yuan, X., Tozzi, F., Song, K., Francks, C., Chilcoat, H., Waterworth, D., Muglia, P., & Mooser, V. (2008). A-5/A-3 Nicotinic Receptor Subunit Alleles Increase Risk for Heavy Smoking. *Molecular Psychiatry*, 13(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002154>
- Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology and Behavior*, 81(2), 179–209. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.004>
- Besson, M., Granon, S., Mameli-Engvall, M., Cloëz-Tayarani, I., Maubourguet, N., Cormier, A., Cazala, P., David, V., Changeux, J. P., & Faure, P. (2007). Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8155–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702698104>
- Beutler, L. R., Wanat, M. J., Quintana, A., Sanz, E., Bamford, N. S., Zweifel, L. S., & Palmiter, R. D. (2011). Balanced NMDA receptor activity in dopamine D1 receptor (D1R)- And D2R-expressing medium spiny neurons is required for amphetamine sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4206–4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101424108>
- Beyeler, A., Chang, C. J., Silvestre, M., Lévesque, C., Namburi, P., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2018). Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell Reports*, 22(4), 905–918. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.097>
- Beyeler, A., & Dabrowska, J. (2020). Neuronal diversity of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (1st ed., Vol. 26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815134-1.00003-9>
- Beyeler, A., Namburi, P., Glober, G. F., Simonnet, C., Calhoon, G. G., Conyers, G. F., Luck, R., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2016). Divergent Routing of Positive and Negative Information from the Amygdala during Memory Retrieval. *Neuron*, 90(2), 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.004>
- Blaiss, C. A., & Janak, P. H. (2009). The nucleus accumbens core and shell are critical for the expression, but not the consolidation, of Pavlovian conditioned approach.

- Behavioural Brain Research*, 200(1), 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.024>
- Bocklisch, C., Pascoli, V., Wong, J. C. Y., House, D. R. C., Yvon, C., Roo, M. De, Tan, K. R., & Lüscher, C. (2013). *Cocaine Disinhibits Dopamine Neurons by Potentiation of GABA Transmission in the Ventral Tegmental Area*. 34 1(September), 1521–1526.
- Bouarab, C., Thompson, B., & Polter, A. M. (2019). VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in Neural Circuits*, 13(December), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00078>
- Bourdy, R., & Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences*, 35(11), 681–690.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>
- Bousseyrol, E., Didienne, S., Takillah, S., Prevost-Solié, C., Come, M., Ahmed Yahia, T., Mondoloni, S., Vicq, E., Tricoire, L., Mourot, A., Naudé, J., & Faure, P. (2023). Dopaminergic and prefrontal dynamics co-determine mouse decisions in a spatial gambling task. *Cell Reports*, 42(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112523>
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.018>
- Breton, J. M., Charbit, A. R., Snyder, B. J., Fong, P. T. K., Dias, E. V., Himmels, P., Lock, H., & Margolis, E. B. (2019). Relative contributions and mapping of ventral tegmental area dopamine and GABA neurons by projection target in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 527(5), 916–941. <https://doi.org/10.1002/cne.24572>
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D. I., & Ungless, M. A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4894–4899.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811507106>
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Olmstead, R. E., Farahi, J., Scheibal, D., Jou, J., Allen, V., Tiongson, E., Chefer, S. I., Koren, A. O., & Mukhin, A. G. (2006). Cigarette smoking saturates brain $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Archives of General Psychiatry*, 63(8), 907–915. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.8.907>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Brown, M. T. C., Tan, K. R., O'Connor, E. C., Nikonenko, I., Muller, D., & Lüscher, C. (2012). Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to

- enhance associative learning. *Nature*, 492(7429), 452–456. <https://doi.org/10.1038/nature11657>
- Buchmann, A. F., Blomeyer, D., Jennen-Steinmetz, C., Schmidt, M. H., Esser, G., Banaschewski, T., & Laucht, M. (2013). Early smoking onset may promise initial pleasurable sensations and later addiction. *Addiction Biology*, 18(6), 947–954. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00377.x>
- Cachope, R., Mateo, Y., Mathur, B. N., Irving, J., Wang, H. L., Morales, M., Lovinger, D. M., & Cheer, J. F. (2012). Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: Setting the tone for reward processing. *Cell Reports*, 2(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.011>
- Caggiula, A. R., Donny, E. C., White, A. R., Chaudhri, N., Booth, S., Gharib, M. A., Hoffman, A., Perkins, K. A., & Sved, A. F. (2001). Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70(4), 515–530. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00676-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00676-1)
- Cahill, E., Salery, M., Vanhoutte, P., & Caboche, J. (2014). Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Frontiers in Pharmacology*, 4 JAN(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00172>
- Caillé, S., Guillem, K., Cador, M., Manzoni, O., & Georges, F. (2009). Voluntary nicotine consumption triggers in vivo potentiation of cortical excitatory drives to midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10410–10415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2950-09.2009>
- Campos-Jurado, Y., Martí-Prats, L., Morón, J. A., Polache, A., Granero, L., & Hipólito, L. (2020). Dose-dependent induction of CPP or CPA by intra-pVTA ethanol: Role of mu opioid receptors and effects on NMDA receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 100(January), 109875. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109875>
- Capogna, M. (2014). GABAergic cell type diversity in the basolateral amygdala. *Current Opinion in Neurobiology*, 26, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.01.006>
- Carr, D. B., & Sesack, S. R. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: Target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3864–3873. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03864.2000>
- Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Léna, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novère, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M., & Changeux, J. P. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 23(21), 7820–7829. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-21-07820.2003>

- Changeux, J. P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: Lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(6), 389–401. <https://doi.org/10.1038/nrn2849>
- Changeux, J. P. (2012). Allostery and the monod-wyman-changeux model after 50 years. *Annual Review of Biophysics*, 41(1), 103–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102222>
- Changeux, J. P., & Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*, 21(5), 959–980. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80616-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80616-9)
- Changeux, J. P., & Taly, A. (2008). Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 14(3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.01.001>
- Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., Ferguson, D., Tsai, H. C., Pomeranz, L., Christoffel, D. J., Nectow, A. R., Ekstrand, M., Domingos, A., Mazei-Robison, M. S., Mouzon, E., Lobo, M. K., Neve, R. L., Friedman, J. M., Russo, S. J., ... Han, M. H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, 493(7433), 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature11713>
- Christakou, A., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2004). Prefrontal Cortical–Ventral Striatal Interactions Involved in Affective Modulation of Attentional Performance: Implications for Corticostriatal Circuit Function. *Journal of Neuroscience*, 24(4), 773–780. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0949-03.2004>
- Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S. B. E., Letzkus, J. J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M. B., Müller, C., & Lüthi, A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, 468(7321), 277–282. <https://doi.org/10.1038/nature09559>
- Clark, R. E. (2004). The classical origins of Pavlov's conditioning. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 39(4), 279–294. <https://doi.org/10.1007/BF02734167>
- Cohen, J. D., McClure, S. M., & Yu, A. J. (2007). Should I stay or should I go? How the human brain manages the trade-off between exploitation and exploration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1481), 933–942. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2098>
- Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, 482(7383), 85–88. <https://doi.org/10.1038/nature10754>
- Corradi, J., & Bouzat, C. (2016). Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 288–299. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>

- Corringer, P. J., Sallette, J., & Changeux, J. P. (2006). Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: A novel mechanism of neural plasticity? *Journal of Physiology Paris*, 99(2–3), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2005.12.012>
- Cosgrove, K. P., Batis, J., Bois, F., Maciejewski, P. K., Esterlis, I., Kloczynski, T., Stiklus, S., Krishnan-Sarin, S., O'Malley, S., Perry, E., Tamagnan, G., Seibyl, J. P., & Staley, J. K. (2009). B2-Nicotinic Acetylcholine Receptor Availability During Acute and Prolonged Abstinence From Tobacco Smoking. *Archives of General Psychiatry*, 66(6), 666–676. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.41>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2004). DANCing past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Crespi, L. P. (1942). Quantitative Variation of Incentive and Performance in the White Rat. *The American Journal of Psychology*, 55(4), 467. <https://doi.org/10.2307/1417120>
- Crow, T. J. (1972). A map of the rat mesencephalon for electrical self-stimulation. *Brain Research*, 36(2), 265–273. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90734-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90734-2)
- Cruz, H. G., Ivanova, T., Lunn, M. L., Stoffel, M., Slesinger, P. A., & Lüscher, C. (2004). Bi-directional effects of GABAB receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nature Neuroscience*, 7(2), 153–159. <https://doi.org/10.1038/nn1181>
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398–399. <https://doi.org/10.1007/BF02147990>
- Dani, J. A., Ji, D., & Zhou, F.-M. (2001). Synaptic Plasticity and Nicotine Addiction. *Neuron*, 31, 349–352.
- Dautan, D., Souza, A. S., Huerta-ocampo, I., Valencia, M., Assous, M., Witten, I. B., Deisseroth, K., Tepper, J. M., Bolam, J. P., Gerdjikov, T. V., & Mena-segovia, J. (2016). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Neuron*, 19(8). <https://doi.org/10.1038/nn.4335>
- David Wise, C., & Stein, L. (1969). Facilitation of brain Self-stimulation by central administration of norepinephrine. *Science*, 163(3864), 299–301. <https://doi.org/10.1126/science.163.3864.299>
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 105–135. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.109>
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- De Bundel, D., Zussy, C., Espallergues, J., Gerfen, C. R., Girault, J. A., & Valjent, E. (2016). Dopamine D2 receptors gate generalization of conditioned threat responses through

- mTORC1 signaling in the extended amygdala. *Molecular Psychiatry*, 21(11), 1545–1553. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.210>
- De Jong, J. W. De, Fraser, K. M., & Lammel, S. (2022). *Mesoaccumbal Dopamine Heterogeneity: What Do Dopamine Firing and Release Have to Do with It?* 109–129.
- de Jong, J. W., Afjei, S. A., Pollak Dorocic, I., Peck, J. R., Liu, C., Kim, C. K., Tian, L., Deisseroth, K., & Lammel, S. (2019). A Neural Circuit Mechanism for Encoding Aversive Stimuli in the Mesolimbic Dopamine System. *Neuron*, 101(1), 133–151.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.005>
- De la Mora, M. P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D., & Fuxe, K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*, 90(2), 198–216. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.010>
- Delorme, D. E., Kreshel, P. J., & Reid, L. N. (2003). Lighting up – Young adults' autobiographical accounts of their first smoking experiences. *Youth and Society*, 34(4), 468–496. <https://doi.org/10.1177/0044118X03034004004>
- Descarries, L., Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Bo, G. D., Mendez, J. A., & Trudeau, L. É. (2008). Glutamate in dopamine neurons: Synaptic versus diffuse transmission. *Brain Research Reviews*, 58(2), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.005>
- Descarries, L., & Mechawar, N. (2000). Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Progress in Brain Research*, 125(September 1989), 27–47. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)25005-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)25005-X)
- 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(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H. L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(1), 218–229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>
- Doyon, W. M., Ostroumov, A., Ontiveros, T., Gonzales, R. A., & Dani, J. A. (2021). Ethanol produces multiple electrophysiological effects on ventral tegmental area neurons in freely moving rats. *Addiction Biology*, 26(2). <https://doi.org/10.1111/adb.12899>
- DSM-5 : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, A. P. A. (2015). *DSM-5 : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*.

- <https://psyclinicfes.files.wordpress.com/2020/03/dsm-5-manuel-diagnostique-et-statistique-des-troubles-mentaux.pdf>
- Durand-de-Cuttoli, R. D. De, Mondoloni, S., Marti, F., Lemoine, D., Nguyen, C., Naudé, J., D'izarny-Gargas, T., Pons, S., Maskos, U., Trauner, D., Kramer, R. H., Faure, P., & Mourot, A. (2018). Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. *ELife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.37487>
- Eddine, R., Valverde, S., Tolu, S., Dautan, D., Hay, A., Morel, C., Cui, Y., Lambolez, B., Venance, L., Marti, F., & Faure, P. (2015). A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. *Scientific Reports*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep08184>
- Edwards, N. J., Tejada, H. A., Pignatelli, M., Zhang, S., McDevitt, R. A., Wu, J., Bass, C. E., Bettler, B., Morales, M., & Bonci, A. (2017). Circuit specificity in the inhibitory architecture of the VTA regulates cocaine-induced behavior. *Nature Neuroscience*, 20(3), 438–448. <https://doi.org/10.1038/nn.4482>
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>
- Ernst, M., & Paulus, M. P. (2005). Neurobiology of decision making: A selective review from a neurocognitive and clinical perspective. *Biological Psychiatry*, 58(8), 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.004>
- Eshel, N., Bukwich, M., Rao, V., Hemmelder, V., Tian, J., & Uchida, N. (2015). Arithmetic and local circuitry underlying dopamine prediction errors. *Nature*, 525(7568), 243–246. <https://doi.org/10.1038/nature14855>
- Everitt, B. J., Morris, K. A., O'Brien, A., & Robbins, T. W. (1991). The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: Further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience*, 42(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90145-E](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90145-E)
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- Exley, R., Maubourguet, N., David, V., Eddine, R., Evrard, A., Pons, S., Marti, F., Threlfell, S., Cazala, P., McIntosh, J. M., Changeux, J. P., Maskos, U., Cragg, S. J., & Faure, P. (2011). Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 4$ and subunit $\alpha 6$ to the reinforcing effects of nicotine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7577–7582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103000108>

- Farassat, N., Costa, K. M., Stojanovic, S., Albert, S., Kovacheva, L., Shin, J., Egger, R., Somayaji, M., Duvarci, S., Schneider, G., & Roeper, J. (2019). In vivo functional diversity of midbrain dopamine neurons within identified axonal projections. *ELife*, 8, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.48408>
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 215–229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>
- Faure, P., Tolu, S., Valverde, S., & Naudé, J. (2014). Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience*, 282, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.040>
- Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W., & Lester, R. A. J. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5747–5759. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-15-05747.1997>
- Fenster, C. R., Whitworth, T. L., Sheffield, E. B., Quick, M. W., & Lester, R. A. J. (1999). Upregulation of surface $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *Journal of Neuroscience*, 19(12), 4804–4814. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-12-04804.1999>
- Fernandez, S. P., Broussot, L., Marti, F., Contesse, T., Mouska, X., Soiza-Reilly, M., Marie, H., Faure, P., & Barik, J. (2018). Mesopontine cholinergic inputs to midbrain dopamine neurons drive stress-induced depressive-like behaviors. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06809-7>
- Fernando, A. B. P., Murray, J. E., & Milton, A. L. (2013). The amygdala: Securing pleasure and avoiding pain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00190>
- Fields, H. L., Hjelmstad, G. O., Margolis, E. B., & Nicola, S. M. (2007). *Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094341>
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: An interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, 66, 25–32. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115159>
- Floresco, S. B., Braaksma, D. N., & Phillips, A. G. (1999). Thalamic–cortical–striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial arm maze. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 11061–11071. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-24-11061.1999>
- Floresco, S. B., Ghods-Sharifi, S., Vexelman, C., & Magyar, O. (2006). Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. *Journal of*

- Neuroscience*, 26(9), 2449–2457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4431-05.2006>
- Floresco, S. B., West, A. R., Ash, B., Moorel, H., & Grace, A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, 6(9), 968–973. <https://doi.org/10.1038/nn1103>
- Ford, C. P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*, 282, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
- Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2012). Habenular signaling in nicotine reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 306–307. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.197>
- Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J., & Kenny, P. J. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*, 471(7340), 597–601. <https://doi.org/10.1038/nature09797>
- Frahm, S., Ślimak, M. A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J. F., Tsetlin, V., Maskos, U., & Ibañez-Tallon, I. (2011). Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. *Neuron*, 70(3), 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.013>
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 134(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>
- Gao, D. M., Jeaugey, L., Pollak, P., & Benabid, A. L. (1990). Intensity-dependent nociceptive responses from presumed dopaminergic neurons of the substantia nigra, pars compacta in the rat and their modification by lateral habenula inputs. *Brain Research*, 529(1–2), 315–319. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90843-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90843-Z)
- Gao, M., Jin, Y., Yang, K., Zhang, D., Lukas, R. J., & Wu, J. (2010). Mechanisms involved in systemic nicotine-induced glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 30(41), 13814–13825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1943-10.2010>
- García-Rivas, V., Cannella, N., & Deroche-Gamonet, V. (2017). Individual Variations in the Mechanisms of Nicotine Seeking: A Key for Research on Nicotine Dependence. *Neuropsychopharmacology*, 42(3), 584–586. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.176>
- García-Rivas, V., & Deroche-Gamonet, V. (2019). Not all smokers appear to seek nicotine for the same reasons: implications for preclinical research in nicotine dependence. *Addiction Biology*, 24(3), 317–334. <https://doi.org/10.1111/adb.12607>

- Geisler, S., Derst, C., Veh, R. W., & Zahm, D. S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Neuroscience*, 27(21), 5730–5743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007>
- Gentry, C. L., Wilkins, L. H., & Lukas, R. J. (2003). Effects of prolonged nicotinic ligand exposure on function of heterologously expressed, human $\alpha 4\beta 2$ - and $\alpha 4\beta 4$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 206–216. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041756>
- Georges, F., & Aston-jones, G. (2002). *Activation of Ventral Tegmental Area Cells by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis: A Novel Excitatory Amino Acid Input to Midbrain Dopamine Neurons*. 22(12), 5173–5187.
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Ghosh, S., & Chattarji, S. (2015). Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nature Neuroscience*, 18(1), 112–120. <https://doi.org/10.1038/nn.3888>
- Glimcher, P. W., & Rustichini, A. (2004). Neuroeconomics: The consilience of brain and decision. *Science*, 306(5695), 447–452. <https://doi.org/10.1126/science.1102566>
- Gorelova, N., Mulholland, P. J., Chandler, L. J., & Seamans, J. K. (2012). The glutamatergic component of the mesocortical pathway emanating from different subregions of the ventral midbrain. *Cerebral Cortex*, 22(2), 327–336. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr107>
- Govind, A. P., Vezina, P., & Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: Underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.06.011>
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1980). Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-dopa injection and histofluorescence. *Science*, 210(4470), 654–656. <https://doi.org/10.1126/science.7433992>
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Burst firing. *Journal of Neuroscience*, 4(11), 2877–2890. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-11-02877.1984>
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 105(11), 1039–1046. <https://doi.org/10.1039/CT9140501039>
- Grace, A. A., Floresco, S. B., Goto, Y., & Lodge, D. J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.003>

- Grace, A. A., & Rosenkranz, J. A. (2002). Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiology and Behavior*, 77(4–5), 489–493. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00909-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00909-5)
- Harada, M., Pascoli, V., Hiver, A., Flakowski, J., & Lüscher, C. (2021). Corticostriatal Activity Driving Compulsive Reward Seeking. *Biological Psychiatry*, 90(12), 808–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.08.018>
- Henrikus, D. J., Jeffery, R. W., & Lando, H. A. (1996). Occasional smoking in a Minnesota working population. *American Journal of Public Health*, 86(9), 1260–1266. <https://doi.org/10.2105/AJPH.86.9.1260>
- Hillarp, N., Fuxe, K., & Dahlström, A. (1966). Central monoamine neurons. *Mechanisms of Release of Biogenic Amines, Proceeding*(February 1965), 1965.
- Hnasko, T. S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G. Y., Sulzer, D., Palmiter, R. D., Rayport, S., & Edwards, R. H. (2010). Vesicular Glutamate Transport Promotes Dopamine Storage and Glutamate Corelease In Vivo. *Neuron*, 65(5), 643–656. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.02.012>
- Hnasko, T. S., & Edwards, R. H. (2012). Neurotransmitter corelease: Mechanism and physiological role. *Annual Review of Physiology*, 74, 225–243. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153315>
- Hnasko, T. S., Hjelmstad, G. O., Fields, H. L., & Edwards, R. H. (2012). *Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons: Electrophysiological Properties and Projections*. 32(43), 15076–15085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3128-12.2012>
- Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 695–703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- Ikemoto, S., Qin, M., & Liu, Z. H. (2006). Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 26(3), 723–730. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4542-05.2006>
- Irvine, E. E., Cheeta, S., & File, S. E. (2001). Tolerance to nicotine's effects in the elevated plus-maze and increased anxiety during withdrawal. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 68(2), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00449-4)
- Ito, R., Robbins, T. W., Pennartz, C. M., & Everitt, B. J. (2008). Functional interaction between the hippocampus and nucleus accumbens shell is necessary for the acquisition of appetitive spatial context conditioning. *Journal of Neuroscience*, 28(27), 6950–6959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1615-08.2008>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>

- Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., & Holland, P. C. (2009). The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron*, 61(5), 786–800. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.001>
- Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A., & Zahm, D. S. (2009). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *Journal of Comparative Neurology*, 513(6), 566–596. <https://doi.org/10.1002/cne.21891>
- Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine Neurons Reflect the Uncertainty in Fear Generalization. *Neuron*, 100(4), 916–925.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.028>
- Johansen, J. P., Tarpley, J. W., Ledoux, J. E., & Blair, H. T. (2010). Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nature Neuroscience*, 13(8), 979–986. <https://doi.org/10.1038/nn.2594>
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of Neuroscience*, 12(2), 483–488. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-02-00483.1992>
- Juarez, B., & Han, M. H. (2016). Diversity of Dopaminergic Neural Circuits in Response to Drug Exposure. *Neuropsychopharmacology*, 41(10), 2424–2446. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.32>
- Kable, J. W., & Glimcher, P. W. (2009). The Neurobiology of Decision: Consensus and Controversy. *Neuron*, 63(6), 733–745. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.003>
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., & Davidson, R. J. (2004). The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *Journal of Neuroscience*, 24(24), 5506–5515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0292-04.2004>
- Katz, B., & Thesleff, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of Physiology*, 138(1), 63–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005838>
- Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 513(6), 597–621. <https://doi.org/10.1002/cne.21883>
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 13(11), 4908–4923. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-11-04908.1993>
- Keiflin, R., & Janak, P. H. (2015). Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron*, 88(2), 247–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.037>

- Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3306–3311. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03306.2002>
- Kelly, R. B. (1993). Storage and release of neurotransmitters. *Neuron*, 10(SUPPL. REV.), 43–53. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90240-R](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90240-R)
- Keramati, M., & Gutkin, B. (2014). Homeostatic reinforcement learning for integrating reward collection and physiological stability. *ELife*, 3, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.04811>
- Kita, J. M., Kile, B. M., Parker, L. E., & Wightman, R. M. (2009). In vivo measurement of somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area. *Synapse*, 63(11), 951–960. <https://doi.org/10.1002/syn.20676>
- Klenowski, P. M., Zhao-Shea, R., Freels, T. G., Molas, S., & Tapper, A. R. (2022). Dynamic activity of interpeduncular nucleus GABAergic neurons controls expression of nicotine withdrawal in male mice. *Neuropsychopharmacology*, 47(3), 641–651. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01107-1>
- Klink, R., De Kerchove D'Exaerde, A., Zoli, M., & Changeux, J. P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 21(5), 1452–1463. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-05-01452.2001>
- Koob, G. F. (2006). The neurobiology of addiction: A neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction*, 101(SUPPL. 1), 23–30. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01586.x>
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242(4879), 715–723. <https://doi.org/10.1126/science.2903550>
- Koós, T., & Tepper, J. M. (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 2(5), 467–472. <https://doi.org/10.1038/8138>
- Koós, T., & Tepper, J. M. (2002). Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 22(2), 529–535. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-02-00529.2002>
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 127–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>
- Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., ... Nestler, E. J. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell*, 131(2), 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>

- Kröner, S., Rosenkranz, J. A., Grace, A. A., & Barrionuevo, G. (2005). Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 93(3), 1598–1610. <https://doi.org/10.1152/jn.00843.2004>
- Kuhar, M. J., Ritz, M. C., & Boja, J. W. (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends in Neurosciences*, 14(7), 299–302. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90141-G](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90141-G)
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2015). Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. *Biochemical Pharmacology*, 97(4), 498–511. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.029>
- Labarca, C., Schwarz, J., Deshpande, P., Schwarz, S., Nowak, M. W., Fonck, C., Nashmi, R., Kofuji, P., Dang, H., Shi, W., Fidan, M., Khakh, B. S., Chen, Z., Bowers, B. J., Boulter, J., Wehner, J. M., & Lester, H. A. (2001). Point mutant mice with hypersensitive $\alpha 4$ nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2786–2791. <https://doi.org/10.1073/pnas.041582598>
- Lahti, L., Haugas, M., Tikker, L., Airavaara, M., Voutilainen, M. H., Anttila, J., Kumar, S., Inkinen, C., Salminen, M., & Partanen, J. (2016). Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Development (Cambridge)*, 143(3), 516–529. <https://doi.org/10.1242/dev.129957>
- Lammel, S., Andrea, H., Hackel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2008). *Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System*. 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>
- Lammel, S., Ion, D. I., Roeper, J., & Malenka, R. C. (2011). Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron*, 70(5), 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Laviolette, S. R., & Van Der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 55–65. <https://doi.org/10.1038/nrn1298>
- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 181–191. <https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/wcarlezon>
- Liu, C., Tose, A. J., Verharen, J. P. H., Du, J. X., Beier, K. T., Lammel, S., Liu, C., Tose, A. J., Verharen, J. P. H., Zhu, Y., Tang, L. W., & Jong, J. W. De. (2022). An inhibitory brainstem input to dopamine neurons encodes nicotine aversion Article An inhibitory

- brainstem input to dopamine neurons encodes nicotine aversion. *Neuron*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.003>
- Liu, W. Z., Zhang, W. H., Zheng, Z. H., Zou, J. X., Liu, X. X., Huang, S. H., You, W. J., He, Y., Zhang, J. Y., Wang, X. D., & Pan, B. X. (2020). Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. *Nature Communications*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15920-7>
- Ljungberg, T., Apicella, P., & Schultz, W. (1992). Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *Journal of Neurophysiology*, 67(1), 145–163. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.1.145>
- Lodge, D. J., & Grace, A. A. (2006). The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5167–5172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510715103>
- Lüscher, C. (2016). The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annual Review of Neuroscience*, 39, 257–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-013920>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron*, 69(4), 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.017>
- Lutas, A., Kucukdereli, H., Alturkistani, O., Carty, C., Sugden, A. U., Fernando, K., Diaz, V., Flores-Maldonado, V., & Andermann, M. L. (2019). State-specific gating of salient cues by midbrain dopaminergic input to basal amygdala. *Nature Neuroscience*, 22(11), 1820–1833. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0506-0>
- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T. H., Changeux, J. P., & Faure, P. (2006). Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors. *Neuron*, 50(6), 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.007>
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R., & McGehee, D. S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, 33(6), 905–919. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00625-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00625-6)
- Mansvelder, H. D., & McGehee, D. S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 27(2), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00042-8)
- Marcott, P. F., Mamaligas, A. A., & Ford, C. P. (2014). Phasic dopamine release drives rapid activation of striatal D2-receptors. *Neuron*, 84(1), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.058>

- Margolis, E. B., Lock, H., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2006). The ventral tegmental area revisited: Is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *Journal of Physiology*, 577(3), 907–924. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.117069>
- Marinelli, M., & McCutcheon, J. E. (2014). Heterogeneity of dopamine neuron activity across traits and states. *Neuroscience*, 282, 176–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.034>
- Marti, F., Arib, O., Morel, C., Dufresne, V., Maskos, U., Corringer, P. J., De Beaurepaire, R., & Faure, P. (2011). Smoke extracts and nicotine, but not tobacco extracts, potentiate firing and burst activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons in mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2244–2257. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.112>
- Maskos, U., Molles, B. E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloëz-Tayarani, I., Bemelmans, A. P., Mallet, J., Gardier, A. M., David, V., Faure, P., Granon, S., & Changeux, J. P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436(7047), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2007). *Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons*. 447(June). <https://doi.org/10.1038/nature05860>
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459(7248), 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature08028>
- McDonald, A. J. (1982). Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 208(4), 401–418. <https://doi.org/10.1002/cne.902080409>
- McDonald, A. J. (2003). Is there an Amygdala and How Far Does It Extend? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985(1), 22–33.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory – A century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McGranahan, T. M., Patzlaff, N. E., Grady, S. R., Heinemann, S. F., & Booker, T. K. (2011). $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief. *Journal of Neuroscience*, 31(30), 10891–10902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011>
- McKernan, M. G., & Shinnick-Gallagher, P. (1997). *Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro*. 390(December), 9–13.
- Merrill, C. B., Friend, L. N., Newton, S. T., Hopkins, Z. H., & Edwards, J. G. (2015). Ventral tegmental area dopamine and GABA neurons: Physiological properties and expression

- of mRNA for endocannabinoid biosynthetic elements. *Scientific Reports*, 5(October), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep16176>
- Milner, P. M. (1991). Brain–Stimulation Reward: A Review. *Canadian Journal of Psychology*, 45(1), 1–36.
- Mingote, S., Chuhma, N., Kusnoor, S. V., Field, B., Deutch, A. Y., & Rayport, S. (2015). Functional connectome analysis of dopamine neuron glutamatergic connections in forebrain regions. *Journal of Neuroscience*, 35(49), 16259–16271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1674-15.2015>
- Mirenowicz, J., & Schultz, W. (1994). Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 72(2), 1024–1027. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.2.1024>
- Mirenowicz, J., & Schultz, W. (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, 379(6564), 449–451. <https://doi.org/10.1038/379449a0>
- Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mondoloni, S., Nguyen, C., Vicq, E., Ciscato, M., Jehl, J., Durand-de-Cuttoli, R., Torquet, N., Tolu, S., Pons, S., Maskos, U., Marti, F., Faure, P., & Mouroto, A. (2023). Prolonged nicotine exposure reduces aversion to the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus. *ELife*, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.80767>
- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Moore, R. Y., & F.E. B. (1978). Central Catecholamine Neuron Systems: Anatomy. *Annual Reviews Neuroscience*, 1, 129–169.
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Morales, M., & Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.032>
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y. A., Marti, F., Lamboloz, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., & Faure, P. (2014). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Molecular Psychiatry*, 19(8), 930–936. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.158>

- Morel, C., Fernandez, S. P., Pantouli, F., Meye, F. J., Marti, F., Tolu, S., Parnaudeau, S., Marie, H., Tronche, F., Maskos, U., Moretti, M., Gotti, C., Han, M. H., Bailey, A., Mameli, M., Barik, J., & Faure, P. (2018). Nicotinic receptors mediate stress–nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. *Molecular Psychiatry*, 23(7), 1597–1605. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.145>
- Morel, C., Montgomery, S. E., Li, L., Durand-de Cuttoli, R., Teichman, E. M., Juarez, B., Tzavaras, N., Ku, S. M., Flanigan, M. E., Cai, M., Walsh, J. J., Russo, S. J., Nestler, E. J., Calipari, E. S., Friedman, A. K., & Han, M. H. (2022). Midbrain projection to the basolateral amygdala encodes anxiety-like but not depression-like behaviors. *Nature Communications*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29155-1>
- Morel, C., Montgomery, S., & Han, M. H. (2019). Nicotine and alcohol: the role of midbrain dopaminergic neurons in drug reinforcement. *European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2180–2200. <https://doi.org/10.1111/ejn.14160>
- Morozova, E., Faure, P., Gutkin, B., Lapish, C., & Kuznetsov, A. (2020). Distinct temporal structure of nicotinic ach receptor activation determines responses of vta neurons to endogenous ach and nicotine. *ENeuro*, 7(4), 1–13. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0418-19.2020>
- Morozova, E. O., Myroshnychenko, M., Zakharov, D., di Volo, M., Gutkin, B., Lapish, C. C., & Kuznetsov, A. (2016). Contribution of synchronized GABAergic neurons to dopaminergic neuron firing and bursting. *Journal of Neurophysiology*, 116(4), 1900–1923. <https://doi.org/10.1152/jn.00232.2016>
- Moser, N., Mechawar, N., Jones, I., Gochberg-Sarver, A., Orr-Urtreger, A., Plomann, M., Salas, R., Molles, B., Marubio, L., Roth, U., Maskos, U., Winzer-Serhan, U., Bourgeois, J. P., Le Sourd, A. M., De Biasi, M., Schröder, H., Lindstrom, J., Maelicke, A., Changeux, J. P., & Wevers, A. (2007). Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *Journal of Neurochemistry*, 102(2), 479–492. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04498.x>
- Mrzljak, L., Levey, A. I., & Goldman-Rakic, P. S. (1993). Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: Morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5194–5198. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5194>
- Mulvihill, K. G. (2019). Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochemistry International*, 122(August 2018), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.004>
- Naassila, M. (2018). Neurobiological bases of alcohol addiction. *Presse Medicale*, 47(6), 554–564. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.12.001>

- Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., & Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, 152(4), 1024–1031. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
- Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoon, G. G., Halbert, S. A., Wichmann, R., Holden, S. S., Mertens, K. L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A. C., Wickersham, I. R., Gray, J. M., & Tye, K. M. (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520(7549), 675–678. <https://doi.org/10.1038/nature14366>
- Narashashi, T., Aistrup, G. L., Marszalec, W., & Nagata, K. (1999). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: A new target site of ethanol. *Neurochemistry International*, 35(2), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00055-8)
- Naudé, J., Didienne, S., Takillah, S., Prévost-Solié, C., Maskos, U., & Faure, P. (2018). Acetylcholine-dependent phasic dopamine activity signals exploratory locomotion and choices. *BioRx*.
- Nestler, E. J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2), 119–128. <https://doi.org/10.1038/35053570>
- Nguyen, C., Mondoloni, S., Le Borgne, T., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., Solié, C., Reynolds, L. M., Durand-de Cuttoli, R., Tolu, S., Valverde, S., Didienne, S., Hanneesse, B., Fiancette, J. F., Pons, S., Maskos, U., Deroche-Gamonet, V., Dalkara, D., Hardelin, J. P., ... Faure, P. (2021). Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron*, 109(16), 2604–2615.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>
- Nirenberg, M. J., Chan, J., Liu, Y., Edwards, R. H., & Pickel, V. M. (1997). Vesicular monoamine transporter-2: Immunogold localization in striatal axons and terminals. *Synapse*, 26(2), 194–198. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199706\)26:2<194::AID-SYN10>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199706)26:2<194::AID-SYN10>3.0.CO;2-Y)
- Nishioka, T., Attachaipanich, S., Hamaguchi, K., Lazarus, M., de Kerchove d'Exaerde, A., Macpherson, T., & Hikida, T. (2023). Error-related signaling in nucleus accumbens D2 receptor-expressing neurons guides inhibition-based choice behavior in mice. *Nature Communications*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38025-3>
- Niv, Y., Joel, D., & Dayan, P. (2006). A normative perspective on motivation. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(8), 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.06.010>
- Ntamati, N. R., & Lüscher, C. (2016). VTA projection neurons releasing GABA and glutamate in the dentate gyrus. *ENeuro*, 3(4), 1–11. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0137-16.2016>

- Olds, J. (1956). Pleasure Centers in the Brain. *Scientific American*, 195(4), 105–117. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1056-105>
- Olds, J., Killam, K. F., & Bach-Y-Rita, P. (1956). Self-stimulation of the brain used as a screening method for tranquilizing drugs. *Science*, 124(3215), 265–266. <https://doi.org/10.1126/science.124.3215.265>
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive Reinforcement Produced By Electrical Stimulation of Septal Area and Other Regions of Rat Brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>
- Olds, J., Travis, R. P., & Schwing, R. C. (1960). Topographic organization of hypothalamic self-stimulation functions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53(1), 23–32. <https://doi.org/10.1037/h0039776>
- Olson, V. G., & Nestler, E. J. (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse*, 61(2), 87–95. <https://doi.org/10.1002/syn.20345>
- Omelchenko, N., Bell, R., & Sesack, S. R. (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 30(7), 1239–1250. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06924.x>
- Omelchenko, N., & Sesack, S. R. (2009). Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse*, 63(10), 895–906. <https://doi.org/10.1002/syn.20668>
- Ouagazzal, A. M., Kenny, P. J., & File, S. E. (1999). Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 144(1), 54–60. <https://doi.org/10.1007/s002130050976>
- Overton, P., & Clark, D. (1992). Ionophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse*, 10(2), 131–140. <https://doi.org/10.1002/syn.890100208>
- Paladini, C. A., & Tepper, J. M. (1999). GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse*, 32(3), 165–176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(19990601\)32:3<165::AID-SYN3>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(19990601)32:3<165::AID-SYN3>3.0.CO;2-N)
- Paradiso, K. G., & Steinbach, J. H. (2003). Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *Journal of Physiology*, 553(3), 857–871. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053447>
- Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., & Lüscher, C. (2015). Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction – supplementary data. *Neuron*, 88(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.017>

- Pelletier, J. G., Likhtik, E., Filali, M., & Paré, D. (2005). Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: Implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning and Memory*, 12(2), 96–102. <https://doi.org/10.1101/lm.88605>
- Pessiglione, M. (2014). How the brain motivates behavior: From the reward circuit to the valuation system. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, 198(7), 1283–1296. [https://doi.org/10.1016/s0001-4079\(19\)31224-5](https://doi.org/10.1016/s0001-4079(19)31224-5)
- Pessiglione, M., & Lebreton, M. (2015). From the Reward Circuit to the Valuation System: How the Brain Motivates Behavior. *Handbook of Biobehavioral Approaches to Self-Regulation*, 1–421. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1236-0>
- Petersen, R., & Norris, J. (1984). A comparative study of the disposition of nicotine and its metabolites in three inbred strains of mice. *Pharmacology*.
- Philippart, F., & Khaliq, Z. M. (2018). G i/o protein-coupled receptors in dopamine neurons inhibit the sodium leak channel NALCN. *ELife*, 7, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.40984>
- Phillips, A. G., Blaha, C. D., & Fibiger, H. C. (1989). Neurochemical correlates of brain-stimulation reward measured by ex vivo and in vivo analyses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13(2–3), 99–104. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80017-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80017-X)
- Picciotto, M. R., Brunzell, D. H., & Caldarone, B. J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *NeuroReport*, 13(9), 1097–1106. <https://doi.org/10.1097/00001756-200207020-00006>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, 76(1), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., & Dani, J. A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, 390(6658), 401–404. <https://doi.org/10.1038/37120>
- Polter, A. M., Barcomb, K., Tsuda, A. C., & Kauer, J. A. (2018). Synaptic function and plasticity in identified inhibitory inputs onto VTA dopamine neurons. *European Journal of Neuroscience*, 47(10), 1208–1218. <https://doi.org/10.1111/ejn.13879>
- Qi, J., Zhang, S., Wang, H., Barker, D. J., Miranda-barrientos, J., & Morales, M. (2016). VTA glutamatergic inputs to nucleus accumbens drive aversion by acting on GABAergic interneurons. 19(5). <https://doi.org/10.1038/nn.4281>
- Quick, M. W., & Lester, R. A. J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 457–478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>

- Rahman, S., Zhang, J., & Corrigall, W. A. (2004). Local perfusion of nicotine differentially modulates somatodendritic dopamine release in the rat ventral tegmental area after nicotine preexposure. *Neurochemical Research*, 29(9), 1687–1693. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000035803.64724.17>
- Rangel, A., Camerer, C., & Montague, P. R. (2008). A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 545–556. <https://doi.org/10.1038/nrn2357>
- Razzoli, M., Andreoli, M., Michielin, F., Quarta, D., & Sokal, D. M. (2011). Increased phasic activity of VTA dopamine neurons in mice 3 weeks after repeated social defeat. *Behavioural Brain Research*, 218(1), 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.050>
- Redish, A. D. (2004). Addiction as a computational process gone awry. *Science*, 306(5703), 1944–1947. <https://doi.org/10.1126/science.1102384>
- Reith, M. E. A., & Gnegy, M. E. (2020). Molecular mechanisms of amphetamines. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 258, 265–297. https://doi.org/10.1007/164_2019_251
- Reynolds, S. M., & Berridge, K. C. (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: Bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste “liking”/“disliking” reactions, place preference/avoidance, and fear. *Journal of Neuroscience*, 22(16), 7308–7320. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-16-07308.2002>
- Rice, M. E., Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 77(2), 853–862. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.853>
- Riddle, D. R., Lo, D. C., & Katz, L. C. (1995). NT-4-mediated rescue of lateral geniculate neurons from effects of monocular deprivation. *Nature*, 378(6553), 189–191. <https://doi.org/10.1038/378189a0>
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801–810. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9)
- Roeper, J. (2013). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends in Neurosciences*, 36(6), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.003>
- Rogawski, M. (2012). *Neurotransmitter Actions in the Vertebrate Nervous System*. Springer US. <https://books.google.fr/books?id=WKaZBwAAQBAJ>

- Root, X. D. H., Mejias-aponte, C. A., Qi, J., & Morales, M. (2014). *Role of Glutamatergic Projections from Ventral Tegmental Area to Lateral Habenula in Aversive Conditioning*. 34(42), 13906–13910. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2029-14.2014>
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 423–433. <https://doi.org/10.1038/nrn2651>
- Rosenkranz, J. A., & Grace, A. A. (1999). Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 11027–11039. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-24-11027.1999>
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., & Malenka, R. C. (2003). Erratum: Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons (Neuron (February 20, 2003) 37 (577–582)). *Neuron*, 38(2), 359. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00208-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00208-3)
- Sah, P., Faber, E. S. L., De Armentia, M. L., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803–834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>
- Sakae, D. Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martín-García, E., Morel, L. J., Henrion, A., Gutiérrez-Cuesta, J., Besnard, A., Heck, N., Herzog, E., Bolte, S., Prado, V. F., Prado, M. A. M., Bellivier, F., Eap, C. B., Crettol, S., Vanhoutte, P., Caboche, J., ... El Mestikawy, S. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Molecular Psychiatry*, 20(11), 1448–1459. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.104>
- Salas, R., Sturm, R., Boulter, J., & De Biasi, M. (2009). Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3014–3018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4934-08.2009>
- Sarter, M., Parikh, V., & Howe, W. M. (2009). *Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on*. 10(may), 383–390.
- Saunders, B. T., & Robinson, T. E. (2012). The role of dopamine in the accumbens core in the expression of pavlovian-conditioned responses. *European Journal of Neuroscience*, 36(4), 2521–2532. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08217.x>
- Schilström, B., Rawal, N., Mameli-Engvall, M., Nomikos, G. G., & Svensson, T. H. (2003). Dual effects of nicotine on dopamine neurons mediated by different nicotinic receptor subtypes. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1461145702003188>
- Schönfuß, D., Reum, T., Olshausen, P., Fischer, T., & Morgenstern, R. (2001). Modelling constant potential amperometry for investigations of dopaminergic neurotransmission

- kinetics in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*, 112(2), 163–172. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00465-4)
- Schultz, W. (1997a). Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2), 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80007-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80007-4)
- Schultz, W. (1997b). The Phasic Reward Signal of Primate Dopamine Neurons. *Advances in Pharmacology*, 42(C), 686–690. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60841-8](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60841-8)
- Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36(2), 241–263. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00967-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00967-4)
- Schultz, W. (2006). Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual Review of Psychology*, 57, 87–115. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070229>
- Schultz, W., & Romo, R. (1987). Response of nigrostriated dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *Journal of Neurophysiology*, 57(1), 201–217. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.201>
- Scibilia, R. J., Lachowicz, J. E., & Kilts, C. D. (1992). Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse*, 11(2), 146–154. <https://doi.org/10.1002/syn.890110208>
- Sharp, B. M. (2019). Basolateral amygdala, nicotinic cholinergic receptors, and nicotine: Pharmacological effects and addiction in animal models and humans. *European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2247–2254. <https://doi.org/10.1111/ejn.13970>
- Shi, W. X. (2009). Electrophysiological characteristics of dopamine neurons: A 35-year update. *Journal of Neural Transmission, Supplementa*, 73, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4_8
- Simmons, D. N. V., Petko, A. K., & Paladini, C. A. (2017). Differential expression of long-term potentiation among identified inhibitory inputs to dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 118(4), 1998–2008. <https://doi.org/10.1152/jn.00270.2017>
- Skinner, B. F. (2011). *About Behaviorism*. Knopf Doubleday Publishing Group. <https://books.google.fr/books?id=K7WKkwPzNqsC>
- Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H., & Jhou, T. C. (2019). Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Structure and Function*, 224(1), 219–238. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1761-7>
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N. A. P., Coimbra, B., Domingues, A. V., Silva, J. M., Loureiro-Campos, E., Gaspar, R., Sotiropoulos, I., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2020). Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion.

- Molecular Psychiatry*, 25(12), 3241–3255. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0484-3>
- Soares-Cunha, C., Domingues, A. V., Correia, R., Coimbra, B., Vieitas-Gaspar, N., de Vasconcelos, N. A. P., Pinto, L., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2022). Distinct role of nucleus accumbens D2-MSN projections to ventral pallidum in different phases of motivated behavior. *Cell Reports*, 38(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110380>
- Soden, M. E., Jones, G. L., Sanford, C. A., Chung, A. S., Güler, A. D., Chavkin, C., Luján, R., & Zweifel, L. S. (2013). Disruption of Dopamine Neuron Activity Pattern Regulation through Selective Expression of a Human KCNN3 Mutation. *Neuron*, 80(4), 997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.044>
- Solié, C., Girard, B., Righetti, B., Tapparel, M., & Bellone, C. (2022). VTA dopamine neuron activity encodes social interaction and promotes reinforcement learning through social prediction error. *Nature Neuroscience*, 25(1), 86–97. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00972-9>
- Spence, A. (1964). *Curiosity and Play: Basic Factors*. 154.
- Stamatakis, A. M., Jennings, J. H., Ung, R. L., Blair, G. A., Weinberg, R. J., Neve, R. L., Boyce, F., Mattis, J., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., & Stuber, G. D. (2013). A Unique Population of Ventral Tegmental Area Neurons Inhibits the Lateral Habenula to Promote Reward. *Neuron*, 80(4), 1039–1053. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.023>
- Stamatakis, A. M., & Stuber, G. D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1105–1107. <https://doi.org/10.1038/nn.3145>
- Steidl, S., Dhillon, E. S., Sharma, N., & Ludwig, J. (2017). Muscarinic cholinergic receptor antagonists in the VTA and RMTg have opposite effects on morphine-induced locomotion in mice. *Behavioural Brain Research*, 323, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.039>
- Stobbs, S. H., Ohran, A. J., Lassen, M. B., Allison, D. W., Brown, J. E., & Steffensen, S. C. (2004). Ethanol suppression of ventral tegmental area GABA neuron electrical transmission involves N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 282–289. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.071860>
- Stoker, A. K., Olivier, B., & Markou, A. (2012). Role of $\alpha 7$ - and $\beta 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in the affective and somatic aspects of nicotine withdrawal: Studies in knockout mice. *Behavior Genetics*, 42(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s10519-011-9511-0>
- Stuber, G. D., Hnasko, T. S., Britt, J. P., Edwards, R. H., & Bonci, A. (2010). Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate.

- Journal of Neuroscience*, 30(24), 8229–8233.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010>
- Stuber, G. D., Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., Van Leeuwen, W. A., Hardjoprajitno, J. E., Cho, S., Tye, K. M., Kempadoo, K. A., Zhang, F., Deisseroth, K., & Bonci, A. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, 475(7356), 377–382. <https://doi.org/10.1038/nature10194>
- Swanson, L. W. (1982). *The Projections of the Ventral Tegmental Area and Adjacent Regions: A Combined Fluorescent Retrograde Tracer and Immunofluorescence Study in the Rat*. 9, 321–353.
- Taly, A., Corringer, P. J., Guedin, D., Lestage, P., & Changeux, J. P. (2009). Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), 733–750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>
- Tan, K. R., Brown, M., Labouébe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J. M., Rudolph, U., & Lüscher, C. (2010). Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*, 463(7282), 769–774. <https://doi.org/10.1038/nature08758>
- Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouébe, G., Deisseroth, K., Tye, K. M., & Lüscher, C. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron*, 73(6), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
- Tang, W., Kochubey, O., Kintscher, M., & Schneggenburger, R. (2020). A VTA to basal amygdala dopamine projection contributes to signal salient somatosensory events during fear learning. *Journal of Neuroscience*, 40(20), 3969–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1796-19.2020>
- Tansey, E. M. (2006). Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes Rendus - Biologies*, 329(5–6), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.03.012>
- Taylor, S. R., Badurek, S., Dileone, R. J., Nashmi, R., Minichiello, L., & Picciotto, M. R. (2014). GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *Journal of Comparative Neurology*, 522(14), 3308–3334. <https://doi.org/10.1002/cne.23603>
- Tecuapetla, F., Patel, J. C., Xenias, H., English, D., Tadros, I., Shah, F., Berlin, J., Deisseroth, K., Rice, M. E., Tepper, J. M., & Koos, T. (2010). *Glutamatergic Signaling by Mesolimbic Dopamine Neurons in the Nucleus Accumbens*. 30(20), 7105–7110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0265-10.2010>
- Tepper, J. M., Koós, T., & Wilson, C. J. (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends in Neurosciences*, 27(11), 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.007>
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., Zemdegs, J., Pagès, C., Hay, Y. A. H., Lambolez, B., Caboche,

- J., Gutkin, B., Gardier, A. M., Changeux, J. P., Faure, P., & Maskos, U. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular Psychiatry*, 18(3), 382–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>
- Tolu, S., Marti, F., Morel, C., Perrier, C., Torquet, N., Pons, S., De Beaurepaire, R., & Faure, P. (2017). Nicotine enhances alcohol intake and dopaminergic responses through $\beta 2^*$ and $\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, 7(November 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45116>
- Torquet, N., Marti, F., Campart, C., Tolu, S., Nguyen, C., Oberto, V., Benallaoua, M., Naudé, J., Didienne, S., Debray, N., Jezequel, S., Le Gouestre, L., Hannesse, B., Mariani, J., Mourot, A., & Faure, P. (2018). Social interactions impact on the dopaminergic system and drive individuality. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05526-5>
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- Tran, K. B., Lang, J. J., Compton, K., Xu, R., Acheson, A. R., Henrikson, H. J., Kocarnik, J. M., Penberthy, L., Aali, A., Abbas, Q., Abbasi, B., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abbastabar, H., Abdelmasseh, M., Abd-Elsalam, S., Abdelwahab, A. A., Abdoli, G., Abdulkadir, H. A., ... Murray, C. J. L. (2022). The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10352), 563–591. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01438-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01438-6)
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>
- Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic Firing in Dopaminergic Neurons. *Science*, 324(May), 1080–1084.
- Turrini, P., Casu, M. A., Wong, T. P., De Koninck, Y., Ribeiro-da-Silva, A., & Cuello, A. C. (2001). Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex: Synaptic pattern and age-related atrophy. *Neuroscience*, 105(2), 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00172-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00172-5)
- Tye, K. M., & Janak, P. H. (2007). Amygdala neurons differentially encode motivation and reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 27(15), 3937–3945. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5281-06.2007>
- Tye, K. M., Prakash, R., Kim, S. Y., Fenno, L. E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K. R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471(7338), 358–362. <https://doi.org/10.1038/nature09820>

- Ungless, M. A., Magill, P. J., & Bolam, J. P. (2004). Uniform Inhibition of Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area by Aversive Stimuli. *Science*, 303(5666), 2040–2042. <https://doi.org/10.1126/science.1093360>
- Valtcheva, S., Paillé, V., Dembitskaya, Y., Perez, S., Gangarossa, G., Fino, E., & Venance, L. (2017). Developmental control of spike-timing-dependent plasticity by tonic GABAergic signaling in striatum. *Neuropharmacology*, 121, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.012>
- Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaum, S. G., Williams, G. V., & Arnsten, A. F. T. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature Neuroscience*, 10(3), 376–384. <https://doi.org/10.1038/nn1846>
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., & Wang, G. J. (2003). The addicted human brain: Insights from imaging studies. *Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1444–1451. <https://doi.org/10.1172/JCI18533>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Walters, C. L., Brown, S., Changeux, J. P., Martin, B., & Damaj, M. I. (2006). The $\beta 2$ but not $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*, 184(3–4), 339–344. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0295-x>
- Washburn, M. S., & Moises, H. C. (1992). Electrophysiological and Morphological Amygdaloid Neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience*, 12(10), 4066–4079.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A., & Uchida, N. (2012). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron*, 74(5), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. (2000). Neural mechanisms underlying nicotine addiction: Acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine and Tobacco Research*, 2(1), 19–37. <https://doi.org/10.1080/14622200050011277>
- Watson, J. B. (2017). *Behaviorism*. Taylor & Francis. <https://books.google.fr/books?id=fco3DwAAQBAJ>
- Wise, R. A. (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 115–121. <https://doi.org/10.1002/cne.20689>
- Wise, R. A., & Bozarth, M. A. (1987). A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. *Psychological Review*, 94(4), 469–492. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.94.4.469>
- Wise, R. A., & Rompre, P. P. (1989). Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, 40, 191–225. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.40.020189.001203>
- Wolff, S. B. E., Gründemann, J., Tovote, P., Krabbe, S., Jacobson, G. A., Müller, C., Herry, C., Ehrlich, I., Friedrich, R. W., Letzkus, J. J., & Lüthi, A. (2014). Amygdala interneuron

- subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature*, 509(7501), 453–458.
<https://doi.org/10.1038/nature13258>
- Wolfman, S. L., Gill, D. F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J. G., Bruchas, M. R., & McGehee, D. S. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04654-2>
- Xia, Y., Driscoll, J. R., Wilbrecht, L., Margolis, E. B., Fields, H. L., & Hjelmstad, G. O. (2011). Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7811–7816.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-11.2011>
- Xiao, C., & Ye, J. H. (2008). Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: Role of μ -opioid receptors. *Neuroscience*, 153(1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.040>
- Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 106–118.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
- Yamaguchi, T., Wang, H., Li, X., Ng, T. H., & Morales, M. (2011). *Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway*. 31(23), 8476–8490.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011>
- Yamaguchi, T., Wang, H., & Morales, M. (2013). *Glutamate neurons in the substantia nigra compacta and retrorubral field*. 38(April), 3602–3610.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12359>
- Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y. E., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, 97(2), 434–449.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>
- Yang, K., Hu, J., Lucero, L., Liu, Q., Zheng, C., Zhen, X., Jin, G., Lukas, R. J., & Wu, J. (2009). Distinctive nicotinic acetylcholine receptor functional phenotypes of rat ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Journal of Physiology*, 587(2), 345–361.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.162743>
- Yong, J. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine Neurons Reflect the Uncertainty in Fear Generalization. *Neuron*, 100(4), 916–925.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.028>
- Yoo, J. H., Zell, V., Gutierrez-Reed, N., Wu, J., Ressler, R., Shenasa, M. A., Johnson, A. B., Fife, K. H., Faget, L., & Hnasko, T. S. (2016). Ventral tegmental area glutamate neurons co-release GABA and promote positive reinforcement. *Nature Communications*, 7(May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms13697>

- Zahm, D. S. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(1), 85–105. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00065-2)
- Zarrindast, M. R., Eslahi, N., Rezayof, A., Rostami, P., & Zahmatkesh, M. (2013). Modulation of ventral tegmental area dopamine receptors inhibit nicotine-induced anxiogenic-like behavior in the central amygdala. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 41, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.09.004>
- Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine*, 18(9), 591–603.
- Zell, V., Steinkellner, T., Hollon, N. G., Warlow, S. M., Souter, E., Faget, L., Hunker, A. C., Jin, X., Zweifel, L. S., & Hnasko, T. S. (2020). VTA Glutamate Neuron Activity Drives Positive Reinforcement Absent Dopamine Co-release. *Neuron*, 107(5), 864–873.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.011>
- Zhang, S., Qi, J., Li, X., Wang, H. L., Britt, J. P., Hoffman, A. F., Bonci, A., Lupica, C. R., & Morales, M. (2015). Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nature Neuroscience*, 18(3), 386–396. <https://doi.org/10.1038/nn.3945>
- Zhang, W. H., Zhang, J. Y., Holmes, A., & Pan, B. X. (2021). Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity. *Biological Psychiatry*, 89(9), 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.026>
- Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2013). Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. *Current Biology*, 23(23), 2327–2335. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.041>
- Zhou, K., Xu, H., Lu, S., Jiang, S., Hou, G., Deng, X., He, M., & Zhu, Y. (2022). Reward and aversion processing by input-defined parallel nucleus accumbens circuits in mice. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33843-3>
- Zoli, M., Pistillo, F., & Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, 96(PB), 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>
- Zweifel, L. S., Fadok, J. P., Argilli, E., Garelick, M. G., Jones, G. L., Dickerson, T. M. K., Allen, J. M., Mizumori, S. J. Y., Bonci, A., & Palmiter, R. D. (2011). Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature Neuroscience*, 14(5), 620–628. <https://doi.org/10.1038/nn.2808>