



HAL
open science

Modulation nicotinique de l'activité dopaminergique et des comportements motivés

Eléonore Vicq

► **To cite this version:**

Eléonore Vicq. Modulation nicotinique de l'activité dopaminergique et des comportements motivés. Neurosciences. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS135 . tel-04685877

HAL Id: tel-04685877

<https://theses.hal.science/tel-04685877>

Submitted on 3 Sep 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

École doctorale Cerveau, cognition, comportement

Spécialité Neurosciences

Présentée par :

Éléonore Vicq

Pour obtenir le grade de :

Docteur de Sorbonne Université

Sujet :

Modulation nicotinique des circuits dopaminergiques et des comportements motivés

Soutenue publiquement le 14/06/24

Devant le jury composé de :

Dr Karine GUILLEM	Rapporteuse
Dr Sebastian FERNANDEZ	Rapporteur
Dr Christelle BAUNEZ	Examinatrice
Dr Thierry BAL	Président
Dr Mariano CASADO	Examineur
Dr Alexandre MOUROT	Directeur de thèse
Dr Philippe FAURE	Invité

Table des matières

Résumé	15
Abstract.....	17
Liste des publications.....	19
Liste des abréviations.....	21
Introduction générale	27
Chapitre 1 : Le système cholinergique	31
1. L'acétylcholine.....	31
2. Les récepteurs de l'Acétylcholine	33
1. Les récepteurs muscariniques	33
2. Les récepteurs nicotiniques.....	34
1. Structure.....	34
2. Propriétés des nAChR.....	36
3. Allostérie.....	37
4. Localisation	39
3. Les voies cholinergiques	41
1. Anatomie des voies cholinergiques.....	41
2. Rôle des voies cholinergiques	42
Chapitre 2 : Le système dopaminergique.....	45
1. Synthèse et transmission	45
2. Anatomie des voies DAergiques et leurs fonctions	47
3. La VTA	49
4. Activités des neurones dopaminergiques	52
5. Contrôle nicotinique de la VTA	56

Chapitre 3 : Afférences et efférences de la VTA	59
1. Afférences	59
1. Les noyaux du pont.....	59
2. Le noyau interpédunculaire.....	60
2. Efférences	64
1. Efférences corticolimbiques.....	64
2. Le claustrum	68
Chapitre 4 : Récompense et dopamine	75
1. Récompense	75
2. Activité dopaminergique et renforcement.....	78
3. Dopamine et prise de décision	80
4. Les récompenses primaires	82
1. La nourriture.....	82
2. Les interactions sociales.....	83
5. Les récompenses « artificielles ».....	85
6. Interactions entre récompenses primaires et drogues d'abus.....	86
Chapitre 5 : Physiologie de la réponse à la nicotine	89
1. Action aiguë.....	89
2. Action chronique	92
3. Effets opposés de la nicotine et impact sur la consommation	94
4. Addiction à la nicotine	97
5. Circuits impliqués	99
1. La voie mésolimbique	99
2. La voie mHb-IPN	101
3. Interaction VTA-IPN.....	103
6. Outils optopharmacologiques et chémogénétiques	104
Chapitre 6 : Première publication scientifique.....	111
Résultats complémentaires	155
Chapitre 7 : Seconde publication scientifique.....	161

Chapitre 8 : Contrôle cholinergique endogène de la VTA et récompenses primaires	227
Discussion	237
1. Développement d'outils chémogénétiques pour étudier la transmission nicotinique	237
2. Études des effets de la nicotine sur des structures et voies cérébrales non-canoniques	241
1. L'IPN et son contrôle de la VTA	241
2. La voie VTA-CLA	244
3. Intégration de ces différents circuits et fonctionnement endogène	248
Bibliographie	251
Annexe	289

Résumé

Le tabagisme, qui concerne un milliard de personnes à travers le monde, est à l'origine de plus de 8 millions de décès évitables par an, et constitue ainsi un enjeu sanitaire majeur. La nicotine, principal composé actif du tabac, agit au niveau du système nerveux en se liant aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR). Cette liaison produit de manière concomitante des effets récompensants et aversifs, permettant respectivement de promouvoir et limiter la consommation de tabac. Les nAChR sont exprimés au niveau du système de la récompense, notamment l'aire tegmentale ventrale (VTA), mais également dans de nombreuses autres régions cérébrales perturbées par la nicotine. L'objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier l'effet de la nicotine sur deux voies cérébrales centrées sur la VTA et non-canoniques : la voie reliant noyau interpedonculaire (IPN) et la VTA d'une part, et la voie projetant de la VTA vers le claustrum (CLA) d'autre part.

J'ai dans un premier temps étudié l'implication de l'IPN dans le renforcement à la nicotine. Nous avons montré que les neurones de l'IPN répondent de manière hétérogène à la nicotine, et découvert qu'ils sont sensibles à de faibles doses de nicotine qui n'activent pas la VTA. A l'aide de nouveaux outils chémogénétiques que j'ai développés, nous avons mis en évidence que les nAChR contenant $\beta 4$ de l'IPN jouent un rôle de frein sur la réponse à la nicotine dans la VTA, et diminuent ainsi l'effet récompensant de la drogue. L'IPN ne jouerait donc pas uniquement un rôle dans l'aversion mais également dans le renforcement à la nicotine.

Dans un second temps, j'ai étudié comment une exposition prolongée à la nicotine modifie les interactions sociales, et comment la voie VTA-CLA pourrait participer à ces perturbations comportementales. Nous avons observé qu'une exposition chronique à la nicotine produit une augmentation de la saillance d'un stimulus social nouveau dans une tâche de nouveauté sociale, qui se traduit par une augmentation du temps passé avec le nouveau congénère. De plus, l'activation optogénétique de la voie VTA-CLA induit une perte de la préférence pour le stimulus social nouveau dans la tâche de nouveauté sociale, tandis que la stimulation optogénétique non-contingente reproduit les effets comportementaux d'une exposition prolongée à la nicotine. La voie VTA-CLA semble donc impliquée dans la saillance pour de nouveaux stimuli sociaux, et cette fonction serait perturbée par la nicotine chronique. L'ensemble de ces travaux permet de mettre en évidence l'importance de ces deux nouvelles voies non-canoniques dans l'addiction à la nicotine.

Abstract

Smoking affects one billion people worldwide, and is responsible for over 8 million preventable deaths a year, making it a major health concern. Nicotine, the main active compound in tobacco, acts on the nervous system by binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). There is a wide diversity of nAChR subunits (α 2 to 10 and β 2 to 4) which assemble in different combinations to form pentameric receptors with different biophysical properties and localizations. Nicotine concomitantly produces rewarding and aversive effects, promoting and limiting nicotine consumption, respectively. While nAChRs are expressed in the reward system, notably the ventral tegmental area (VTA), they are also present in many other brain regions susceptible to nicotine-induced disruptions. The aim of my thesis work was to investigate the involvement of two non-canonical VTA-connected brain pathways in nicotine addiction: the pathways linking the interpeduncular nucleus (IPN) and the VTA, and the one connecting the VTA to the claustrum (CLA).

I first studied the involvement of the IPN in nicotine reinforcement. We showed that IPN neurons respond heterogeneously to nicotine, and discovered that they are sensitive to low doses of nicotine that do not activate the VTA. Using new chemogenetic tools that I have developed, we have shown that β 4-containing nAChRs of the IPN act as a brake on the response to nicotine in the VTA, thereby reducing the rewarding effects of the drug. The IPN would therefore contribute not only to aversion but also to nicotine reinforcement.

Secondly, I studied how prolonged exposure to nicotine alters social interactions, and the potential involvement of the VTA-CLA pathway in these behavioral perturbations. We showed that chronic nicotine exposure increased the saliency of a novel social stimulus in a social novelty task, resulting in an increased interaction time with novel conspecifics. Moreover, optogenetic activation of the VTA-CLA pathway induced a loss of preference for the novel social stimulus, while non-contingent optogenetic stimulation replicated the behavioral effects of prolonged nicotine exposure. Therefore, the VTA-CLA pathway seems to be involved in the saliency for new social stimuli, and this function may be disrupted by chronic nicotine exposure. Taken together, these studies highlight the importance of these two non-canonical pathways in nicotine addiction.

Liste des publications

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'équipe Neurophysiologie et Comportements dirigée par les Drs Philippe Faure et Alexandre Mourot, sous la supervision d'Alexandre Mourot. Il s'est déroulé dans un premier temps à Sorbonne Université (Campus Pierre et Marie Curie), au sein du laboratoire Neurosciences Paris Seine-IBPS (UMR 8246) dirigé par le Dr Hervé Chneiweiss, puis à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI) de la ville de Paris, au sein du laboratoire Plasticité du Cerveau (UMR 8249) dirigé par le Dr Thomas Preat. Ce travail devrait donner lieu à sept publications, dont deux en première ou co-première auteure :

- **The interpeduncular nucleus blunts the rewarding effect of nicotine.**

Jehl J.*, Ciscato M.*, **Vicq E.***, Dejean de la Batie G., Guyon N., Mondoloni S., Frangieh J., Nguyen C., Hardelin J. P., Marti F., Corringier P. J., Faure P., Mourot A. (*co-first), bioRxiv (2023) <https://doi.org/10.1101/2023.10.05.561018>. *En révision chez Neuron*.

- **Chronic nicotine alters social novelty through dopamine release in the claustrum.**

Vicq E., Le Borgne T., Gulmez A., Mourot A., Faure P., Solié C. *En préparation*.

- **Prolonged nicotine exposure reduces aversion to the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus.**

Mondoloni M., Nguyen C., **Vicq E.**, Ciscato M., Jehl J., Durand-de Cuttoli R., Torquet N., Tolu S., Pons S., Maskos U., Marti F., Faure P.* et Mourot A*. (*co-last*), *eLife*, (2023). DOI: 10.7554/eLife.80767

- **Dopaminergic and prefrontal dynamics co-determine mice decisions in a spatial gambling task.**

Boussepyrol E.*, Didienne S.*, Takillah S., Solié C., Come M., Ahmed Yahia T., Mondoloni S., **Vicq E.**, Tricoire L., Mourot A., Naudé J.#, Faure P.# (*co-first, #co-last). *Cell Report*, (2023). DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112523

- 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*

- Contingency representation and error signaling in mesolimbic dopamine change with mice exploratory choice strategy.

Come M., Gulmez A., Keshishian L., Jehl J., Bousseyrol E., Didiene S., **Vicq E.**, Le Borgne T., Dalkara D., Mourot A., Faure P. *En préparation.*

- Dopamine Builds and Reveals Reward-Associated Latent Behavioral Attractors.

J. Naudé, MXB. Sarazin, S. Mondoloni, B. Hanesse, **E. Vicq**, F. Amegandjin, A. Mourot, P. Faure*, B. Delord* (*Co-last). *bioRxiv (2022)*. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.07.07.499108>

Liste des abréviations

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholine estérase
ACSF	Liquide céphalo rachidien artificiel
AHP	Hyperpolarisation après le potentiel d'action
Amg	Amygdale
ARN	Acide ribonucléique
BF	Télocéphale basal
BLA	Amygdale basolatérale
BNST	Noyau basal de la strie terminale
Ca ²⁺	Ions calciques
CB ₁	Récepteur aux cannabinoïdes
CeA	Amygdale centrale
ChAT	Choline-acétyl-transférase
ChR2	Channel-rhodopsine
ChT	Choline transférase
CINs	Interneurones cholinergiques
CLA	Clastrum
Clac	Neurone du claustrum qui projette vers les cortex
Clasc	Neurone du claustrum qui projette vers les régions sous-corticales
CLi	Noyau caudal linéaire
CPA	Conditionnement de place aversive
CPP	Conditionnement de préférence de place
CS	Stimulus conditionné
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAG	Diacylglycérol
DAT	Transporteur de la dopamine
DHβE	Dihydro-bêta-erythroidine

DRN	Noyau dorsal du raphé
DSM-5	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
DTg	Tegmentum dorsal
EPSC	Courant post-synaptique exciteur
EPSP	Potentiel post-synaptique exciteur
fr	Fasciculus rétroflexus
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GABAergique	Acide gamma-aminobutyrique, qui libère du GABA
GACH	Senseur de l'acétylcholine
GAD	Glutamate décarboxylase
GFP	Protéine fluorescente verte
GIRK	Courant potassique rectifiant activé par les protéines G
HCN	Protéine-canal activée par l'hyperpolarisation modulée par les nucléotides cycliques
HDB	Limbes horizontales de la bande de Broca
HFHB	Haute fréquence de décharge – haute activité en bouffées
HFLB	Haute fréquence de décharge – faible activité en bouffées
IF	Noyau interfasciculaire
IP	Intrapéritonéale
IP ₃	Inositol-triphosphate
IPA	Noyau interpédonculaire apical
IPC	Noyau interpédonculaire caudal
IPDL	Noyau interpédonculaire dorsolatéral
IPDM	Noyau interpédonculaire dorsomédial
IPI	Noyau interpédonculaire intermédiaire
IPL	Noyau interpédonculaire latéral
IPN	Noyau interpédonculaire
IPR	Noyau interpédonculaire rostral
ISI	Intervalle entre deux potentiels d'action
IV	Intra-veineux
K ⁺	Ions potassiques

KI	Knock-in
LC	Locus cœruleus
LDTg	Tegmentum latéro-dorsal
LFHB	Faible fréquence de décharge – haute activité en bouffées
LFLB	Faible fréquence de décharge – faible activité en bouffées
LH	Hypothalamus latéral
LHb	Habénula latérale
LinAChR	Récepteur nicotinique photocontrôlable
LS	Septum latéral
LTP	Potentialisation à long terme
LTS	Neurone déchargeant à bas seuil
mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine
MEC	Mécamylamine
MFB	Faisceau médian du télencéphale
mHb	Habénula médiale
MLA	Methyllycaconitine
MnR	Noyau médian du raphé
mPFC	Cortex préfrontal médian
MPOA	Aire pré optique médiale de l'hypothalamus
MS	Septum médial
MSN	Neurones épineux moyens
Na ⁺	Ions sodiques
NAc	Noyau accumbens
nAChR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NAcLat	Noyau accumbens Shell latéral
NAcMed	Noyau accumbens Shell médial
NBM	Noyau basal magnocellulaire
NI	Nucleus incertus
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NOS	Oxyde nitrique synthase
OFC	Cortex orbitofrontal

PA	Potentiel d'action
PAG	Substance grise périaqueducule
PBP	Noyau parabrachial pigmenté
PEG	Polyéthylène glycol
PFC	Cortex préfrontal
PKA	Protéine kinase A
PIF	Facteur inhibiteur de la prolactine
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PN	Noyau paranigral
PPTg	Tegmentum pédonculo-pontin
PVALB	Parvalbumine
PVH	Noyau hypothalamique paraventriculaire
RLi	Noyau rostral linéaire
RMTg	Noyau tegmental mésopontin rostro-médian
RPE	Erreur de prédiction de récompense
rtPP	Préférence de place en temps réel
SDT	Slow-dating task
SNc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SST	Somatostatine
TAN	Interneurone actif de manière tonique
TH	Tyrosine hydroxylase
TK	Thymidine nucléotide kinase
VACHT	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VDB	Limbes verticales de la bande diagonale de Broca
VP	Pallidum ventral
vGluT	Transporteur vésiculaire du glutamate
VIP	Peptide vasointestinal
VMAT	Transporteur vésiculaire des catécholamines
VTA	Aire tegmentale ventrale
WT	<i>Wild-type</i> , souris de type sauvage
5-HT	Récepteur de la sérotonine

$\alpha 5^{-/-}$	Knock-out pour la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs nicotiques
$\alpha 6^{-/-}$	Knock-out pour la sous-unité $\alpha 6$ des récepteurs nicotiques
$\beta 2^{-/-}$	Knock-out pour la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiques
$\beta 4^{-/-}$	Knock-out pour la sous-unité $\beta 4$ des récepteurs nicotiques

Introduction générale

Le tabagisme, qui concerne un milliard de personnes à travers le monde, est à l'origine de plus de 8 millions de décès évitables par an et constitue un enjeu sanitaire à l'échelle mondiale. Alors que la consommation mondiale de cigarettes tend à diminuer, une utilisation croissante des cigarettes électroniques se met en place, et ce plus particulièrement chez les adolescents. Une consommation prolongée de cigarettes, électroniques ou non, peut mener chez certains individus à une addiction, caractérisée par un ensemble de symptômes physiques, physiologiques, comportementaux et psychiques.

La substance à l'origine de l'addiction à la cigarette est la nicotine, qui constitue le principal composé psychoactif à la fois du tabac et des cigarettes électroniques. Elle agit au niveau du système nerveux central en se liant aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR). Il existe dans le système nerveux une large diversité de sous-unités nicotiques ($\alpha 2$ à 10 et $\beta 2$ à 4) qui s'assemblent en différentes combinaisons pour former des récepteurs canaux cationiques, homos ou hétéropentamériques, aux propriétés biophysiques, pharmacologiques et aux localisations différentes.

Les nAChR sont fortement exprimés au niveau du système de la récompense et notamment dans la VTA, une structure mésencéphalique dopaminergique (DAergique). La nicotine perturbe l'activité de la VTA pour mener au renforcement. Cependant, les nAChR sont également exprimés dans de nombreuses autres structures cérébrales, qui sont donc des cibles pour la nicotine. Le noyau interpedonculaire (IPN), par exemple, exprime une grande diversité de sous-unités de nAChR, en fortes densités, et joue un rôle dans l'aversion à la nicotine. Ainsi, alors que la VTA répondrait à de faibles doses de nicotine pour induire un renforcement et promouvoir la consommation, l'IPN répondrait préférentiellement à de fortes doses, s'opposant ainsi à la consommation de nicotine. Un premier objectif de ma thèse a été de comprendre comment l'IPN pourrait moduler l'activité de la VTA et donc le renforcement à la nicotine. Pour ce faire, j'ai développé de nouveaux outils chimogénétiques, à savoir des souris transgéniques *knock-in* (KI) exprimant une mutation ponctuelle sur la sous-unité $\beta 2$ ou $\beta 4$ des nAChR, permettant l'ancrage covalent d'antagonistes attachables. Ces paires « souris KI – ligand attachable » permettent d'interrompre la transmission nicotinique endogène, mais aussi d'empêcher la nicotine d'exercer ses effets, et ce dans des noyaux neuronaux ciblés. Ces outils nous ont permis de montrer le rôle de l'IPN dans le renforcement à la drogue, et d'établir un lien entre l'IPN et la VTA.

Dans un second temps, je me suis intéressée aux perturbations des interactions sociales induites par une exposition chronique à la nicotine, ainsi qu'à ses substrats neuronaux. Pour cela, j'ai étudié une structure méconnue qui a récemment gagné en intérêt, le claustrum (CLA). J'ai pu montrer un lien entre libération de dopamine dans le CLA et interactions sociales avec un nouveau congénère, et leurs perturbations suite à une exposition chronique à la nicotine chronique.

L'introduction présentera tout d'abord les principaux acteurs neuronaux étudiés au cours de ce travail de thèse, à savoir le système cholinergique (**Chapitre 1**) et le système DAergique (**Chapitre 2**), circuit primordial dans l'encodage des récompenses naturelles. Je présenterai ensuite les différentes afférences et efférences de la VTA, et plus particulièrement celles auxquelles je me suis intéressée tout au long de ma thèse. Je commencerai tout d'abord par les noyaux du pont qui constituent les principales afférences cholinergiques reçues par la VTA, puis je présenterai l'IPN et le CLA (**Chapitre 3**). J'examinerai ensuite comment le système DAergique participe à l'encodage des récompenses naturelles et comment son fonctionnement est détourné par l'usage de drogues d'abus. Je terminerai ce chapitre par présenter comment ces deux types de récompenses peuvent interagir et modifier la consommation de l'une et de l'autre (**Chapitre 4**). Enfin, je présenterai comment la nicotine perturbe le fonctionnement endogène cérébral, et comment sa consommation prolongée aboutit chez certains individus à une addiction à la nicotine (**Chapitre 5**). Dans ce chapitre, je parlerai également des différents circuits ayant été impliqués dans ces processus, à savoir le système mésolimbique et l'IPN, et de quelle manière ceux-ci participent à la mise en place de troubles de la dépendance à la nicotine. Au terme de ce chapitre, je présenterai finalement les outils chémogénétiques développés au cours de ce travail de doctorat, qui nous permettent de manipuler la transmission nicotinique endogène, afin d'en évaluer le rôle causal dans l'addiction à la nicotine. Les résultats de mes travaux sur le rôle de l'IPN dans le renforcement et sur la perturbation de la voie VTA-CLA suite à une exposition prolongée à la nicotine seront respectivement présentés dans les **Chapitres 6 et 7**. Dans le **Chapitre 8**, je vous présenterai une dernière partie de mes travaux concernant le rôle du contrôle cholinergique endogène de la VTA dans l'encodage de récompenses naturelles. Les résultats des chapitres 6 et 7 seront finalement discutés dans le chapitre de discussion.

Introduction

Chapitre 1 : Le système cholinergique

Dans ce premier chapitre, je vous présenterai un système qui m'a particulièrement intéressée dans ce travail de doctorat : le système cholinergique. Ce système possède une place centrale dans mes travaux, notamment en raison de sa modulation du système dopaminergique que je vous présenterai dans le second chapitre. Après vous avoir présenté l'acétylcholine, sa synthèse et sa transmission, je vous parlerai des différents récepteurs cholinergiques avec une attention particulière aux récepteurs nicotiniques auxquels je me suis exclusivement intéressée lors de ce travail de doctorat. Je terminerai finalement par une description des différentes voies cholinergiques cérébrales.

1. L'acétylcholine

Synthétisée chimiquement pour la première fois par Adolf Von Baeyer en 1867 (Liebreich 1865; Baeyer 1866), l'acétylcholine (ACh) est le premier neurotransmetteur à avoir été découvert. Ses effets parasympathomimétiques sur les tissus périphériques, et constricteurs sur les muscles squelettiques sont étudiés bien avant qu'elle ne soit isolée par Henry Hallet Dale en 1914 à partir d'un échantillon d'ergot de seigle contaminé (Dale et al. 1936; Tansey 2006). L'expérience d'Otto Loewi en 1921 sur des cœurs isolés de grenouille viendra confirmer l'hypothèse de la modulation cholinergique chimique du système parasympathique. Il constate que la stimulation électrique du nerf vague d'un cœur isolé de grenouille, perfusé avec un liquide physiologique, induit une diminution du rythme cardiaque (Loewi 1922). Le transfert de ce même liquide physiologique à un second cœur n'étant pas innervé par le nerf vague induit également une diminution des battements cardiaques. Ces travaux confirment l'hypothèse qui à cette époque faisait débat dans la communauté scientifique, à savoir l'existence d'une transmission chimique, et non uniquement électrique, au niveau des synapses. Otto Loewi et Dale se verront ainsi décerner en 1936 le prix Nobel de physiologie et de médecine, pour l'ensemble de leurs travaux sur l'ACh.

L'ACh est synthétisée dans le cytosol des terminaisons synaptiques des neurones cholinergiques par la choline-acétyl-transférase (ChAT) à partir de la choline et l'acétylcoenzyme A (voir **Figure 1.1**). Une fois produite, l'ACh est acheminée et stockée dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT). La dépolarisation de l'élément présynaptique permet d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , induisant ainsi l'exocytose des vésicules et la libération de l'ACh dans

la fente synaptique. Une fois libérée, l'ACh se lie à différents types de récepteurs, muscariniques ou nicotiques, au niveau de l'élément postsynaptique. Elle est très rapidement dégradée par l'acétylcholine estérase (AChE) en acétate et choline, cette dernière étant finalement recapturée par la Choline transférase (ChT) au niveau de l'élément présynaptique pour être réutilisée dans la synthèse *de novo* d'ACh.

Les modalités de transmission cholinergique ont longtemps fait débat au sein de la communauté scientifique. Il était initialement admis qu'au niveau cérébral, la transmission cholinergique se faisait de manière diffuse (volumique) tandis qu'au niveau de la jonction neuromusculaire, l'ACh était libérée de manière synaptique. En effet, plusieurs arguments permettent de considérer l'existence d'une transmission volumique au niveau central. D'une part, les différents types de récepteurs cholinergiques peuvent être exprimés à distance des sites de libération d'ACh. D'autre part, les dynamiques de variation du niveau d'ACh extracellulaire diffèrent de celle d'un processus de clairance synaptique habituel (Sarter et al. 2009; Picciotto et al. 2012). Cependant, de nouvelles évidences soulèvent des interrogations concernant l'existence au niveau cérébral d'une transmission cholinergique synaptique. En effet, l'enregistrement d'une transmission cholinergique rapide et phasique au niveau du cortex préfrontal (PFC) (Parikh et al. 2007; Hay et al. 2016) ou de l'IPN (Soria-Gómez et al. 2015), ainsi que la remarquable efficacité de l'AChE, soulèvent des questions quant à la concentration réelle d'ACh susceptible de diffuser dans le milieu extracellulaire.

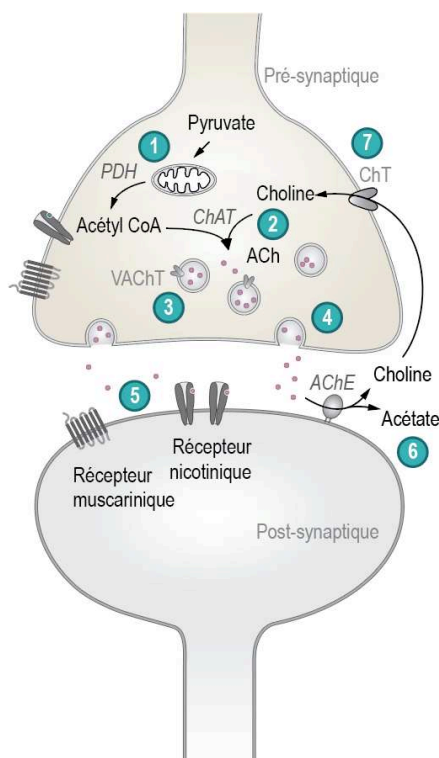


Figure 1.1 : Voie de synthèse de l'ACh | 1. L'acétyl CoA est synthétisé par la dégradation du glucose en pyruvate au niveau des mitochondries. 2. La choline acétyl transférase transforme l'acétyl CoA et la choline en ACh. 3. L'ACh est stockée dans les vésicules grâce au transporteur vésiculaire. 4. L'ACh est libérée dans la fente synaptique et 5. se lie aux récepteurs. 6. L'ACh est dégradée par l'ACh estérase. 7. La choline résultante de la dégradation de l'ACh est recapturée par le transporteur de la choline.

2. Les récepteurs de l'Acétylcholine

1. Les récepteurs muscariniques

L'ACh agit au niveau de différents types de récepteurs et notamment les récepteurs muscariniques (mAChR), qui tiennent leur nom d'un agoniste qui leur est spécifique, provenant d'un champignon *Amanita muscaria*, la muscarine. Ces récepteurs, composés de 7 segments transmembranaires, sont métabotropes : leur activation par la liaison d'un ligand induit un changement de conformation du récepteur qui permet la dissociation de la protéine G à laquelle il est couplé. Cette dernière va quant à elle interagir avec ses cibles entraînant une cascade de signalisation intracellulaire, dont la résultante peut-être une activation ou une inhibition du neurone en fonction du type de protéine G à laquelle les récepteurs sont couplés.

Il existe 5 types de mAChR : les M1, M3 et M5 sont couplés à une protéine Gq/11 activatrice et les M2 et M4 sont couplés à des protéines Gi inhibitrices. Dans le cas des M1, M3, M5, la protéine Gq active la phospholipase C qui va hydrolyser le Phosphatidyl Inositol bis Phosphate (PIP₂) en inositol-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se lie à un canal au niveau du réticulum endoplasmique permettant une libération de calcium (Ca²⁺) dans le cytosol et donc une dépolarisation du neurone. A l'inverse, les protéines Gi couplées aux mAChR M2 et M4 inactivent l'adénylate-cyclase, induisant une diminution des concentrations d'AMPc. La protéine kinase A (PKA), dont l'activité dépend de la concentration cytosolique d'AMPc, voit également son activité chuter et avec elle la phosphorylation des canaux calciques, induisant ainsi un arrêt de l'entrée de calcium dans la cellule. La protéine Gi va aussi stimuler des canaux potassiques rectifiants (GIRK), et les effets cumulés de la sortie de K⁺ avec l'arrêt d'entrée d'ions Ca²⁺ provoquent une hyperpolarisation du neurone.

Ces récepteurs sont largement distribués au sein du système nerveux central. En périphérie, ils sont importants dans de nombreuses fonctions végétatives et, au niveau cérébral, dans des fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Thiele 2013). Au cours de cette thèse, nous n'aborderons pas la fonction des mAChR et nous nous concentrerons sur la modulation nicotinique du système DAergique.

2. Les récepteurs nicotiniques

1. Structure

Les récepteurs nicotiniques tiennent leur nom d'un alcaloïde lipophile appelé la nicotine, qui est également un agoniste spécifique de ces récepteurs, et que l'on retrouve dans le tabac. Ce sont des récepteurs canaux ionotropes qui appartiennent à la famille des « Cys-loop », au même titre que les récepteurs de la sérotonine (5HT₃), les récepteurs GABA_A (GABA: Acide γ -aminobutyrique) et les récepteurs de la glycine (Lemoine et al. 2012). Les nAChR assurent la transformation d'un message chimique en signal électrique. Leur activation par un messenger chimique entraîne une ouverture du canal, une entrée d'ions positifs (Na⁺, Ca²⁺, K⁺) et donc une dépolarisation du neurone. Ils sont composés d'un assemblage de 5 sous-unités, dont il existe une large diversité, et sont exprimés différemment entre le cerveau et la périphérie. Les nAChR musculaires se composent de cinq sous-unités parmi α 1, β 1, δ , γ et ϵ (γ étant uniquement exprimée au stade fœtal, et remplacée par la suite par ϵ). Chez les mammifères, les sous-unités exprimées au niveau cérébral sont les α 2 à 10 sans la 8, et β 2 à 4. L'assemblage différentiel de ces différentes sous-unités sous la forme d'hétéropentamères ou d'homopentamères (voir **Figure 1.2**) confère aux nAChR des propriétés biophysiques (voir **Chapitre 1.2.2**), pharmacologiques et des localisations différentes (voir **Chapitre 1.2.4**).

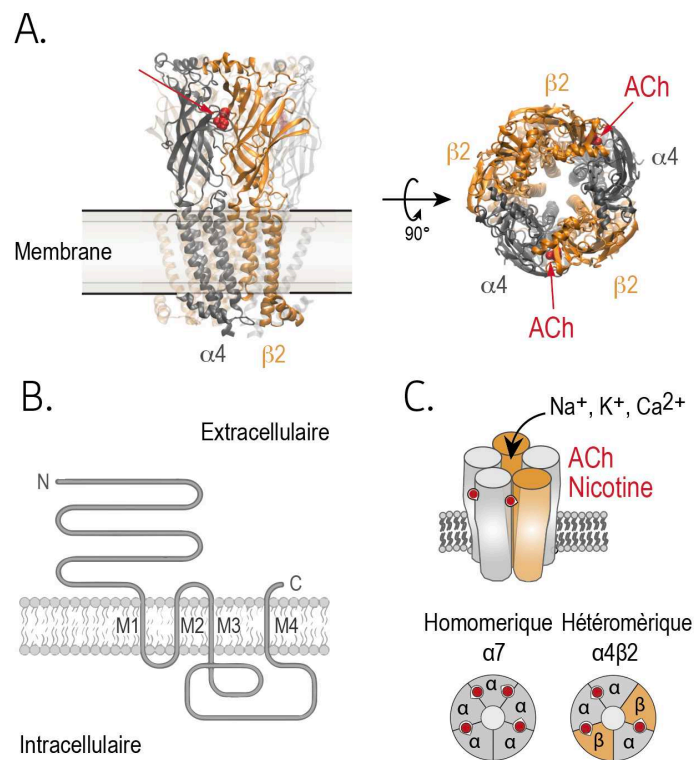


Figure 1.2 : Architecture et diversité des nAChR | A. Structure tridimensionnelle d'un nAChR ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ vu de profil (gauche) ou du dessus (droite). **B.** Topologie d'une sous-unité de nAChR composée d'un large domaine NH₂ extracellulaire, de quatre domaines

transmembranaire (M1-M4), deux boucles intracellulaires, une boucle extracellulaire, et un court domaine COOH extracellulaire. **C.** Les différentes sous-unités de nAChR peuvent s'arranger en différentes combinaisons pour former des homo- ou des hétéro-pentamères. *Adapté de Taly et al. 2009; Changeux 2010.*

Les sous-unités des nAChR sont constituées de plusieurs éléments remarquables (voir **Figure 1.2**) :

- Un grand domaine NH₂-terminal extracellulaire comprenant le site de liaison de l'agoniste et constitué chez les mammifères d'une séquence d'environ 13 acides aminés, encadrée de deux cystéines elles-mêmes engagées dans un pont disulfure,
- 4 segments transmembranaires lipophiles de M1 à M4,
- 2 boucles intracellulaires, une petite reliant les segments M1 et M2, et la seconde plus grande entre M3 et M4,
- Une boucle extracellulaire entre M2 et M3,
- Une courte séquence terminale COOH extracellulaire.

Les sous-unités sont organisées en rosette autour d'un canal central, et peuvent être dites principale, c'est-à-dire porter la majorité du site de liaison à l'agoniste, ou complémentaires et porter le reste du site (Zoli et al. 2015). Le site de liaison orthostérique, c'est-à-dire le site actif où un ligand agoniste peut modifier directement l'état de la protéine, se trouve à l'interface entre des sous-unités adjacentes (Arias 1997). Dans le cas des nAChR hétéropentamériques, il existe deux à trois sites de liaison dont les composantes principales sont portées par les sous-unités α tandis que les sous-unités β ou γ portent les composantes complémentaires. Chez les homopentamères, la sous-unité α porte les deux composantes, à la fois principale et complémentaire, formant ainsi 5 sites de liaison orthostériques (Arias 1997; Taly et al. 2009; Zoli et al. 2015). Le canal ionique est formé par les segments M2 des 5 sous-unités du nAChR, et constitue une composante essentielle dans la sélectivité et la conductivité du canal. En effet, au repos, des résidus hydrophobes localisés proches du point médian ou légèrement déplacés vers le côté cytoplasmique du canal permettent de former une barrière aux flux d'ions. La liaison du ligand permet à la fois d'augmenter le diamètre du canal, mais aussi le mouvement de résidus hydrophiles vers la lumière du canal et l'éloignement transitoire des résidus hydrophobes de la lumière du canal. Ces différentes étapes permettent ainsi le passage d'un flux d'ions à travers le canal selon le gradient électrochimique. Une activation stable des nAChR nécessiterait la liaison de l'ACh au niveau des 2 sites de liaison orthostériques dans le cas des récepteurs hétéromériques, et à 3 sites de liaison non-consécutifs pour des homomériques (Raves et al. 2009).

Dans les récepteurs hétéromériques, les sous-unités qui ne participent pas directement à la formation du site de liaison sont appelées sous-unités accessoires. Toutes les sous-unités ne sont pas capables d'occuper la position accessoire. En effet, seulement les sous-unités $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 3$, et $\beta 4$ peuvent prendre cette position et laisser le récepteur fonctionnel. Ces sous-unités accessoires permettent également de modifier les propriétés biophysiques (voir **Chapitre 1.2.2**) et pharmacologiques des récepteurs notamment en les rendant plus ou moins sensibles à des modulateurs allostériques (Tapia et al. 2007).

2. Propriétés des nAChR

La composition en sous-unités des nAChR constitue un élément déterminant concernant les propriétés biophysiques des récepteurs (Albuquerque et al. 2009; Zoli et al. 2015). En effet, pour les hétéromères, la sous-unité α participe de manière significative à l'affinité apparente du récepteur, tandis que la sous-unité β contribue plutôt aux propriétés de désensibilisation des récepteurs (Fenster et al. 1997). Par exemple, les récepteurs contenant la sous-unité $\beta 2$ désensibiliseront de manière plus rapide que les nAChR contenant la sous-unité $\beta 4$ (voir **Figure 1.3**). Cependant, il est important de noter que les récepteurs homopentamériques désensibilisent également, et que la sous-unité β jouerait un rôle de modulation de la désensibilisation plutôt qu'un rôle permissif. Le calcium présent dans le milieu extracellulaire peut également produire des effets subtils sur ces deux caractéristiques sans pour autant modifier le schéma de contribution des sous-unités α et β (Fenster et al. 1997).

Ainsi, les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ (nAChR $\alpha 4\beta 2^*$) présentent par exemple une grande affinité pour l'ACh et la nicotine tandis que les homopentamères $\alpha 7$ ou les nAChR $\alpha 3\beta 4^*$ présentent une affinité plus faible pour ces deux ligands. Les nAChR $\alpha 3\beta 4^*$ vont en revanche, présenter une plus faible désensibilisation. Les nAChR $\alpha 7^*$ auront des cinétiques de désensibilisation plus rapides mais aussi une plus forte perméabilité calcique, qui peut s'avérer importante dans le cadre de la plasticité synaptique. Le calcium extracellulaire permettra également d'augmenter l'affinité apparente de la nicotine pour les états actifs et désensibilisés des nAChR $\alpha 7^*$ (Fenster et al. 1997).

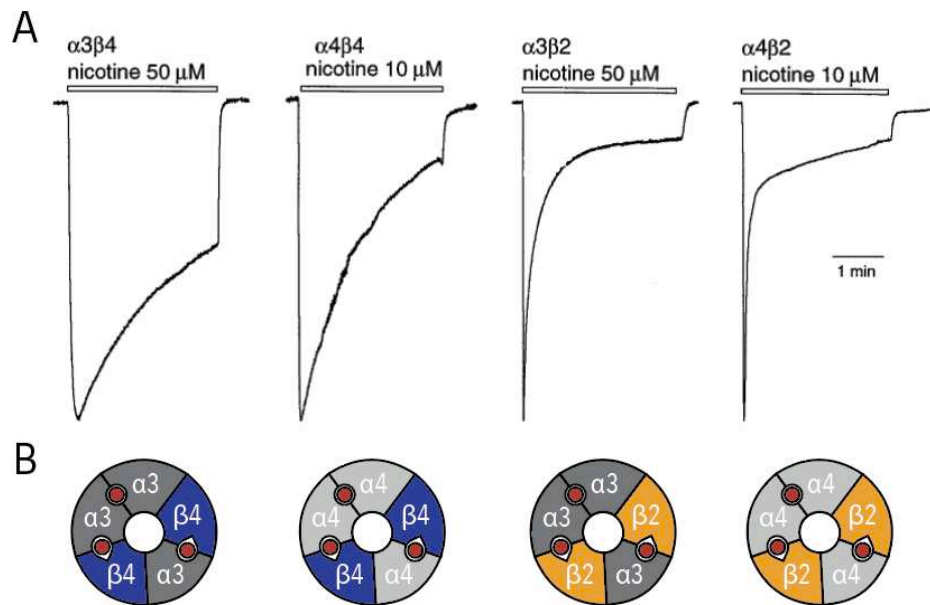


Figure 1.3 : Propriétés biophysiques des nAChR. | **A.** Cinétiques d'activation et de désensibilisation selon la composition des nAChR exprimés dans des oocytes, en réponse à une brève application de nicotine à différentes concentrations proches de l' EC_{50} . **B.** Représentation schématique des différents nAChR. *Adapté de Fenster et al. 1997.*

Malgré les différences de propriétés des nAChR présentées ci-dessus, la séquence protéique des différentes sous-unités reste cependant très conservée. Cette homologie de séquences ne permet donc que peu de sélectivité pharmacologique. Les différents ligands auront donc des affinités préférentielles pour certains types de nAChR dans des fenêtres de concentrations restreintes qui permettront ainsi de diminuer l'action pharmacologique du ligand pour d'autres sous-types de récepteurs. Par exemple, la dihydro- β -érythroidine (DH β E) est un antagoniste faiblement spécifique pour les hétéromères de manière générale, tandis que la mécamylamine (MEC) agira préférentiellement sur les hétéromères $\alpha 4\beta 2$, bien qu'elle puisse également antagoniser les nAChR $\alpha 7^*$ à de fortes concentrations. Finalement, la methyllycaconitine (MLA) agira de manière plus spécifique sur les homomères et de manière négligeable sur les hétéromères.

3. Allostérie

Les nAChR peuvent se trouver dans différents états, conducteurs ou non (voir **Figure 1.4**) (Weber et al. 1975; Changeux 2018). En absence d'agoniste, le récepteur se trouve dans un état de repos, le canal fermé, et n'est donc pas conducteur. La liaison de l'agoniste produit l'ouverture du canal. Si l'agoniste reste lié au récepteur, celui-ci va se désensibiliser, le canal se referme et passe dans un état non-conducteur (Katz and Thesleff 1957). Certains ligands présentent des affinités préférentielles pour certains états des récepteurs plutôt

que d'autres. Par exemple, la nicotine et l'ACh ont une affinité préférentielle pour l'état désensibilisé.

Ces réorganisations structurales du récepteur en présence ou non de ligand sont appelées allostérie. Elles ont été généralisées à partir du modèle Monod-Wyman-Changeux, portant initialement sur la régulation de l'activité d'une enzyme constituée de sous-unités identiques par une molécule effectrice (Changeux 2010a).

Ce modèle se base sur plusieurs postulats, à savoir :

- Les protéines régulées sont symétriques et composées d'un petit nombre de sous-unités identiques.
- Les protéines régulées existent dans plusieurs conformations discrètes à l'équilibre en l'absence de signal régulateur.
- Les ligands régulateurs déplacent l'équilibre entre les conformations vers celle pour laquelle ils ont la plus haute affinité.
- La transition allostérique qui se fait de manière concertée par les sous-unités, est de type tout ou rien.

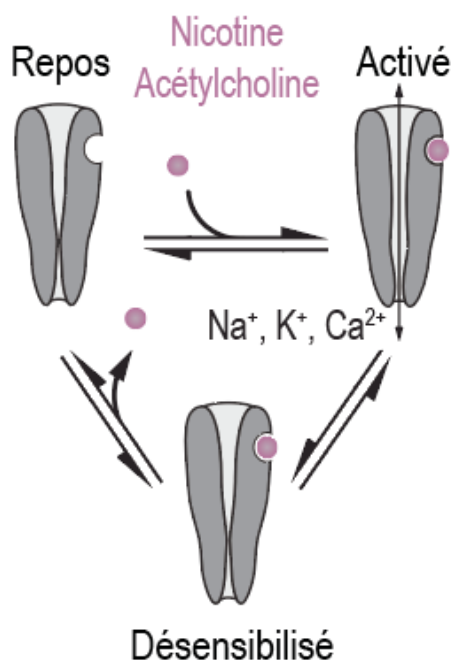


Figure 1.4 : Allostérie des nAChR | Les nAChR peuvent se trouver dans un état de repos où le canal est fermé et donc non conducteur. La liaison d'un agoniste au niveau des sites orthostériques du récepteur induit un changement de conformation de celui-ci. Le canal s'ouvre et les ions passent selon leur gradient électrochimique. Si le ligand reste lié, le récepteur se désensibilise, le canal se ferme et le nAChR n'est plus conducteur.

Le modèle Monod-Wyman-Changeux postule l'existence d'états discrets des protéines allostériques. Cependant, des enregistrements unitaires en patch-clamp ont permis de constater que de nombreux canaux peuvent s'ouvrir avec une conductance plus faible que la conductance maximale. Certains de ces états de « sous-conductance » ne peuvent être expliqués par l'existence de trois états discrets des récepteurs. Ainsi, certains modèles

allostériques proposent l'existence d'un continuum entre les différents états des récepteurs (Karpen and Ruiz 2002). Plus récemment, des enregistrements de canal unique en patch-clamp ont permis d'observer des courants unitaires spontanés, et ce, en absence de ligand (Auerbach 2012). Cette découverte confirmerait donc la coexistence des nAChR dans des états fermés non-conducteurs et ouverts conducteurs, postulée par Changeux et collaborateurs.

4. Localisation

À l'échelle du cerveau :

L'étude de la localisation cérébrale d'une protéine est généralement réalisée à l'aide d'analyses immunohistochimiques qui se basent sur la réaction antigène/anticorps. Néanmoins, en ce qui concerne les nAChR, les anticorps pour les différentes sous-unités nicotiques sont peu spécifiques. Ainsi, la plupart des travaux de localisation des nAChR ont été réalisés à l'aide de marquages avec des radio-ligands (Zoli 1998; Baddick and Marks 2011). La fusion de protéines fluorescentes rapportrices comme la *green fluorescent protein* (GFP) sur certaines sous-unités nicotiques a également permis de compléter ces études de distribution des nAChR dans le cerveau (Nashmi et al. 2003; Drenan et al. 2008).

Ces travaux ont pu montrer l'existence d'une grande diversité de profils d'expression des différentes sous-unités nicotiques selon les régions cérébrales (voir **Figure 1.5**), et dans des proportions, densités et stœchiométrie également très variées (Zoli et al. 2015; Shorey-Kendrick et al. 2015). Par exemple, il existe des sous-unités et des récepteurs exprimés de manière ubiquitaire dans le cerveau, comme les nAChR $\alpha 4\beta 2^*$. Ces récepteurs peuvent être co-assemblés avec différentes sous-unités comme $\alpha 5$, $\alpha 6$ ou $\beta 4$. Certaines sous-unités se font plus rares, telles que les sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 4$ que l'on retrouve très majoritairement et avec de fortes densités dans la voie reliant l'Habenula médiale (mHb) à l'IPN (voir **Chapitre 3**), mais également dans le cervelet, l'hippocampe, le thalamus, les noyaux du pont, le tractus solitaire, la rétine et la glande pinéale.

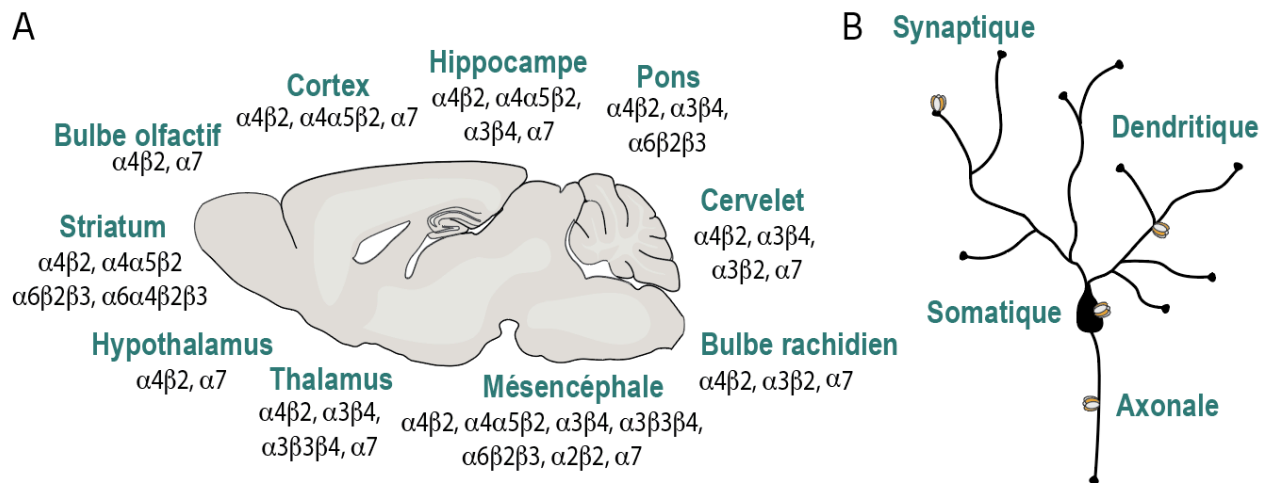


Figure 1.5 : Localisation des nAChR | **A.** Distribution des différents sous-types de nAChR à travers le cerveau chez la souris. **B.** Les nAChR peuvent être exprimés sur les différents compartiments du neurone.

À l'échelle du neurone :

Les nAChR peuvent être localisés sur les différents compartiments du neurone, c'est-à-dire sur le soma, le long de l'arborisation dendritique ou de l'axone, aussi bien de manière présynaptique que postsynaptique (voir **Figure 1.5**) (Nashmi et al. 2003; Drenan et al. 2008). Cette diversité de localisation sous-tend leur rôle de neuromodulateur à travers le cerveau (Dani 2001; Dani and Bertrand 2007).

Lorsque les nAChR sont localisés de manière présynaptique (Léna et al. 1993; Zarei et al. 1999), ils facilitent la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Albuquerque et al. 2000, 2009). En effet, une particularité des nAChR est leur capacité d'activation à des potentiels membranaires négatifs. Cette fonctionnalité leur permet de faire rentrer des ions positifs et notamment du Ca^{2+} à des potentiels auxquels les canaux calciques voltage-dépendants ne s'ouvrent pas et où les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) sont bloqués par le magnésium. Lorsque cette activité présynaptique des nAChR est temporellement rapprochée d'une stimulation électrique des afférences glutamatergiques, elle peut permettre l'induction d'une potentialisation synaptique à long terme (LTP) (Ji et al. 2001; Dani and Bertrand 2007).

Les nAChR localisés au niveau du soma, de l'arborisation dendritique ou axonale peuvent également moduler l'excitabilité locale et à terme la libération de neurotransmetteurs (Ji et al. 2001; Dani and Bertrand 2007). En effet, l'activation de ces nAChR non-synaptiques va modifier la résistance membranaire et influencer à la fois la propagation et l'efficacité des entrées synaptiques. Ainsi, des nAChR localisés au niveau d'une bifurcation pourront

permettre à un potentiel d'action d'envahir uniquement une partie de l'arborisation dendritique ou axonale, grâce à l'inactivation de certains canaux dépendants du voltage et d'une dépolarisation locale. La distribution non-synaptique des nAChR pourrait également permettre d'influencer le potentiel de repos membranaire et donc de moduler la facilité à atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action.

3. Les voies cholinergiques

1. Anatomie des voies cholinergiques

De nombreux travaux immunohistochimiques portant sur l'analyse de l'expression du VAcHT dans le cerveau, ont permis de mettre en lumière l'existence de trois principaux noyaux cholinergiques. Le premier est localisé dans la partie antérieure et ventrale du cerveau, et appelé télencéphale basal (*basal forebrain*, BF), le second dans le tronc cérébral (*hindbrain*), et le dernier correspond à l'épithalamus (voir **Figure 1.6**) (Everitt, Robbins 1997). Le télencéphale basal se divise en plusieurs sous-noyaux comprenant le septum médial (MS, ch1), le noyau des limbiques verticales de la bande diagonale de Broca (VDB, ch2), et le noyau basal magnocellulaire ou noyau de Meynert (NBM, ch4). Le tronc cérébral se scinde en deux noyaux : les noyaux pédonculo-pontins (PPTg, ch5), et le tegmentum latérodorsal (LDTg, ch6). Finalement, l'épithalamus se subdivise en deux noyaux appelés habénula médiale (mHb, ch7), et noyau parabigéminale (ch8). Ces différents noyaux cholinergiques sont constitués de neurones de projection qui libèrent l'ACh dans les structures cibles (Everitt, Robbins 1997; Sarter, Parikh 2005). Ils ne sont généralement pas exclusivement cholinergiques et peuvent également être composés d'autres types de neurones (par exemple glutamatergiques), ou de neurones co-libérant plusieurs neurotransmetteurs comme dans la mHb où certains neurones cholinergiques libèrent également du glutamate (Frahm et al. 2015a). Les projections des neurones cholinergiques permettent de moduler de manière diffuse et globale l'activité de nombreuses structures cérébrales comme l'IPN, la VTA ou le striatum. Finalement, les interneurons cholinergiques sont majoritairement localisés au niveau des cortex et du striatum (Woolf 1991; Zoli 2000; Von Engelhardt et al. 2007). Dans les régions corticales, ils ont une morphologie bipolaire et se trouvent principalement au niveau des couches 2 et 3, tandis qu'au niveau du striatum, ces interneurons sont appelés TANs (*tonically active neurons*) ou CINs (*cholinergic interneurons*) et jouent un rôle fondamental dans la modulation des neurones striataux de projection, contactés par le système DAergique.

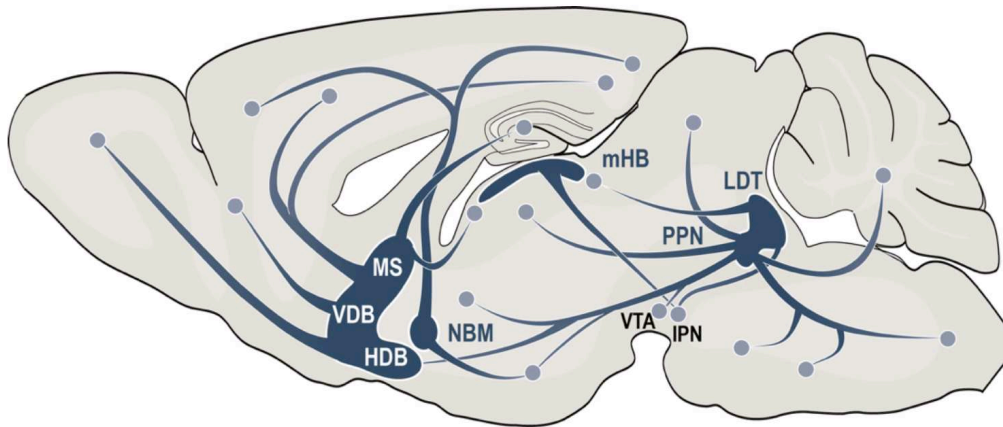


Figure 1.6 : Anatomie des voies cholinergiques | MS = septum médial (ch1), VDB = limbes verticales de la bande diagonale de Broca (ch2), HDB= limbes horizontales de la bande de Broca (ch3), NBM = noyau basal magnocellulaire (ou de Meynert, ch4), PPN = PPTg noyau pédonculo-pontin (ch5), LDT = LDTg tegmentum latérodorsal (ch6), mHB = habénula médiale (ch7). Le noyau parabigéminale (ch8) n'est pas représenté ici. *Adapté de Everitt, Robbins 1997.*

2. Rôle des voies cholinergiques

La neuromodulation cholinergique est impliquée dans des fonctions cérébrales variées telles que les processus attentionnels, l'intégration sensorielle, ou encore la régulation du sommeil et de l'éveil (Sarter and Bruno 1997; Minces 2017). Elle est également impliquée dans différentes pathologies neurologiques et psychiatriques telles que la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, ou l'addiction à la nicotine (Taly et al. 2009).

Les premières études visant à comprendre l'implication de la modulation cholinergique dans les fonctions cérébrales ont été réalisées à partir d'expériences consistant à effectuer des lésions de certains noyaux cholinergiques (Sarter and Bruno 1997). D'abord évaluée comme impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, la modulation cholinergique aurait finalement plutôt un rôle dans certains aspects de l'attention. Les lésions du télencéphale basal chez le rat semblent induire des déficiences attentionnelles qui ne les empêchent cependant pas de traiter les stimuli environnementaux et peuvent même pour certains se manifester par une augmentation des niveaux d'apprentissage. Le système cholinergique permettrait donc d'optimiser les performances comportementales en réponse à des besoins spécifiques (Sarter and Bruno 1997).

Les neurones cholinergiques du télencéphale basal semblent également impliqués dans la régulation des états de sommeil et d'éveil (Xu et al. 2015). En effet, ces neurones sont connus pour être actifs à la fois pendant l'éveil et le sommeil paradoxal, mais silencieux pendant

le sommeil NREM. Leur activation améliore l'éveil, l'attention et la mémoire. Des lésions de ce noyau semblent avoir des conséquences différentes selon les études. Pour certains, les lésions entraînent une augmentation de l'activité encéphalogramme δ et diminuent l'éveil (Xu et al. 2015) tandis que pour d'autres, elles réduisent le sommeil (Buzsaki et al. 1988).

Finalement, le système cholinergique est également impliqué dans l'addiction à la nicotine (Faure et al. 2014). En effet, la nicotine, qui est la principale substance psychoactive présente dans le tabac, vient activer les nAChR au niveau de la VTA et va perturber l'activité du circuit de la récompense, circuit que je vais à présent vous présenter dans le second chapitre.

Chapitre 2 : Le système dopaminergique

Dans ce chapitre, je vous présenterai le système dopaminergique, un second système auquel je me suis intéressée dans ce travail de doctorat. Après vous avoir parlé des voies de synthèse de la dopamine, des voies anatomiques et de la transmission dopaminergique, je vous présenterai plus particulièrement la structure centrale de mes travaux : l'aire tegmentale ventrale.

1. Synthèse et transmission

La dopamine (DA) est un neuromodulateur appartenant à la famille des catécholamines tout comme l'adrénaline et la noradrénaline. Elle est synthétisée à partir d'un acide aminé, la tyrosine (voir **Figure 2.1**), qui est tout d'abord convertie en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH), puis en DA par la dopa-décarboxylase. Une fois synthétisée, la DA est ensuite stockée dans les vésicules à l'aide du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). La dépolarisation de l'élément présynaptique induit une augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans la cellule et, en conséquence, l'exocytose des vésicules. La DA en excès dans le milieu extracellulaire est finalement recapturée par le transporteur de la DA (DAT).

Au niveau du milieu extracellulaire, la DA peut se lier à plusieurs types de récepteurs métabotropes et entraîne différents effets selon la voie de signalisation intracellulaire engagée (Missale et al. 1998; Beaulieu and Gainetdinov 2011; Beutler et al. 2011; Ford 2014). Ces récepteurs sont majoritairement exprimés au niveau des cibles de projection des neurones DAergiques, mais peuvent également être localisés au niveau des neurones DAergiques. Il existe cinq types de récepteurs DAergiques, de D1 à D5, regroupés en deux sous-classes : les *D1-like* composés des récepteurs D1 et D5 dont l'effet est excitateur, et les *D2-like* constitués des récepteurs D2, D3, D4 et dont l'effet est inhibiteur. Les récepteurs *D1-like* sont couplés à des protéines $G_{s/olf}$ hétérotrimériques qui activent l'adénylate-cyclase, permettant ainsi une augmentation de la concentration d'AMPc et donc l'activation de la PKA. La PKA peut ensuite phosphoryler des canaux voltage-dépendants potassiques, sodiques ou calciques, des récepteurs ionotropes glutamatergiques ou GABAergiques, permettant d'augmenter l'excitabilité du neurone. L'action de la PKA passe également par la régulation de l'activité de différents facteurs de transcription, ainsi que la phosphorylation d'autres types de protéines comme la DARPP-32. Les récepteurs *D2-like* sont quant à eux associés à des protéines $G_{i/o}$ négativement couplées à l'adénylate-cyclase,

limitant l'activation de la PKA et favorisant en parallèle l'ouverture des canaux potassiques GIRK, induisant ainsi une diminution de l'excitabilité de la cellule (Beaulieu and Gainetdinov 2011). Au-delà des différences au niveau des voies de signalisation engagées, ces deux types de récepteurs présentent également des propriétés pharmacologiques différentes, qui impliquent une intégration différentielle de la signalisation DAergique en fonction des dynamiques de libération de DA. En effet, l'affinité des récepteurs D2-like à la DA serait 10 à 100 fois supérieure à celle des récepteurs D1-like (Beaulieu and Gainetdinov 2011; Tritsch and Sabatini 2012). Une libération phasique de DA activerait les deux classes de récepteurs, tandis qu'une libération de DA plus faible activerait préférentiellement les récepteurs D2-like (Marcott et al. 2014). L'effet de la DA sur une population neuronale dépendra donc de plusieurs facteurs, à savoir le(s) type(s) de récepteur(s) exprimé(s) ainsi que la dynamique de libération de celle-ci.

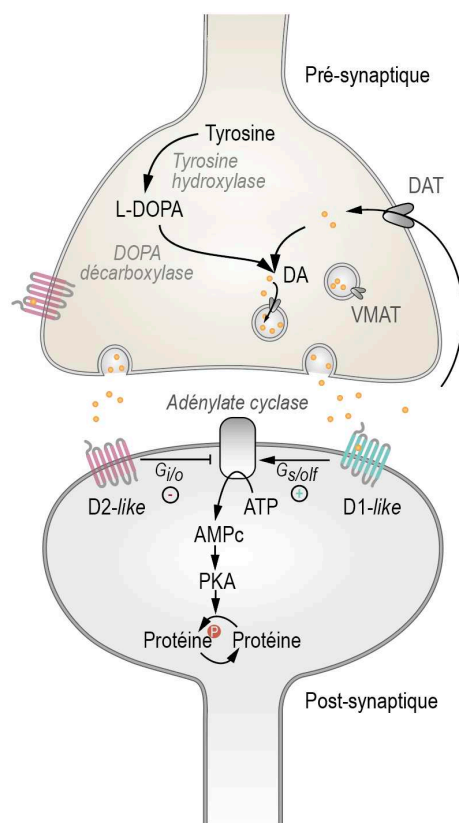


Figure 2.1: Synthèse et signalisation DAergique | La tyrosine est convertie en L-DOPA par la TH puis en DA par la DOPA décarboxylase. La DA est stockée dans les vésicules par VMAT. La DA est libérée dans le milieu extracellulaire et agit sur deux types de récepteurs. Les D1-like sont positivement couplés à l'adénylate-cyclase qui augmente l'activité de la PKA et l'excitabilité de la cellule. Les récepteurs D2-like sont négativement couplés à l'adénylate-cyclase induisant ainsi une hyperpolarisation du neurone.

Au niveau cérébral, la transmission DAergique est majoritairement volumique, bien que celle-ci puisse également dans certains cas être synaptique (Agnati et al. 1995). Les terminaisons axonales des neurones ne formant généralement pas de contact avec un élément postsynaptique, la DA libérée (notamment au niveau des varicosités) va diffuser dans l'espace extracellulaire pour induire des effets de manière distale sur ses cibles (Descarries and Mechawar 2000; Descarries et al. 2008). La transmission DAergique peut être

régulée à différents niveaux par plusieurs mécanismes (Ford 2014). Le mécanisme principal est la recapture de la DA via le DAT, permettant ainsi l'élimination de la DA du milieu extracellulaire. L'activation des autorécepteurs D2, localisés au niveau somato-dendritique ou axonal, peut réguler la libération de DA en activant des canaux potassiques voltage-dépendants et en inhibant des canaux calciques voltage-dépendants. Le neurone est alors hyperpolarisé, diminuant ainsi la probabilité de relargage des vésicules. Une activation soutenue de ces autorécepteurs D2 peut aussi permettre de réguler la recapture de la DA en augmentant l'expression et l'activité du DAT, ce qui diminue la concentration de DA dans le milieu extracellulaire. Elle peut enfin également réguler la TH en diminuant l'activité de l'adénylate-cyclase et donc de la PKA, permettant ainsi de diminuer la phosphorylation de celle-ci et de diminuer la production de DA. La régulation de la transmission DAergique peut, par ailleurs, se produire par le biais d'une dérégulation de VMAT2, entraînant une augmentation de la concentration de DA cytosolique et donc du stress oxydatif (Kelly 1993; Nirenberg et al. 1997; Mulvihill 2019). Finalement, la transmission DAergique peut aussi être régulée par l'expression de nAChR de manière somatique ou présynaptique, permettant de moduler l'activité en bouffées des neurones (Mameli-Engvall et al. 2006; Tolu et al. 2013).

2. Anatomie des voies DAergiques et leurs fonctions

La DA est un neuromodulateur impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que la motivation, l'apprentissage, les émotions ou le contrôle moteur. Son importance fonctionnelle a été largement mise en évidence par le nombre de pathologies liées à celle-ci, comme la maladie de Parkinson, la schizophrénie, les troubles obsessionnels compulsifs ou l'addiction (Ayano 2016; Klein et al. 2019). Il existe neuf noyaux cérébraux comportant des neurones DAergiques notés de A8 à A16 (voir **Figure 2.2**) (Björklund and Dunnett 2007). Cependant, les principales sources de DA reposent sur deux noyaux mésencéphaliques, la substance noire *pars compacta* (SNc, A9) et la VTA (A10), et sur un noyau hypothalamique, le noyau arqué de l'hypothalamus (A12). Ces régions vont moduler l'activité globale cérébrale, notamment par le biais de trois voies DAergiques principales :

- La voie nigrostriatale, composée des projections DAergiques des neurones de la SNc vers le striatum dorsal, est importante dans le contrôle de la fonction motrice et plus particulièrement les aspects procéduraux des mouvements et des comportements motivés (Graybiel 1997; Hikosaka et al. 2002). La modulation DAergique du mouvement passe par les voies directe et indirecte (Hikosaka et al. 2019). Ces deux voies sont portées respectivement par les récepteurs D1 et D2 exprimés au niveau des neurones du striatum, et entraînent chacune un

enchaînement d'activation et d'inhibition de plusieurs structures aboutissant à la transmission ou non d'une commande motrice à la périphérie (Surmeier et al. 2007; Kravitz et al. 2010; Gerfen and Surmeier 2011). Ainsi, les voies directe et indirecte agissent de manière conjointe pour permettre une régulation fine du mouvement.

- Les voies mésocorticale et mésolimbique, qui comprennent les projections de la VTA vers les régions à la fois corticales (PFC) mais aussi limbiques (striatum ventral et amygdale), forment ensemble la voie mésocorticolimbique. Cette voie joue un rôle primordial dans l'encodage de la récompense et les processus motivationnels (Kelley and Berridge 2002). En effet, des expériences de stimulation intra-crâniale ont permis d'impliquer le système DAergique mésolimbique dans les comportements de renforcement positif, motivés par une récompense. Par ailleurs, il est admis que ce système répondrait également par une augmentation de la libération de DA dans le cas de stimuli aversifs. Cette voie DAergique est celle à laquelle je me suis intéressée tout au long de ma thèse.
- La voie tubéroinfundibulaire DAergique, constituée de projections du noyau arqué de l'hypothalamus vers l'hypophyse, est particulièrement importante dans la régulation de la sécrétion de la prolactine (Demarest et al. 2008a, b; Klein et al. 2019). La DA libérée dans le sang au niveau du système porte hypophysaire agit au niveau des cellules lactotropes de l'hypophyse en inhibant leur sécrétion de prolactine (Gudelsky and Porter 1980; Gudelsky 1981). La DA est également occasionnellement appelée facteur inhibiteur de la prolactine (PIF), ou hormone inhibant la prolactine. Pendant la lactation, le contrôle inhibiteur exercé par la DA sur les cellules lactotropes est levé, leur permettant ainsi de produire la prolactine et donc une réponse physiologique appropriée aux petits allaités (Ben-Jonathan and Hnasko 2001). Il est intéressant de noter que la prise de certains types d'antipsychotiques qui bloquent les récepteurs de la DA au niveau de l'hypophyse peuvent ainsi désinhiber la production de prolactine induisant une galactorrhée (Ayano 2016).

À ces trois voies DAergiques principales, s'ajoute le système incerto-hypothalamique (Klein et al. 2019). Ce dernier est constitué d'une partie dorsale comprenant l'aire hypothalamique postérieure et la *zona incerta* (A11, A13), et d'une partie ventrale comprenant le noyau DAergique périventriculaire ventral (A14), les aires pré-optiques médiales et les noyaux supra chiasmatiques. Ce système est constitué de projections courtes qui ne s'étendent pas au-delà de la région diencéphalique, et serait impliqué dans le contrôle de la sécrétion des hormones hypophysaires (Björklund et al. 1975; Watabe-Uchida et al. 2012). En effet, les projections DAergiques de ce système participeraient au blocage de la sécrétion des

gonadotrophines et de l'hormone thyroïdostimuline au niveau de l'hypophyse (Brown et al. 2008; Klein et al. 2019). Les neurones DAergiques de l'hypothalamus dorsal (A11) projettent également au niveau d'autres régions comme les néocortex, le noyau dorsal du Raphé (DRN), et vers la périphérie via le funiculus dorsolatéral (Holstege et al. 1996; Peyron et al. 1996). Ils seraient impliqués dans diverses fonctions comprenant les changements de perception d'informations sensorielles ascendantes ou la promotion de l'activité cardiovasculaire et sympathique (Holstege et al. 1996; Peyron et al. 1996; Clemens et al. 2006). En effet, la perte des neurones du noyau A11 entraîne une désinhibition des entrées sensorielles et favorise l'apparition de sensations viscérales et/ou musculaires, et serait donc également impliquée dans le syndrome des jambes sans repos (Clemens et al. 2006).

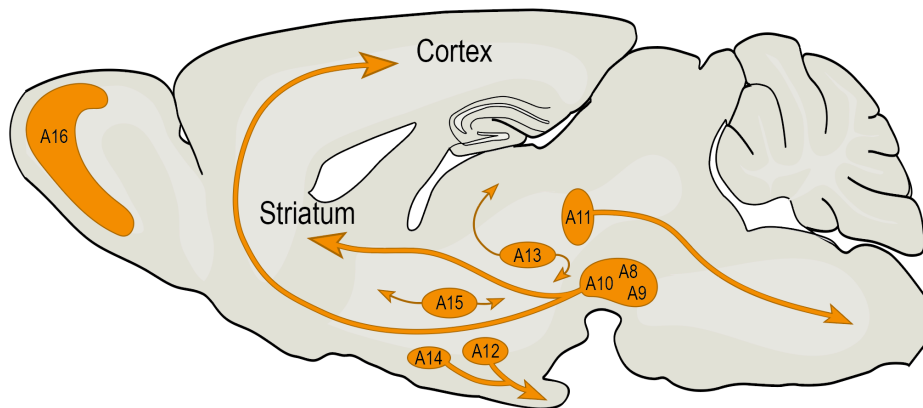


Figure 2.2 : Anatomie des voies dopaminergiques | A8 : aire rétro rubrale, A9 : substance noire *pars compacta* (SNc), A10 : aire tegmentale ventrale (VTA), A11 : hypothalamus dorsal, A12 : noyau arqué de l'hypothalamus, A13 : hypothalamus dorsal, A14 : noyau périventriculaire, A15 : hypothalamus ventral, A16 : bulbe olfactif. Les principales voies DAergiques sont la voie nigrostriatale (A9 vers le striatum), la voie mésocorticolimbique (A10 passant par le striatum ventral en direction des cortex), et la voie tubéroinfundibulaire (A12 vers l'hypophyse).

3. La VTA

La VTA est une structure mésencéphalique hétérogène constituée d'un ensemble de cinq sous-noyaux, à savoir : le noyau parabrachial pigmenté (PBP), le noyau paranigral (PN), le noyau caudal linéaire (CLi), le noyau rostral linéaire (RLi), et le noyau interfasciculaire (IF) (voir **Figure 2.3**). Les deux premiers sont localisés de manière latérale et ventrale et présentent la plus forte proportion de neurones DAergiques, tandis que les trois suivants, localisés de manière médiale, contiennent une plus faible proportion de neurones

DAergiques. La VTA est composée de trois grandes sous-populations de neurones : les neurones DAergiques, les neurones GABAergiques (qui libère du GABA) et les neurones glutamatergiques. Chaque sous-population de neurone constitue elle-même un ensemble hétérogène de par les types de récepteurs, de transporteurs, et d'enzymes exprimés ainsi que par les régions de projection.

Les neurones DAergiques représentent 60 % des neurones de la VTA, et peuvent être identifiés grâce à des critères électrophysiologiques (voir **Chapitre 2.4**), ainsi que par l'expression d'une des enzymes participant à la synthèse de la DA : la TH. Ces neurones, principalement localisés au niveau des noyaux PBP et PN, forment des sous-populations distinctes en fonction des régions vers lesquelles ils projettent. En effet, le développement de traceurs rétrogrades a permis de mettre en évidence l'existence de sous-réseaux spatialement organisés au niveau l'axe médiolatéral, au sein de la VTA (Riddle et al. 1995; Lammel et al. 2008). La VTA serait ainsi constituée de cinq sous-populations principales : 1) la population projetant vers le PFC localisée de manière médiale, 2) la population projetant vers l'amygdale (Amg) située dans la partie médio-dorsale de la VTA, 3) la population projetant vers le NAc shell médial (NAcMed) localisée de manière médio-ventrale, 4) la population projetant vers le NAc shell latéral (NAcLat), située dans la partie la plus latérale de la VTA, 5) la population projetant vers le NAc core localisée dans la même région que la sous-population projetant vers le NAcMed, mais de manière plus ventrale (Lammel et al. 2008, 2011; Roeper 2013; Beier et al. 2015). Il est également intéressant de noter que ces neurones projettent de manière quasi-exclusive vers une région, avec un nombre très restreint de neurones projetant sur plusieurs régions à la fois (Lammel et al. 2008). De plus, l'utilisation d'une nouvelle technique de cartographie a permis de montrer que près de la moitié des afférences reçues par la VTA, de manière générale, proviendrait de structures anatomiques proches, difficiles à mettre en évidence jusqu'alors (Beier 2022). En effet, outre les afférences longue distance en provenance du NAc, du cortex, de la LHb, de l'Amygdale centrale (CeA) ou de l'hypothalamus, la VTA recevrait également des afférences locales en provenance de la SNc, de la substance noire réticulée, du PPTg, du LDTg, du noyau médian du raphé (MnR), de l'IPN, et de la substance grise périaqueducule (PAG). Il existerait également une très forte interconnectivité au sein même de la VTA entre les neurones DAergiques (Beier 2022).

La VTA est également constituée de 30 % de neurones GABAergiques (i.e. libérant de l'acide γ -amino-butérique, GABA) formant une sous-population hétérogène, majoritairement concentrés au niveau du PBP et du PN (Taylor et al. 2014). En effet, ils peuvent exprimer

différents types de marqueurs comme la parvalbumine, la calrétinine, la calbindine ou la cholecystokinine (Olson and Nestler 2007; Merrill et al. 2015; Morales and Margolis 2017). Les neurones GABAergiques de la VTA reçoivent des afférences excitatrices en provenance des colliculi supérieurs, du PFC, de la LHb, et inhibitrices provenant majoritairement du NAc (Morales and Margolis 2017). Plusieurs structures vont également envoyer les deux types d'afférences (excitatrice et inhibitrice) sur les neurones GABAergiques de la VTA comme la PAG, le BNST (noyau basal de la strie terminale), le raphé dorsal (DRN), ou l'hypothalamus latéral (LH). Par ailleurs, les neurones GABAergiques peuvent être des interneurons locaux ou des neurones de projection (Morales and Margolis 2017). Les interneurons GABAergiques projettent principalement au niveau des dendrites proximales des neurones DAergiques et seraient couplés entre eux par des jonctions gap (Allison et al. 2006). Cette caractéristique leur permettrait ainsi de synchroniser de manière rapide leur contrôle inhibiteur sur les neurones DAergiques (Omelchenko and Sesack 2009; Bouarab et al. 2019). Finalement, les neurones GABAergiques de projection enverraient des afférences réciproques au niveau de la LHb, du PFC, du NAc, du DRN, du BNST et de la PAG, mais également des afférences non-réciproques avec le VP (Morales and Margolis 2017; Bouarab et al. 2019).

Les neurones glutamatergiques constituent le dernier type de neurones présents au niveau de la VTA et représentent moins de 10 % de la totalité des neurones. Ils sont majoritairement situés dans la partie la plus médiale de la VTA, principalement dans l'IF, le RLi et le CLi où les neurones DAergiques sont moins présents (Morales and Margolis 2017). Ils peuvent projeter de manière locale sur les neurones, DAergiques ou non, ainsi que dans des structures plus éloignées comme le NAc, le PFC, la LHb, l'Amg et le VP (Dobi et al. 2010; Hnasko et al. 2012).

La VTA est également constituée de populations de neurones capables de co-libérer plusieurs types de neurotransmetteurs (Morales and Margolis 2017). Il existerait ainsi une sous-population co-libérant du GABA et du glutamate qui projette vers l'habenula latérale (LHb) et le VP, une sous-population co-libérant du GABA et de la DA projetant sur les neurones épineux moyens (MSN) du NAc, et une sous-population co-libérant de la DA et du glutamate projetant au niveau des MSN et des neurones cholinergiques du NAc, ainsi qu'au niveau du cortex préfrontal médian (mPFC) et du VP. L'observation des neurones hybrides co-libérant de la DA et du glutamate a permis de mettre en évidence l'existence de micro domaines axonaux spécialisés dans la synthèse et libération d'un type de neurotransmetteur. Ainsi les terminaisons axonales glutamatergiques forment des synapses excitatrices asymétriques permettant une signalisation rapide, tandis que les

terminaisons axonales DAergiques adjacentes participent majoritairement à une transmission volumique plus lente (Zhang et al. 2015; Morales and Margolis 2017).

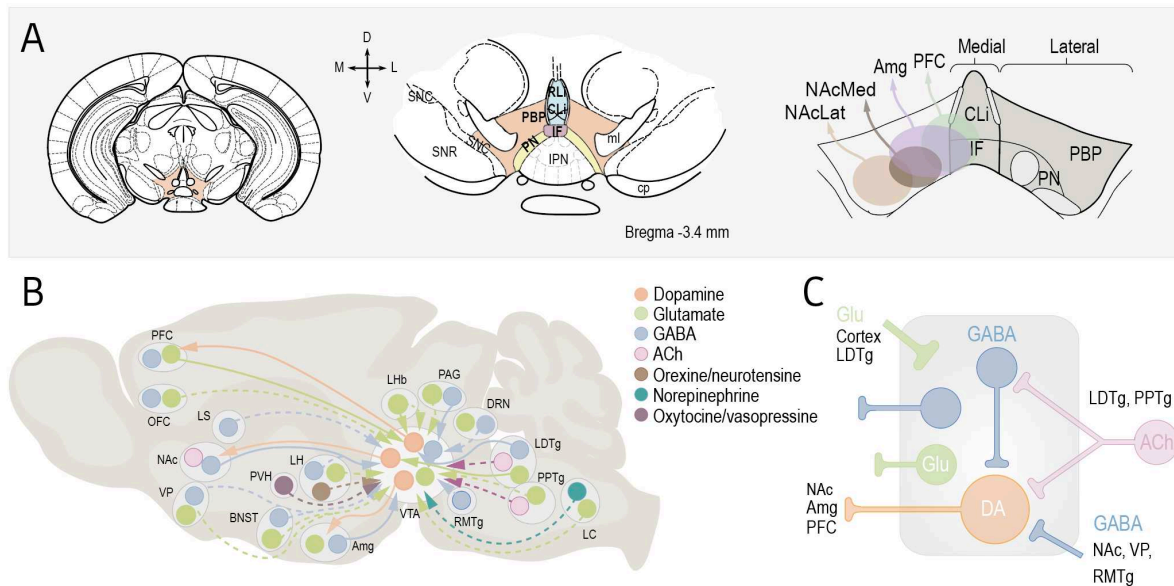


Figure 2.3 : Anatomie de la VTA et ses afférences | A. (Gauche) Localisation de la VTA en orange sur une coupe coronale de cerveau. (Milieu) Localisation des différents noyaux de la VTA. (Droite) Représentation de l'organisation des sous-populations DAergiques de la VTA selon leur région de projection. **B.** Schéma des différentes afférences de la VTA et de leur nature. 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 pédonculopontin ; LDTg : noyau tegmental latérodorsal ; LC : locus cœruleus ; DRN : noyau dorsal du raphé ; PAG : substance grise périaqueducale ; Lhb : habénula latérale. **C.** Représentation schématique des différents types de neurones retrouvés au sein de la VTA. *Adapté de Watabe-Uchida et al. 2012; Zhang et al. 2015; Beier et al. 2015; Dautan et al. 2016; Morales and Margolis 2017.*

4. Activités des neurones dopaminergiques

Les premiers travaux sur l'activité des neurones DAergiques, réalisés dans les années quatre-vingt chez le rat *in vivo*, ont permis de concevoir une caractérisation électrophysiologique dont les paramètres déterminés alors sont toujours utilisés à l'heure actuelle (Grace and Bunney 1980, 1984a, b). Ces paramètres comprennent la localisation du neurone par ses coordonnées stéréotaxiques (dans notre cas la VTA) et le profil d'activité électrophysiologique du neurone, qui repose sur plusieurs critères, à savoir :

- La forme du potentiel d'action (PA). Celui-ci est large et suivi d'une longue phase d'hyperpolarisation (AHP).
- La durée du PA. Comprise entre le seuil de déclenchement du PA et la phase d'hyperpolarisation, elle doit être supérieure à 1,1 ms.
- La fréquence de décharge du neurone. Celle-ci doit être tonique, régulière et comprise entre 1 et 10 Hz.

Il existe deux types principaux d'activité des neurones DAergiques de la VTA, régulière et en bouffées.

L'activité régulière ou *pacemaker* constitue pour la plupart des neurones DAergiques le mode d'activité basal (voir **Figure 2.4**). Elle est caractérisée par la régularité de la fréquence de décharge, avec un espacement entre deux PA (ou *inter-spike interval* ISI) dont la distribution se rapproche d'une loi normale, dont la médiane se trouve autour de 200 et 250 ms (Grace and Bunney 1984a). Dans le cadre de cette activité, le PA est décomposé en trois phases, et débute par une lente dépolarisation du potentiel de membrane. Cette phase est suivie par le déclenchement du PA et se termine par une phase d'hyperpolarisation. L'induction et le maintien de cette activité sont régulés par un ensemble de conductances à la fois sodiques, potassiques et calciques (Shi 2009). La dépolarisation membranaire induit une augmentation de l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants jusqu'au seuil de déclenchement du PA, permettant le recrutement d'un maximum de canaux sodiques voltage-dépendants. Cette dépolarisation induit une ouverture différée de canaux potassiques voltage-dépendants qui, associée à l'inactivation des canaux sodiques, permet une repolarisation membranaire. La genèse du PA induit également une activation de canaux calciques voltage-dépendants de type L et P/Q impliqués dans la phase de dépolarisation du PA, mais également de canaux calciques de type T. Ces derniers sont impliqués à la fois dans la phase de dépolarisation et de repolarisation, et permettent l'activation de canaux potassiques SK. L'activation de ces canaux est à l'origine de la phase d'hyperpolarisation du neurone (Grace and Bunney 1984a; Shi 2009). Cette hyperpolarisation membranaire active finalement les canaux HCN (Protéine-canal activé par l'hyperpolarisation modulé par les nucléotides cycliques) permettant ainsi l'entrée d'un courant I_h à l'origine de la repolarisation membranaire jusqu'au seuil du prochain PA (Shi 2009). La rythmicité de l'activité DAergique serait également liée aux canaux potassiques voltage-dépendant de type A. En effet, ces canaux seraient activés lorsque la membrane est dépolarisée suite à son hyperpolarisation, et induiraient un courant potassique I_A sortant, permettant d'augmenter l'intervalle entre deux PA, et donc de ralentir la fréquence de décharge (Shi 2009). Ce type d'activité des neurones DAergiques est à l'origine d'une

libération tonique de DA (~ min – heure). En effet, l'asynchronie de l'activité de décharge des neurones DAergiques permet le maintien d'une concentration relativement faible et stable de DA dans le temps, activant ainsi préférentiellement les récepteurs D2 (Schultz 2002; Floresco et al. 2003).

Le second type d'activité DAergique, plus irrégulier et dit en bouffées ou *burstant*, est caractérisé par l'émission de PA sous forme de bouffées (ou *bursts*) (voir **Figure 2.4**) (Grace and Bunney 1984b). Ces bouffées sont constituées de 2 à 10 PA, et caractérisées par un ISI inférieur à 80 ms en début de bouffée et supérieur à 160 ms en fin de bouffée. Aussi, l'amplitude des PA décroît tout au long de la bouffée. La fin d'une bouffée est marquée par une pause dans l'activité du neurone. L'absence de ce patron de décharge *ex vivo* suggère le rôle crucial des afférences des neurones DAergiques dans la mise en place de cette activité en bouffées (Shi 2009). Différents types de récepteurs semblent être mis en jeu dans l'expression de ce type de décharge. En effet, l'application de NMDA, à la fois *in vivo* et *ex vivo*, permettrait un important influx calcique dans le neurone, qui serait nécessaire à la genèse des bouffées de PA (Grace and Bunney 1984b; Floresco et al. 2003). D'autres canaux tels que les canaux SK semblent également importants dans l'émission de bouffées de PA, leur inhibition permettant une augmentation de la décharge sous forme de bouffées (Soden et al. 2013). De la même manière, l'infusion d'antagonistes des récepteurs GABA_A permettrait d'augmenter de nombre de bouffées de PA, suggérant ainsi le rôle d'une désinhibition des neurones DAergiques via les récepteurs GABA_A dans la formation de *burst* (Paladini and Tepper 1999). Les afférences cholinergiques de la VTA jouent également un rôle important dans la modulation de l'activité des neurones DAergiques, qui sera détaillée dans le **Chapitre 2.5**. Finalement l'activité en *burst* permet une libération phasique de DA. La synchronisation de l'activité en bouffées d'une population de neurones DAergiques permettrait ainsi une libération massive et transitoire (~ 10 à 100 ms) de DA, qui serait importante dans l'encodage de stimuli saillants (Schultz et al. 1997; Schultz 2006).

Ces deux types d'activité formeraient un continuum permettant d'identifier quatre mode de décharge différents (voir **Figure 2.4**) (Mameli-Engvall et al. 2006), à savoir : 1) les neurones ayant à la fois une fréquence de décharge et une activité en bouffée faibles (LFLB), 2) les neurones ayant une faible fréquence de décharge et une activité en bouffée importante (LFHB), 3) les neurones ayant une fréquence de décharge élevée mais une activité en bouffée faible (HFLB), 4) les neurones ayant à la fois une fréquence de décharge et une activité en bouffée élevées (HBHF).

Il existe également au niveau de la VTA une quantité non-négligeable de neurones dits « silencieux ». Le caractère silencieux de ces neurones peut être induit par leur inactivation suite à leur surexcitation, les plaçant alors dans un état de « *depolarization block* ». Les neurones peuvent également se trouver silencieux car dans un état hyperpolarisé entraînant une inhibition de leur activité. L'existence de ces neurones silencieux offre au système DAergique une grande marge de réactivité en réponse à un stimulus saillant.

Finalement, les niveaux d'éveil de l'animal enregistré vont également influencer l'activité des neurones DAergiques en modulant la fréquence de décharge ainsi que la proportion de PA au sein d'une bouffée (Mameli-Engvall et al. 2006; Tolu et al. 2013; Solié et al. 2022; Bousseynol et al. 2023).

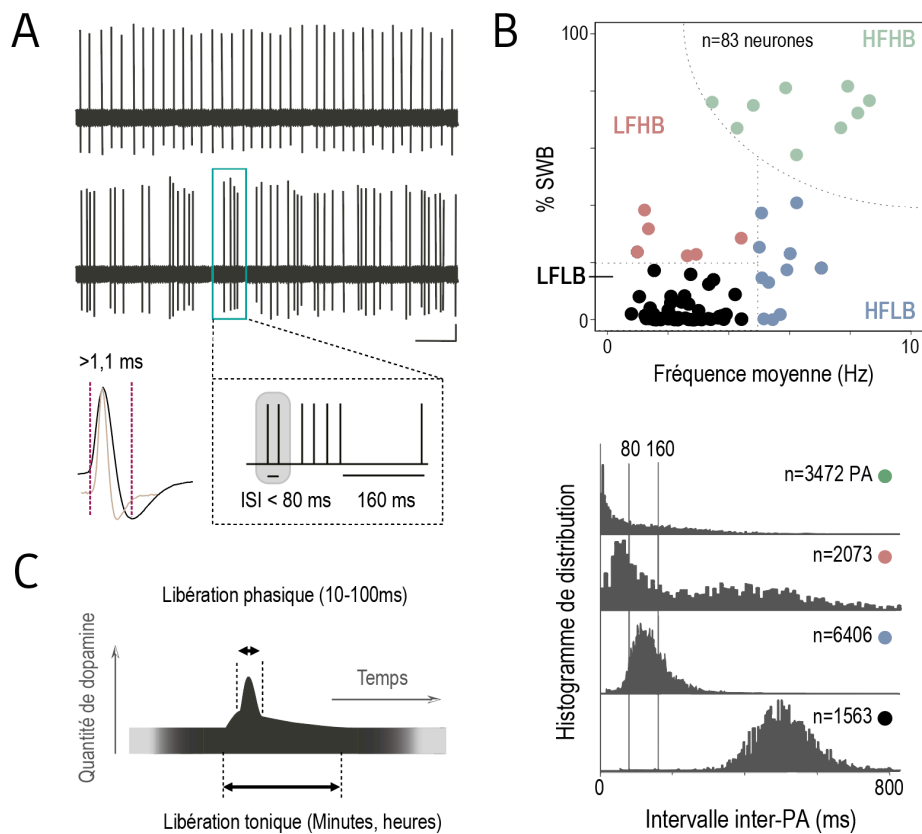


Figure 2.4 : Activité spontanée des neurones DAergiques de la VTA | A. (Haut) Trace représentative de l'activité *pacemaker* d'un neurone DAergique. (Milieu) Trace représentative de l'activité en bouffée d'un neurone. (Bas) Représentation schématique d'un PA de neurone DAergique en noir et de neurone GABAergique en gris, et critère de caractérisation d'une bouffée de PA. **B.** Représentation des différents profils d'activité spontanée des neurones DAergiques. LFLB : Low Firing Low Burst, LFHB : Low Firing High Burst, HFLB : High Firing Low Burst, HFHB : High Firing High Burst. **C.** Distribution des intervalles entre PA des différents clusters de neurones. *Adapté de Mameli-Engvall et al. 2006.*

5. Contrôle nicotinique de la VTA

La VTA reçoit de nombreuses afférences cholinergiques et expriment une grande densité de nAChR (Han et al. 2003; Baddick and Marks 2011), la plaçant sous un important contrôle nicotinique (voir **Figure 2.5**). L'utilisation de souris délétées pour certaines sous-unités des nAChR a permis de faire de nombreuses avancées dans la compréhension de la modulation nicotinique du système DAergique (Maskos et al. 2005; Mameli-Engvall et al. 2006; Exley et al. 2011; Tolu et al. 2013; Morel et al. 2014).

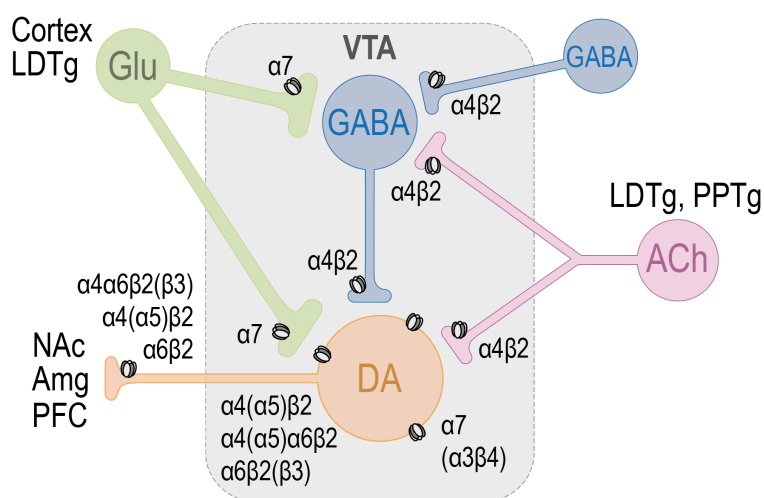


Figure 2.5 : Répartition des nAChR de la VTA | La VTA est sous contrôle nicotinique via des afférences reçues des noyaux du pont. On y trouve une large diversité de nAChR, le plus exprimé étant $\alpha4\beta2$. Adapté de Changeux 2010.

Ainsi, chez des souris délétées pour la sous-unité $\beta2$ ($\beta2$ knock-out, $\beta2^{-/-}$) on observe une altération de l'activité spontanée des neurones DAergiques (Mameli-Engvall et al. 2006; Tolu et al. 2013). Cette dernière se traduit par une diminution de la fréquence de décharge et de l'activité en bouffées chez la souris anesthésiée et une abolition de leur réponse à une injection aiguë de nicotine (Maskos et al. 2005; Tolu et al. 2013). Des expériences de réexpression de la sous-unité $\beta2$ au niveau des neurones DAergiques, GABAergiques ou des deux dans la VTA ont permis de mettre en évidence la nécessité de son expression sur les deux types de neurones pour rétablir l'activité en bouffées des neurones DAergiques (Tolu et al. 2013). L'utilisation de nouveaux outils optopharmacologiques développés par le laboratoire nous ont permis de réaliser un knock-out réversible de la sous-unité $\beta2$ des nAChR dans la VTA (Durand-de Cuttoli et al. 2018). Ainsi, le blocage de la transmission nicotinique endogène induit une diminution de la fréquence de décharge et de l'activité en bouffées des neurones DAergiques. De manière similaire, les neurones DAergiques des souris $\alpha4^{-/-}$ présentent une altération de l'activité en bouffées (Exley et al. 2011). Ces déficits sont restaurés après réexpression de la sous-unité $\alpha4$ dans la VTA, mettant en évidence le rôle de l'ACh et des récepteurs $\alpha4\beta2^*$ dans l'activité des neurones DAergiques (Exley et al. 2011; McGranahan et al. 2011). Des expériences chez les souris $\alpha6^{-/-}$ ont permis de constater

que les réponses « somatiques » des neurones DAergiques ne sont pas perturbées tandis que la libération de DA au niveau du NAc est altérée (Exley et al. 2011). Des expériences de stimulation optogénétique ont ensuite permis de mettre en évidence la localisation terminale des $\alpha 6^*$ nAChR, et leur implication dans la modulation de la libération de DA au niveau du NAc par les interneurons cholinergiques du striatum (Threlfell et al. 2012). La sous-unité $\alpha 5$, bien qu'étant une sous-unité accessoire (i.e. qui ne participe pas à la liaison de l'ACh), module certaines caractéristiques biophysiques du récepteur qui la contient, comme la perméabilité calcique et la conductance unitaire, toutes deux augmentées (Ramirez-Latorre et al. 1996). La délétion de la sous-unité $\alpha 7$ semble redistribuer les patrons de décharge en augmentant la proportion de neurones LFLB et HFHB et diminuant la proportion des phénotypes intermédiaire LFHB, HBLF par rapport à des souris de type sauvage (Mameli-Engvall et al. 2006). Finalement la délétion des sous-unités $\beta 4$ ne semble avoir que peu d'effet sur l'activité spontanée des neurones DAergiques, bien que l'on observe une hyperdopaminergie dans le NAc de souris $\beta 4^{-/-}$ (Harrington et al. 2016; Mondoloni et al. 2023).

Chapitre 3 : Afférences et efférences de la VTA

Au cours du chapitre précédent, nous avons vu que la VTA reçoit des afférences et projette au niveau de nombreuses structures (voir **Chapitre 2**). Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les afférences et efférences qui m'ont particulièrement intéressée dans ce travail de doctorat. Je vous parlerai tout d'abord des afférences cholinergiques reçues par la VTA, ainsi que du noyau interpedonculaire (voir **Chapitre 6**). Dans un second temps, après avoir rapidement présenté les efférences les plus largement décrites, je vous présenterai le claustrum, une autre structure à laquelle je me suis intéressée dans ce travail de doctorat (voir **Chapitre 7**).

1. Afférences

1. Les noyaux du pont

Comme nous l'avons vu précédemment, la VTA reçoit des afférences excitatrices de nombreuses structures. Néanmoins, la principale source d'ACh provient des afférences cholinergiques envoyées par les noyaux du pont, à savoir le LDTg et le PPTg (Mena-Segovia et al. 2008; Xiao et al. 2016; Dautan et al. 2016).

Les noyaux du pont sont des structures hétérogènes constituées d'une majorité de neurones cholinergiques, mais également de neurones glutamatergiques ainsi que de neurones GABAergiques (Jenkinson et al. 2009; Wang and Morales 2009; Benarroch 2013). Des études combinant immunohistochimie et hybridation in situ ont permis de mettre en évidence que 95% des neurones cholinergiques de ces noyaux n'expriment pas les transcrits codant pour les ARN messagers d'un transporteur du glutamate (vGluT2) et de l'enzyme de synthèse du GABA (Glutamate décarboxylase, GAD) (Wang and Morales 2009). Ces résultats suggèrent ainsi une faible probabilité de co-libération d'ACh avec du glutamate ou du GABA. Des expériences de traçage antérograde et rétrograde ont permis de mettre en évidence les différentes régions de projection et d'afférences des noyaux du pont (Cornwall et al. 1990; Semba and Fibiger 1992). Ainsi, les noyaux du pont reçoivent des afférences des cortex frontaux, de l'hypothalamus, de la LHB, de l'IPN, du mésencéphale et des aires préoptiques. Ces derniers projettent au niveau du thalamus, de l'hypothalamus, du septum latéral, de la LHB, des colliculi supérieurs, du mésencéphale, du cervelet, des cortex infralimbique et cingulaire, et des ganglions de la base. Bien que le PPTg et le LDTg partagent certaines caractéristiques chimiques et certaines connexions, ils se différencient cependant au

niveau des circuits fonctionnels auxquels ils contribuent. En effet, le PPTg est principalement connecté à des structures sensorimotrices et associatives, tandis que le LDTg est principalement connecté à des structures limbiques (Cornwall et al. 1990; Semba and Fibiger 1992).

Dans les années quatre-vingt, des expériences de lésions de ces noyaux ont permis de mettre en évidence l'importance de ce contrôle cholinergique dans les patrons de décharge des neurones DAergiques. En effet, une inactivation du LDTg provoque une régularisation du patron de décharge des neurones DAergiques de la VTA, ainsi qu'une incapacité à décharger sous forme de bouffées de PA (Lodge and Grace 2006). A l'inverse, l'activation pharmacologique des noyaux pontins par une infusion locale de bicuculine (un antagoniste GABAergique) engendre une augmentation du mode de décharge sous la forme de bouffées de PA (Floresco et al. 2003). Des expériences d'activation optogénétique du LDTg et du PPTg ont également constaté ces modifications du patron de décharge. Ces dernières seront associées au développement d'un comportement de préférence de place conditionnée chez les souris pour le LDTg, ou à la mise en place de comportements locomoteurs pour le PPTg (Lammel et al. 2012; Xiao et al. 2016; Dautan et al. 2016). Des expériences d'électrophysiologie *ex vivo* ont permis de mettre en évidence les effets dépolarisants de l'ACh sur les neurones DAergiques mésencéphaliques (Calabresi et al. 1989). De plus, la stimulation des axones cholinergiques des noyaux du pont provoque la formation de courants postsynaptiques présentant une composante glutamatergique et cholinergique (Xiao et al. 2016). Ainsi, on retrouve au niveau de la VTA une forte densité de nAChR qui peuvent être exprimés à la fois sur les neurones DAergiques et GABAergiques de manière somatodendritique, mais également au niveau des terminaisons axonales (voir **Figure 2.5**) (Mansvelder et al. 2002; Gotti et al. 2009; Changeux 2010b; Zoli et al. 2015). Les récepteurs qui y sont le plus exprimés sont les $\alpha 4\beta 2^*$, qui peuvent être associés à $\alpha 5$ et $\alpha 6$, ainsi que les récepteurs $\alpha 7$ que l'on retrouve majoritairement de manière présynaptique et impliqués dans la modulation de la libération des neurotransmetteurs (Jones and Wonnacott 2004; Changeux 2010b; Zoli et al. 2015).

2. Le noyau interpedonculaire

Anatomie :

L'IPN est une structure mésencéphalique impaire, divisée en plusieurs sous-noyaux, à la fois selon des critères cytoarchitecturaux, et de manière subsidiaire selon l'expression de certains marqueurs moléculaires (Hemmendinger and Moore 1984; Lenn and Hamill 1984; Quina et al. 2017). Parmi ces sous-noyaux, quatre sont pairs et donc retrouvés de part et

d'autre de la ligne médiane: les dorsomédial (IPDM), les dorsolatéraux (IPDL), les intermédiaires (IPI), et les latéraux (IPL) (voir **Figure 3.1**). On retrouve également deux noyaux impairs le long de la ligne médiane, à savoir le noyau apical (IPA), le noyau rostral (IPR) et le noyau caudal (IPC) (Hemmendinger and Moore 1984). L'IPN est un noyau quasi exclusivement GABAergique composé à la fois de neurones de projection et d'interneurones. Il possède également une faible proportion de neurones glutamatergiques que l'on retrouve majoritairement au niveau de l'IPR et de l'IPC (Quina et al. 2017). L'IPN contient plusieurs sous-populations de neurones GABAergiques de projection exprimant des marqueurs moléculaires différents comme la somatostatine et la parvalbumine, toutes deux localisées au niveau de l'IPR, ainsi que des populations exprimant Amigo1 et NOS (oxyde nitrique synthase) (Hsu et al. 2013; Quina et al. 2017; Ables et al. 2017). Par ailleurs, l'une des caractéristiques les plus remarquables de cette structure est que l'on y trouve à la fois l'une des plus fortes densités d'expression de nAChR du cerveau, et l'expression d'une très grande diversité de sous-unités (Hsu et al. 2013; Shih et al. 2014; Beiranvand et al. 2014). En effet, la quasi-totalité des sous-unités nicotiniques du système nerveux centrale y sont exprimées ($\alpha 2$ - $\alpha 7$ et $\beta 2$ - $\beta 4$), notamment certaines sous-unités rares que l'on retrouve peu exprimées ailleurs dans le cerveau comme $\beta 4$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$, mais régulièrement co-exprimées dans l'IPN (Perry et al. 2002; Zoli et al. 2015). Au niveau de l'IPN, les nAChR sont majoritairement exprimés dans la région médiale, qui reçoit les afférences cholinergiques de la mHb (voir **Figure 3.1**) (Molas et al. 2017a). Ils sont localisés de manière somatodendritique sur les neurones, et sont également présents au niveau des terminaisons axonales de la mHb, pouvant ainsi permettre une facilitation de la libération de neurotransmetteurs (Grady et al. 2009).

Connectivité :

Les afférences de l'IPN ayant été les plus étudiées sont celles en provenance de la mHb (Ren et al. 2011; Soria-Gómez et al. 2015; Zhang et al. 2016). En effet, la mHb projette massivement au niveau de l'IPN et constitue sa source principale d'ACh (Frahm et al. 2015b; Molas et al. 2017a). La transmission cholinergique au niveau de l'IPN semble présenter à la fois les caractéristiques d'une transmission volumique et celles d'une transmission synaptique, et serait dépendante de l'activité de la mHb (Ren et al. 2011). En effet, la stimulation à haute fréquence des afférences cholinergiques en provenance de la mHb évoque des courants entrants lents, inhibés par l'application d'antagonistes des nAChR, suggérant dans ce cas une transmission volumique. A l'inverse, une stimulation à faible fréquence produit des potentiels postsynaptiques excitateurs (EPSC) nicotiniques rapides, caractéristiques d'une transmission synaptique (Ren et al. 2011; Soria-Gómez et al. 2015;

Zhang et al. 2016). L'ACh, une fois libérée, peut agir à la fois en postsynaptique au niveau des neurones en induisant leur dépolarisation, mais également en présynaptique via les récepteurs $\alpha 3\beta 4^*$ permettant une facilitation de sa propre libération (Grady et al. 2009), ainsi que de celle du glutamate (Ren et al. 2011), neurotransmetteur co-libéré au niveau de l'IPN (Ren et al. 2011; Frahm et al. 2015b). Outre ces afférences cholinergiques et glutamatergiques, la mHb envoie également des projections à l'origine de la libération de substance P au niveau de l'IPL (voir **Figure 3.1**) (Frahm et al. 2015b; Molas et al. 2017b). Récemment, plusieurs études utilisant des techniques de traçage antérograde chez des souris DAT-Cre ont mis en lumière des projections DAergiques au niveau de l'IPN, en provenance de la VTA, ainsi que l'expression du récepteur D1 au niveau de l'IPN (Molas et al. 2017a; DeGroot et al. 2020). Des expériences en tranches *ex vivo* ont également permis de mettre en évidence une libération endogène de DA en réponse à une stimulation pharmacologique, au niveau de l'IPN, via l'utilisation de senseur de la DA (DeGroot et al. 2020). Ces résultats sont cependant controversés, et un grand nombre d'études soutiennent une absence de connexion DAergique directe de la VTA vers l'IPN (Aransay et al. 2015; Beier et al. 2015; Nasirova et al. 2021). Par ailleurs, l'IPN reçoit des projections du *nucleus incertus* et du LDTg, ainsi que du raphé (Quina et al. 2017; Bueno et al. 2019).

L'IPN envoie des projections au niveau de différentes structures et notamment deux centres neuromodulateurs, à savoir les noyaux cholinergiques du pont (au niveau du LDTg et du tegmentum dorsal, DTg), et les noyaux sérotoninergiques du raphé dorsal et médian (voir **Figure 3.1**) (Hsu et al. 2013; Lima et al. 2017; Quina et al. 2017; Wolfman et al. 2018; Molas et al. 2024). Le LDTg et le DRN projetant au niveau de la VTA, il est possible que l'IPN puisse exercer une modulation indirecte de celle-ci, par le biais de ses projections vers le LDTg et le raphé (Morales and Margolis 2017). De plus, l'IPN exerce un contrôle inhibiteur sur le *nucleus incertus*, la LHb ainsi que sur le *central midline grey of the pons* (Lima et al. 2017; Quina et al. 2017). L'utilisation de nouvelles techniques de cartographie a mis en évidence l'existence de projection de l'IPN vers la VTA médiale (Beier 2022). Finalement, outre ces projections au niveau du cerveau postérieur, certaines études ont également mis en évidence l'existence de projections de l'IPN, plus particulièrement l'IPA, vers des structures antérieures comme l'hippocampe et le septum. Cependant, de récentes études anatomiques ont remis en cause ces projections, qui seraient en fait un prolongement du raphé médian (Shibata and Suzuki 1984; Groenewegen et al. 1986; Quina et al. 2017).

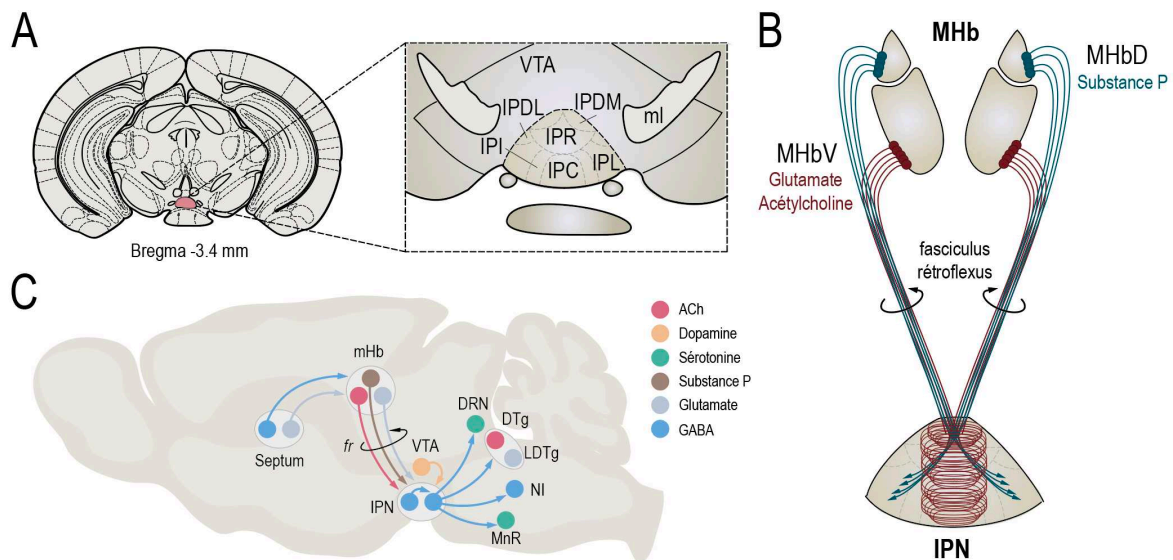


Figure 3.1 : Anatomie et projections de l'IPN | A. (Gauche) Localisation de l'IPN sur une tranche coronale. (Droite) Les sous-noyaux de l'IPN. **B.** Les neurones de la mHb ventrale libèrent de l'ACh et du glutamate au niveau de l'IPN médian, tandis que les neurones de la mHb dorsale libèrent de la substance P au niveau de l'IPL. **C.** Afférences et efférences de l'IPN. mHb : habénula médiale, fr : fasciculus rétroflexus, VTA : aire tegmentale ventrale, IPN : noyau interpédonculaire, DRN : noyau dorsal du raphé, MnR : raphé médian, DTg : tegmentum dorsal, LDTg : tegmentum latérodorsal, NI : nucleus incertus. *Adapté de Molas et al. 2017.*

Rôle physiologique :

Les premiers travaux autour du rôle physiologique de l'IPN et de la voie mHb-IPN ont été réalisés par le biais de lésions des différentes parties de ce circuit (Wirtshafter 1981; Murphy et al. 1996; Vale-Martínez et al. 1997). Ils ont permis de mettre en évidence des altérations des comportements d'évitement et d'anxiété, suggérant l'importance de cette voie dans la régulation des états émotionnels négatifs. De la même manière, des études inactivant spécifiquement la mHb chez le zébrafish ou le rongeur ont constaté un déficit d'apprentissage des conditionnements de peur, ainsi que des altérations des niveaux d'anxiété (Thompson 1960; Donovick et al. 1970; Murphy et al. 1996; Agetsuma et al. 2010; Mathuru and Jesuthasan 2013). L'implication de la voie mHb-IPN dans ces comportements s'est récemment précisée via la découverte d'une signalisation glycinergique excitatrice au niveau de la mHb (Otsu et al. 2019). La glycine active des récepteurs NMDA atypiques constitués des sous-unités GluN1/GluN3A. Ainsi, une réduction de l'expression de ces récepteurs empêche l'acquisition d'un conditionnement aversif. Par ailleurs, des expériences de stimulation optogénétique des terminaisons de l'IPN au niveau du LDTg ont également permis l'induction d'une aversion pour le compartiment stimulé lors d'une tâche

de conditionnement de place en temps réel (Wolfman et al. 2018). En revanche, une stimulation optogénétique spécifique des neurones de l'IPN exprimant la sous-unité $\alpha 5$ n'induit une aversion pour le compartiment stimulé qu'après répétition de la tâche (Morton et al. 2018). Ces résultats suggèrent l'importance d'une activation répétée des neurones de l'IPN dans la consolidation de la mémoire aversive. La délétion des récepteurs CB₁ pour les cannabinoïdes au niveau des neurones de la mHb diminue les manifestations de comportements de peur, et l'inhibition des fibres cholinergiques de la voie mHb-IPN chez ces souris rétablit le phénotype sauvage (Soria-Gómez et al. 2015). Ainsi, les récepteurs CB₁ présynaptiques participent à la régulation de la mémoire aversive en modulant la transmission cholinergique au niveau de voie mHb-IPN.

De la même manière, une autre étude a montré que l'activation des récepteurs GABA_B présents au niveau des terminaisons cholinergiques de la mHb dans l'IPN réduit la mémoire aversive (Zhang et al. 2016). De plus, les souris délétées pour la sous-unité $\beta 4$ des nAChR, par ailleurs fortement exprimée dans l'IPN et peu dans le reste du cerveau, présentent des altérations de l'anxiété et de la mémoire de peur (Salas et al. 2003). Ces études permettent ainsi de mettre en évidence l'importance de la transmission cholinergique de la voie mHb-IPN dans l'expression des états émotionnels négatifs. Finalement, la modulation optogénétique des neurones de l'IPN ou des afférences en provenance de la mHb/VTA altère les comportements exploratoires face à un stimulus social nouveau ou familier (Molas et al. 2017b, 2024). Ces résultats suggèrent un rôle de ces différentes afférences excitatrices dans la saillance incitative associée à des informations nouvelles ou familières.

2. Efférences

1. Efférences corticolimbiques

Le nucleus accumbens :

La VTA projette au niveau de nombreuses régions (voir **Figure 3.2**), et notamment au niveau du NAc avec qui elle forme la voie mésolimbique. L'expression différentielle de marqueurs histologiques au niveau du NAc a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs sous-régions (voir **Figure 3.2**) possédant leur propre connectivité (Zahm 2000). On distingue le NAc core du NAc shell, lui-même divisé en deux sous-parties selon l'axe médiolatéral : le shell médial et latéral (Lammel et al. 2008, 2011; Roeper 2013; de Jong et al. 2022). Ces différentes sous-régions du NAc sont constituées d'une majorité de neurones épineux moyens GABAergiques (MSN, *medium spiny neurons*), mais également de deux types

d'interneurones : ceux à bas seuil de décharge (LTS, *low-threshold spiking*) et les cholinergiques (TAN, *tonically active neurons*). Les MSN du NAc exprimant le récepteur D1 forment des connexions réciproques avec la VTA selon une topographie singulière organisée sur l'axe médiolatéral (Lammel et al. 2008, 2011; Beier et al. 2015; Yang et al. 2018). Le NAc shell latéral reçoit des afférences DAergiques de la partie latérale de la VTA, et projette en retour sur celle-ci. Le NAc shell médial projette également de manière réciproque sur la sous-population médiale de la VTA, et enfin le NAc core contacte la région médiale mais plus ventrale. L'existence de ces connexions réciproques permet ainsi d'établir un rétrocontrôle inhibiteur de la modulation DAergique (Lammel et al. 2008, 2011; Xia et al. 2011; Beier et al. 2015; Yang et al. 2018). Les MSN peuvent également projeter sur les interneurones de la VTA, produisant une désinhibition des neurones DAergiques (Yang et al. 2018). Par ailleurs, le NAc reçoit des afférences excitatrices glutamatergiques de l'amygdale basolatérale (BLA), de l'hippocampe et du PFC, et projette au niveau du VP, de l'hypothalamus et des régions motrices (Floresco 2015). Sa localisation au centre du système limbique et sa connectivité avec des régions impliquées dans l'évaluation de l'environnement et de l'état émotionnel lui confèrent un rôle primordial dans l'intégration de ces informations afin d'évaluer la meilleure action pour atteindre un but. En effet, les variations de libération de DA au sein de cette région permettent de moduler son activité, ainsi que l'intégration du signal d'erreur de prédiction de récompense (RPE voir **Chapitre 4**) (Bromberg-Martin et al. 2010). Par ailleurs, les deux sous-régions du NAc seraient mises en jeu dans des fonctions différentes. Le core serait impliqué dans la sélection et l'initiation d'un comportement dirigé vers un but par l'activation des voies directe (via les MSN exprimant les récepteurs D1) ou indirecte (via les MSN exprimant les récepteurs D2) (Blais and Janak 2009; Saunders and Robinson 2012). Le shell, quant à lui, permettrait la suppression des actions inappropriées interférant avec l'objectif à atteindre, mais serait également important dans l'encodage de la composante hédonique d'une récompense (Gerfen and Surmeier 2011; Castro and Berridge 2014).

L'amygdale :

L'Amg constitue une autre région de projection de la VTA, appartenant également au système limbique. Elle se divise en un ensemble de treize sous-noyaux aux caractéristiques distinctes et impliqués dans des comportements différents, dont les plus étudiés sont ceux appartenant au complexe basolatéral (BLA) et au noyau central (CeA) (voir **Figure 3.2**) (McDonald 2003; Sah et al. 2003; Zhang et al. 2021). La BLA est majoritairement composée de neurones glutamatergiques de projection (90%) mais également d'interneurones GABAergiques, et serait considérée comme la principale entrée de l'Amg où l'information

serait traitée puis transmise à la CeA (Sah et al. 2003). Elle possède une structure de type cortical avec des cellules pyramidales épineuses (glutamatergiques) dites « principales », et des interneurones. Ces derniers expriment des marqueurs comme la parvalbumine, la somatostatine, la calbindine, la cholecystokinine, la calrétinine ou encore le neuropeptide Y, et ont des propriétés très similaires à celles des interneurones corticaux (Capogna 2014). A l'inverse, la CeA possède une structure de type striatal, est considérée comme la sortie principale de l'Amg, et est composée d'une majorité de neurones de projection GABAergiques ressemblant aux MSN décrits dans le NAc (McDonald 1982). Elle reçoit des projections d'une multitude de régions comme le thalamus, les cortex associatifs, l'insula, le DRN, et le locus cœruleus (Liu et al. 2020; Zhang et al. 2021). Elle établit également des connexions réciproques avec le PFC et la VTA et projette au niveau du NAc, de la PAG, l'hypothalamus, et le tronc cérébral. De manière générale, l'Amg est une région importante dans le traitement des émotions et dans l'élaboration des réponses comportementales appropriées en condition de peur ou d'anxiété (Everitt et al. 1991; Fernando et al. 2013). Elle jouerait un rôle primordial dans l'encodage de la valence d'un stimulus (Beyeler et al. 2016). Ainsi, la voie BLA-NAc permettrait d'encoder des valences positives, tandis que la voie BLA-CeA encoderait des valences négatives (Namburi et al. 2015; Beyeler et al. 2016). Différentes études ont mis en évidence l'importance de la signalisation DAergique au niveau de l'Amg dans les comportements liés à l'anxiété, via l'infusion locale d'agonistes ou antagonistes des récepteurs D1 (de la Mora et al. 2010). La libération phasique de DA atténuerait l'inhibition de la BLA exercée par le PFC, augmentant ainsi l'excitabilité de la BLA pour induire un comportement anxieux (de la Mora et al. 2010; Zarrindast and Khakpai 2015). L'infusion d'antagoniste des récepteurs D2 au niveau de la CeA promeut l'apparition d'un comportement de peur généralisée après conditionnement (De Bundel et al. 2016).

Le cortex préfrontal :

La VTA envoie également des afférences DAergiques au niveau du PFC (voir **Figure 3.2**). Celui-ci est structuré en six couches parallèles composées chacune de populations neuronales aux caractéristiques, afférences et efférences différentes. Il existe des connexions horizontales entre les neurones d'une même couche, mais aussi radiales verticales entre les couches, formant des « colonnes corticales ». Le cortex est constitué de deux types de cellules : les cellules pyramidales et les interneurones. Les cellules pyramidales sont glutamatergiques, possèdent une importante arborisation dendritique, un long axone et sont le principal site d'afférence, ce qui leur confère ainsi un rôle primordial dans l'intégration de l'information. Bien qu'il en existe plusieurs classes catégorisées selon la région de projection, elles ne présentent que peu de variations au niveau de leurs

propriétés électrophysiologiques intrinsèques (Markram et al. 2004; Zeng and Sanes 2017). Les interneurons inhibiteurs GABAergiques se divisent en quatre sous-classes principales dépendantes du type de marqueur exprimé: les neurones exprimant la parvalbumine (PVALB+), la somatostatine (SST+), les peptides intestinaux vaso actifs (VIP+), et ceux exprimant le récepteur 5-HT_{3A} de la sérotonine sans exprimer les VIP (Rudy et al. 2011; Kepecs and Fishell 2014; Tremblay et al. 2016). Chacune de ces sous-classes peut être divisée en sous-types aux morphologies axonales et dendritiques différentes.

Le PFC projette de manière extensive au niveau des cortex, mais également au niveau du système limbique, des ganglions de la base, du tronc cérébral et du thalamus. Le PFC constitue une région étendue, dont le rôle physiologique dépend de la sous-région impliquée, mais aussi de la région de projection. Ainsi, la partie infra-limbique (plus ventrale) sera plutôt impliquée dans le contrôle émotionnel et mnésique des comportements, tandis que la région pré limbique (plus dorsale) encodera plus particulièrement la composante motrice d'une action (Euston et al. 2012). La manipulation des niveaux de DA dans le PFC par l'infusion locale d'agoniste et d'antagoniste des récepteurs DAergiques a permis d'impliquer la DA dans la flexibilité des comportements (Floresco 2013; Ellwood et al. 2017). En effet, la diminution des niveaux de DA dans le PFC est associée à une diminution de la prise de risque dans une tâche de prise de décision, ainsi qu'à des déficits dans la discrimination d'indices. Finalement, une des caractéristiques du PFC est la présence de rythmes oscillatoires qui ont été largement impliqués dans la mémoire de travail, la prise de décision ou le contrôle cognitif, et que l'on retrouve altérés dans le cadre de certaines pathologies comme la schizophrénie (Miller and Cohen 2001; Buzsáki et al. 2013; Amarante and Laubach 2021).

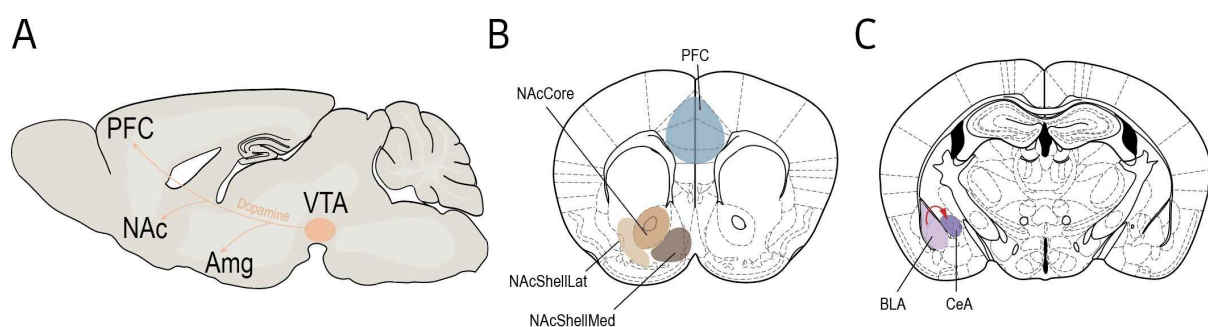


Figure 3.2 : Projections de la VTA vers les régions corticales et limbiques | A. La VTA projette vers des régions limbiques comme le NAc et l'Amg, et vers des régions corticales comme le PFC. Ces projections forment la voie mésocorticolimbique. **B.** Représentation schématique de la localisation des différents noyaux du NAc, ainsi que du PFC, en vue coronale. **C.** Représentation schématique des deux noyaux principaux de l'Amg en vue coronale.

2. Le claustrum

Le CLA est une structure qui a récemment gagné en intérêt de par sa forte connectivité avec les cortex, et sa modulation par de nombreux neuromodulateurs. Malgré l'existence de projections DAergiques en provenance de la VTA, cette voie n'a cependant été que très peu étudiée, et a été un des principaux axes de mes travaux de thèse (voir **Chapitre 7**).

Anatomie et caractéristiques biophysiques des neurones du CLA :

Le CLA est une longue structure irrégulière que l'on retrouve de manière bilatérale dans le cerveau (voir **Figure 3.3**). Il est très conservé dans le règne animal, est notamment présent chez tous les mammifères, et a été étudié sur plusieurs espèces comme le chat, le singe, les reptiles et les rongeurs (Torgerson et al. 2014; Wang et al. 2017; Zingg et al. 2018). Le CLA est une aire sous-corticale ne présentant pas de structure cytoarchitectonique particulière, composé à la fois de neurones de projection et d'interneurones inhibiteurs (Kim et al. 2016; Graf et al. 2020). Les neurones de projection se divisent en deux classes : les neurones projetant vers des régions corticales (ClaC), et les neurones projetant vers des régions sous-corticales (ClaSC) (Kim et al. 2016; White and Mathur 2018). De manière générale, ces neurones de projection ne forment que rarement des contacts synaptiques les uns avec les autres et seraient donc peu susceptibles de participer à l'intégration des signaux au sein du CLA (Kim et al. 2016).

Outre des régions de projection différentes, ces neurones diffèrent au niveau de leurs caractéristiques électrophysiologiques intrinsèques (voir **Figure 3.3**) (Graf et al. 2020; Wong et al. 2021). La différence principale réside dans l'adaptation de la fréquence de décharge qui se trouve plus élevée pour les neurones ClaC que pour les neurones ClaSC. De plus, les neurones ClaC présentent généralement un doublé de PA en début de stimulation, absent pour les neurones ClaSC. Bien qu'il existe une différence marquée au niveau des caractéristiques électrophysiologiques de ces neurones, la population ClaC est également hétérogène et peut être divisée en quatre sous-types, toujours selon leurs caractéristiques électrophysiologiques. Cette population présente un doublé de PA initial, une dépolarisation après le PA, et une adaptation de la fréquence de décharge de manière plus ou moins prononcée, ainsi qu'une adaptation biphasique de l'amplitude des PA (Graf et al. 2020). La présence de doublé de PA en début de décharge est une caractéristique électrophysiologique qui pourrait avoir des conséquences importantes dans l'encodage des informations par les neurones ClaC (Graf et al. 2020). En effet, un double PA peut induire une facilitation se manifestant par une augmentation transitoire de la probabilité de

libération au niveau de l'élément présynaptique (Lisman 1997), introduisant par la même occasion des non-linéarités dans la transmission vers les structures cibles. Par exemple, pour deux neurones recevant des entrées synaptiques de régions différentes, le neurone présentant des doublés de PA aura une plus forte probabilité de transmettre de larges potentiels postsynaptiques par rapport à un neurone encodant l'information de manière plus linéaire (Graf et al. 2020). Cette caractéristique pourrait notamment s'avérer être un mécanisme utile dans la capacité à différencier des stimuli pertinents ou non (Mathur 2014; Remedios et al. 2014; Goll et al. 2015; Graf et al. 2020). Par ailleurs, l'adaptation de l'amplitude des PA générés par les neurones ClaSC au cours d'une stimulation répétitive pourrait induire une diminution de la capacité de ces neurones à exciter leurs cibles postsynaptiques au cours du temps (Katz and Miledi 1967; Graf et al. 2020).

Les interneurons du CLA sont généralement comparables aux interneurons corticaux. Ils présentent une expression différentielle de certains marqueurs les divisant en trois classes : les neurones PVALB+ localisés préférentiellement dans le CLA core, les neurones SST+ enrichis dans la région adjacente au CLA core, et les neurones VIP+ situés de manière plus dorsale (voir **Figure 3.3**) (Graf et al. 2020). D'un point de vue électrophysiologique, les neurones PVALB+ présentent une fréquence de décharge élevée, une faible adaptation de la fréquence de décharge ainsi qu'un potentiel membranaire de repos relativement hyperpolarisé. Ils sont fortement interconnectés entre eux par des synapses électriques et chimiques. Les neurones VIP+, quant à eux, sont les plus excitables, avec une résistance membranaire élevée, et un potentiel membranaire de repos dépolarisé. Finalement, les neurones SST+ présentent, eux, un patron de décharge régulier.

Connectivité :

Le CLA est une structure recevant des afférences de nombreux noyaux neuromodulateurs (voir **Figure 3.3**) (Zingg et al. 2018; Wong et al. 2021). En effet, l'utilisation de techniques de traçage rétrograde a permis de mettre en évidence des afférences à la fois cholinergiques et GABAergiques en provenance du télencéphale basal, bien que les afférences cholinergiques exerceraient un contrôle dominant sur le CLA (Zingg et al. 2018; Atlan et al. 2018; Narikiyo et al. 2020). L'utilisation de lignée Egr2-Cre (un marqueur génétique enrichi dans les neurones du CLA) a également permis de mettre en évidence ces projections cholinergiques du télencéphale basal, en provenance plus particulièrement de la *substantia innominata* (Zingg et al. 2018; Atlan et al. 2018). Par ailleurs, des études ont montré une expression particulièrement élevée des sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 7$ des nAChR, ainsi que des mAChR M4 chez la souris (Han et al. 2003; Gong et al. 2003). Des expériences d'activation

optogénétique des axones cholinergiques au niveau du CLA ont montré des effets différents selon le type de neurone contacté : les neurones ClaC sont inhibés tandis que les neurones ClaSC et VIP+ sont excités (Nair et al. 2023).

De nombreuses études de traçages ont également permis d'observer des afférences DAergiques au niveau du CLA en provenance de la VTA et la SNc (Lindvall et al. 1978; Aransay et al. 2015; Zingg et al. 2018; Terem et al. 2020). Des expériences utilisant des radioligands et des expériences d'hybridation *in situ* ont quantifié les niveaux d'expression des récepteurs D1 et D2 (Savasta et al. 1986; Dawson et al. 1986; Wamsley et al. 1989; Camps et al. 1990; Terem et al. 2020). Alors que les différentes études s'accordent sur l'expression des récepteurs D1 dans des quantités modérées à élevées, les résultats pour les récepteurs D2 sont disparates, certains indiquant une expression élevée, et d'autres très faible (Wamsley et al. 1989; Weiner and Brann 1989; Camps et al. 1990; Terem et al. 2020). La modulation DAergique du CLA s'appuierait néanmoins davantage sur les récepteurs D1 que D2. Par ailleurs, l'expression des autres récepteurs DAergiques a été pour le moment peu investiguée, mais certaines études rapportent d'ores et déjà une absence des récepteurs D5 et une détection des récepteurs D3 et D4 (Meador-Woodruff et al. 1992; Borroto-Escuela and Fuxe 2020). De manière surprenante, malgré une expression plus importante des récepteurs D1, une étude chez le chat a mis en évidence un effet inhibiteur de la DA au niveau du CLA, sans toutefois identifier les types de neurones et les récepteurs exprimés (Salerno et al. 1981).

Le CLA est également une région dans laquelle on retrouve une expression très importante des récepteurs à la sérotonine, et notamment la densité la plus forte de récepteurs 5-HT_{2A} dans tout le cerveau (Vertes 1991; Pompeiano et al. 1994; Wright et al. 1995; Zingg et al. 2018; Narikiyo et al. 2020). Des enregistrements en patch-clamp sur cellules entières ont permis de mettre en évidence les effets de la sérotonine. Ainsi, son application produit un effet inhibiteur prolongé sur les neurones de projection du CLA, et des effets variés sur les interneurones. Dans l'ensemble, la sérotonine tend à diminuer la sortie du CLA (Wong et al. 2021). Il est intéressant de noter que les fibres sérotoninergiques claustrales, qui proviendraient préférentiellement du DRN dorsal et rostral, seraient distinctes des fibres projetant vers les cortex, et contacteraient à la fois les neurones de projection ainsi que les interneurones inhibiteurs (Rahman and Baizer 2007; Wong et al. 2021).

Outre ces afférences neuromodulatrices, le CLA recevrait également des projections de la BLA, de l'hippocampe ventral, du thalamus ainsi que certaines régions corticales telles que

le PFC médial ou le cortex cingulaire (Zingg et al. 2018; Wong et al. 2021). Bien que le CLA reçoive de fortes afférences en provenance du cortex, celui-ci y projette de manière extensive et donc réciproque, plus particulièrement au niveau des régions préfrontale (mPFC, cortex orbital), cingulaire, hippocampique, rétrospléniale, entorhinale et temporale. Il projetterait également, mais dans une moindre mesure, au niveau de structures sous-corticales comme la BLA, le thalamus et l'habénula (Wong et al. 2021).

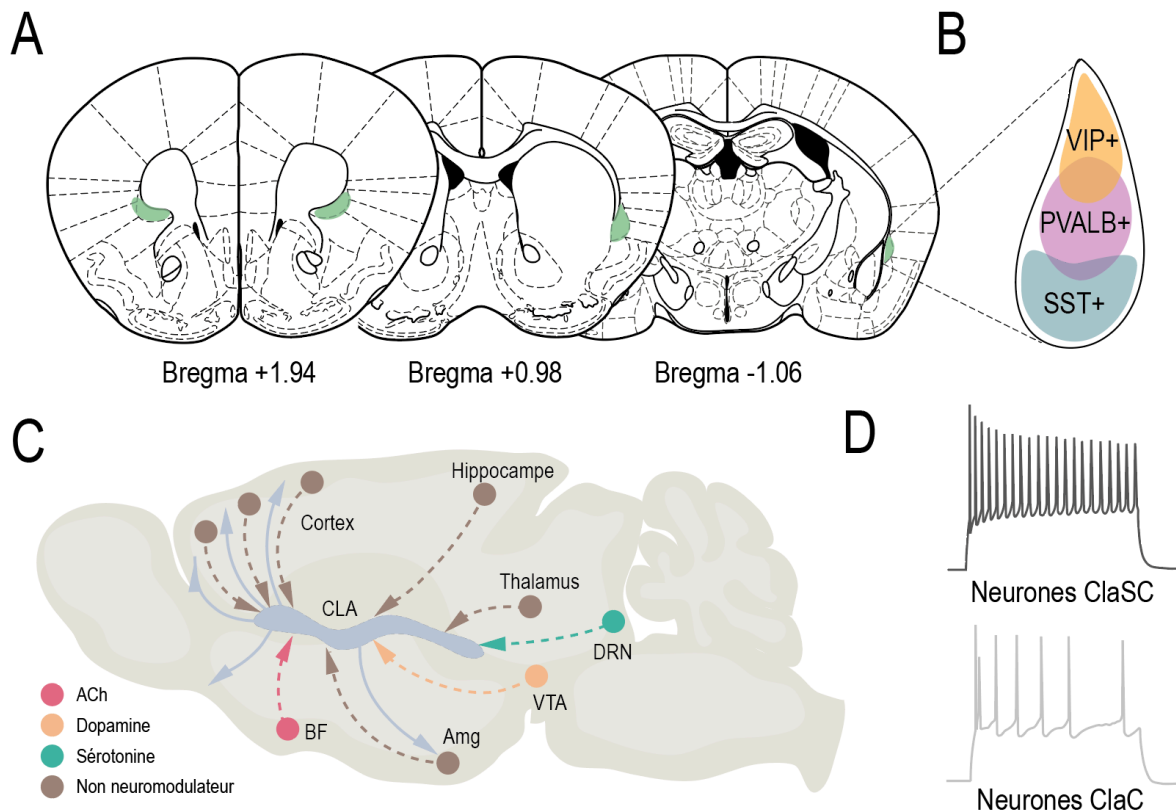


Figure 3.3 : Neuroanatomie et connectivité du CLA | **A.** Localisation du CLA en coupe coronale le long de l'axe antéro-postérieur. **B.** Le CLA est composé de neurones de projection ainsi que d'interneurones topographiquement organisés selon l'axe dorsoventral. **C.** Le CLA reçoit des afférences de nombreuses structures et notamment DAergiques de la VTA, sérotoninergiques du DRN, cholinergiques du BF, et projette de manière réciproque au niveau des cortex. **D.** Les neurones du CLA présentent des caractéristiques électrophysiologiques très différentes : les neurones ClaSC présentent une faible adaptation de la fréquence de décharge, mais une adaptation de l'amplitude des PA. Les neurones ClaC présentent un doublé de PA initial, une adaptation de la fréquence de décharge, et une adaptation biphasique de l'amplitude des PA. Le PA est également suivi d'une dépolarisation.

Rôle physiologique :

Malgré la précocité de sa description anatomique, les fonctions physiologiques du CLA restent peu étudiées, de par les difficultés expérimentales rencontrées pour le cibler de

manière fiable. Récemment, l'avènement des techniques de ciblage moléculaire a permis de faire des avancées considérables concernant les fonctions dans lesquelles le CLA serait impliqué (Jackson et al. 2020; Wong et al. 2021). Ainsi, le CLA serait important dans différentes fonctions cognitives supérieures comme l'attention (Mathur 2014; Atlan et al. 2018), la saillance (Smith et al. 2019; Terem et al. 2020), la conscience (Crick and Koch 2005; Koubeissi et al. 2014) ou le sommeil (Norimoto et al. 2020; Narikiyo et al. 2020), fonctions qui dépendraient de différents types de neuromodulation du CLA (Wong et al. 2021).

Saillance : L'implication de l'activité DAergique dans les processus motivationnels, dans l'encodage de récompenses et plus largement de la saillance, a été largement décrite et se trouve de nos jours bien établie (Schultz et al. 1997; Coddington and Dudman 2018). Cependant, la participation du CLA dans des processus d'évaluation de la saillance reste peu étudiée jusqu'à récemment. En effet, une étude s'est intéressée au rôle des neurones du CLA exprimant le récepteur D1 dans la saillance incitative au cours d'une tâche de préférence de place conditionnée (CPP) à la cocaïne (Terem et al. 2020). Les auteurs observent que l'exposition à la cocaïne induit une augmentation du nombre de cellules activées dans le CLA, et que l'inhibition des neurones du CLA exprimant les récepteurs D1 durant le conditionnement empêchait l'acquisition de la CPP. De la même manière, la stimulation optogénétique des neurones exprimant les récepteurs D1 du CLA lors d'une tâche de CPP induit une préférence de place pour le compartiment stimulé. Ces mêmes expériences ont été réalisées en ciblant les neurones du CLA qui expriment les récepteurs D1 et projettent vers le cortex frontal. L'obtention des mêmes résultats suggère ainsi, que l'activité de cette population serait nécessaire et suffisante dans l'acquisition d'une CPP et donc importante dans les processus de saillance incitative.

Attention : Plusieurs études convergent vers l'importance du CLA dans l'attention. En effet, son inactivation dans des tâches d'attention altère les performances des souris, les rendant plus sensibles aux distracteurs environnementaux (Atlan et al. 2018; Fodoulian et al. 2020). De récentes études proposent une implication du contrôle cholinergique du CLA dans les processus attentionnels. En effet, Nair et collaborateurs observent une modulation cholinergique différentielle des sous-populations du CLA projetant vers des régions corticales ou sous-corticales. Ces différences de modulation cholinergique permettraient de moduler le gain (i.e. modifier les propriétés entrées-sorties de neurones) des sous-populations, et agiraient comme un agent permissif (Polack et al. 2013; Nair et al. 2023). Ainsi, dans un état attentif où les niveaux d'ACh sont élevés, le gain est en faveur des neurones Clac qui pourront inhiber le cortex. Dans un état non-attentif avec un niveau bas

d'ACh, le gain bascule vers les neurones ClaSC, empêchant ainsi les neurones ClaC d'exercer leur contrôle inhibiteur sur le cortex (Wong et al. 2021; Nair et al. 2023). Le contrôle cholinergique jouerait ainsi un rôle d'interrupteur permettant d'agir sur l'efficacité des voies : si les niveaux d'ACh sont bas, la voie ClaSC est plus efficace, l'élévation des niveaux d'ACh permet de permuter vers une augmentation de l'efficacité de la voie ClaC (Wong et al. 2021; Nair et al. 2023).

Sommeil : Le CLA a également été particulièrement étudié pour son implication dans les différents états cérébraux et notamment le sommeil (Norimoto et al. 2020; Narikiyo et al. 2020). En effet, des expériences de lésion du CLA chez le *pogona vitticeps* (un reptile) ont mis en évidence l'importance de l'activité du CLA dans la production de *sharp wave ripples* pendant le sommeil lent. Cette activité s'est également révélée sensible à plusieurs neuromodulateurs, puisqu'une application de carbachol (un agoniste cholinergique) ou de sérotonine en tranche de cerveau induirait leur inhibition (Norimoto et al. 2020). De plus, une stimulation optogénétique du CLA génère des ondes lentes de manière généralisée dans le néocortex. Aussi, le CLA jouerait un rôle crucial dans la synchronisation de l'activité des interneurons inhibiteurs corticaux, et participerait donc à la coordination des ondes lentes durant le sommeil (Narikiyo et al. 2020).

Conscience : Le CLA a été proposé comme étant le « siège de la conscience », suite à des expériences de stimulation électrique de la structure (Crick and Koch 2005). En effet, ces stimulations induisent des périodes de sommeil, des périodes durant lesquelles les animaux ne répondent plus à des stimulations extérieures, ainsi qu'une augmentation de la profondeur d'une anesthésie (Gabor and Peele 1964; Pavel et al. 2019). Le CLA serait également une cible privilégiée des drogues psychédéliques connues pour leur capacité à modifier les états de conscience (Martin and Nichols 2016). Leur effet serait assuré par leur action sur les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} que l'on retrouve avec les plus fortes densités d'expression cérébrale au niveau du CLA. Finalement, l'implication du CLA dans le sommeil et dans la perturbation de l'état de conscience laisse suggérer son importance dans les différents états cérébraux.

Chapitre 4 : Récompense et dopamine

Dans les chapitres précédents, je vous ai présenté les différents acteurs étudiés dans ce travail de doctorat. Je me suis notamment intéressée à la VTA, et à certaines de ses afférences et efférences, comme l'IPN et le CLA, mais aussi à son contrôle nicotinique par les noyaux du pont. La VTA est une structure centrale du circuit de la récompense. Aussi, dans ce chapitre, je vous présenterai son rôle dans l'encodage de différents types de récompenses.

1. Récompense

Pour la plupart des gens, une récompense constitue un bien matériel ou moral désirable de par sa capacité à engendrer une sensation de plaisir. En réalité, cet aspect de plaisir subjectif ne représente qu'une des multiples caractéristiques d'une récompense. Celle-ci comporte effectivement trois composantes principales: l'hédonisme, la motivation, et l'apprentissage, que je vais maintenant développer (Berridge et al. 2009).

L'hédonisme est assimilable à la sensation de plaisir issue d'une récompense et se trouve intimement lié à l'affect et l'émotionnel. D'un point de vue évolutif, cette recherche de récompense, et donc de plaisir, oriente les décisions d'un individu pour lui permettre d'augmenter ses chances de survie et de reproduction. En effet, une récompense peut constituer une réponse à un décalage entre un état physiologique souhaité et l'état réel, aussi connu sous le nom d'homéostasie. Ces récompenses, dites végétatives, répondent à des besoins comme boire ou manger, et nécessitent l'existence de deux systèmes: le premier capable de surveiller les déficits physiologiques, et donc de détecter les variations homéostasiques, et le second supportant la mise en œuvre de comportements permettant de revenir dans une fenêtre de consigne voulue (Keramati and Gutkin 2014). Outre cet aspect homéostatique, un individu peut également fournir des efforts pour obtenir une récompense ne répondant pas à un besoin physiologique, comme par exemple lorsque l'on continue de manger malgré le fait d'être arrivé à satiété. Cet exemple met en avant l'existence d'une sensation de plaisir ne nécessitant pas la présence d'un besoin physiologique. Finalement, une récompense peut procurer un plaisir subjectif conscient, mais peut également avoir un impact hédonique inné mesurable par l'évaluation de réactions objectives affectives comme des expressions faciales (par exemple une protrusion de la langue en réponse au goût sucré) (Berridge and Robinson 2003; Berridge 2004; Berridge et al. 2009).

Une seconde caractéristique des récompenses correspond à la motivation. Cette composante motivationnelle plutôt qu'affective, permet de transformer des informations sensorielles liées à une récompense en éléments attrayants favorisant l'approche de la récompense, ou le travail pour son obtention. Ainsi, la motivation peut être considérée comme les mécanismes qui permettent de convertir l'attente d'une récompense en une action comportementale. Cette caractéristique motivationnelle peut-être incitative, relevant plutôt d'un apprentissage associatif, ou liée à un désir cognitif impliquant des objectifs clairement définis ou des attentes explicites concernant des résultats futurs. Ces deux types de motivation seraient respectivement sous-tendus par des circuits plutôt sous-corticaux et mésolimbiques pour le premier, et corticaux pour le second (Berridge and Robinson 2003). Dans le cadre de la saillance incitative, la motivation peut être induite soit par un stimulus ayant une valence incitative innée (stimulus inconditionné), soit par un stimulus conditionné par apprentissage associatif (Berridge and Robinson 2003; Berridge et al. 2009; Pessiglione 2014).

La dernière caractéristique d'une récompense correspond à l'apprentissage. Cet apprentissage peut être lié à des indices locaux, ou issu d'inférences rationnelles nécessitant la compréhension des conséquences d'une action (Berridge and Robinson 2003; Berridge et al. 2009). L'apprentissage associatif, qui nécessite des connaissances sur les relations entre les stimuli et les actions, a été démontré grâce à la célèbre expérience d'Yvan Pavlov, médecin et physiologiste russe, sur l'étude du réflexe de salivation chez un chien lors de la présentation de nourriture (voir **Figure 4.1**) (Pavlov 1932, 1957). Le chien se voit présenter des boulettes de viande, et se met à saliver à la vision de celles-ci. La salivation est ici une réaction innée et constitue une réponse non conditionnée. Dans un second temps, un son de cloche constituant un stimulus neutre est délivré avant présentation de boulettes de viande. Après avoir répété l'expérience à plusieurs reprises, le chien fini par saliver au son de la cloche, et ce même si les boulettes ne lui sont ensuite pas présentées. C'est ce que Pavlov appellera conditionnement classique répondant, et que l'on appelle à présent conditionnement pavlovien. Dans ce cas, l'appariement répété d'un stimulus conditionné avec un résultat, conduit à une représentation du résultat évoqué par le stimulus conditionné et provoque une réaction comportementale (Schultz 2006; Pessiglione 2014). Il existe un autre type de conditionnement, dit instrumental ou opérant qui nécessite que le sujet exécute une action comportementale pour obtenir une récompense. Ce type de conditionnement défini par Edward Thorndike a été particulièrement étudié grâce à une expérience mise au point par Burrhus Frederic Skinner. L'expérience, chez le rat, se base sur l'utilisation d'une boîte opérante, constituée d'un levier

permettant de délivrer la nourriture, d'indices visuels et sonores, et d'un plancher électrifié. Les rats apprennent à appuyer sur le levier après présentation de différents types de stimuli visuels ou sonores, dans le but d'obtenir une récompense (Skinner 1953). Ce type de conditionnement va augmenter la fréquence des comportements qui sont suivis d'une récompense, permettant ainsi de renforcer le lien entre un stimulus et son résultat. Ainsi, après apprentissage, les signaux prédictifs de récompense déclencheront la motivation de l'individu pour obtenir les récompenses. Ces travaux permettront d'étudier l'apprentissage par renforcement, l'impact de punitions sur cet apprentissage, et fera également apparaître la nécessité de contingence temporelle entre l'exécution d'une réponse comportementale et l'obtention de la récompense (Schultz 2006; Pessiglione 2014).

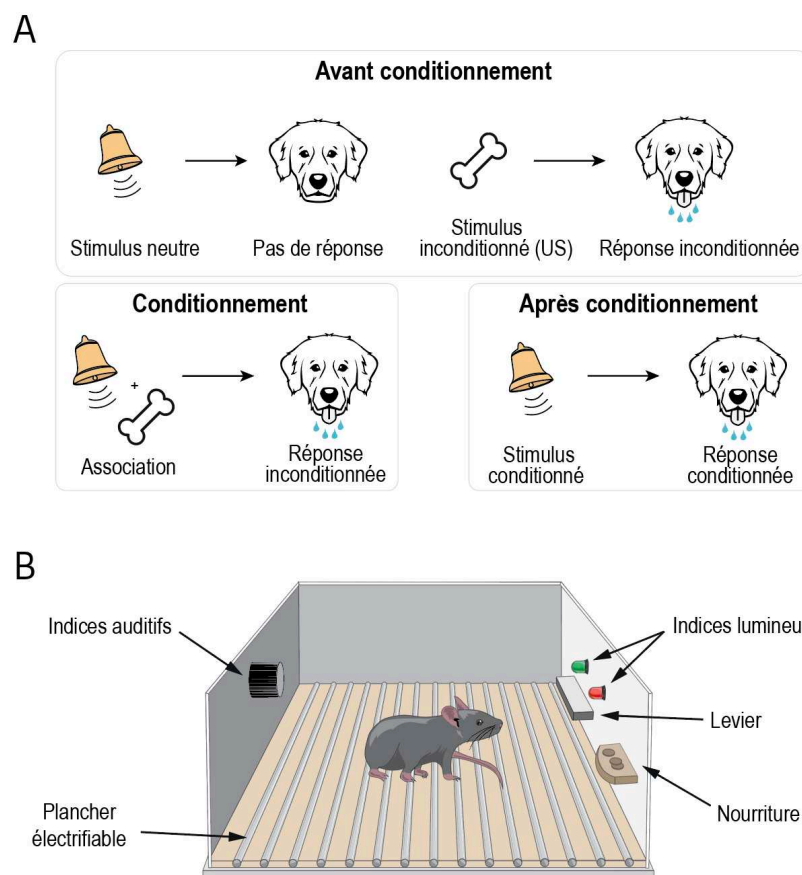


Figure 4.1 : Différents types de conditionnement | A. Conditionnement Pavlovien : expérience présentant un apprentissage associatif entre un stimulus inconditionné et donc neutre (ici la cloche), et une réponse comportementale (salivation). Après apprentissage, la réponse comportementale a lieu au moment de la présentation du stimulus conditionné. **B.** Représentation schématique d'une cage opérante de Skinner. De nombreuses variantes de cette expérience sont possibles en modifiant le type de récompense (naturelle comme de la nourriture ou artificielle comme des drogues ou des stimulations optogénétiques), la nature des indices (visuels ou sonores), l'utilisation ou non de punition (ici le plancher électrifié).

Certains stimuli peuvent être récompensant de manière innée ; c'est ce que l'on appelle les récompenses primaires comme la nourriture ou les interactions sociales (voir **Chapitre 4.4**) (Pessiglione 2014). Il existe également des récompenses qualifiées de secondaires, issues d'un apprentissage associatif (et donc acquises), telles que l'argent, les défis, les éloges, le pouvoir, la beauté visuelle et acoustique (Schultz 2006), et sur lesquels je ne m'attarderai pas plus.

2. Activité dopaminergique et renforcement

La découverte du système de la récompense et la compréhension de son mode de fonctionnement se sont appuyées sur différents travaux, notamment ceux de James Olds et Peter Milner dans les années cinquante. En effet, leurs études ont permis de découvrir plusieurs structures cérébrales impliquées dans la construction de représentations positives ou négatives de stimuli, et d'en réaliser la cartographie (Olds and Milner 1954). Pour se faire, ils procèdent à l'implantation d'électrodes de stimulation chez le rat, au niveau de différentes structures cérébrales, et placent ensuite les animaux dans une cage de Skinner, dans laquelle l'appui sur un levier induit une stimulation électrique de la région implantée. Ces expériences leur permettront ainsi de découvrir plusieurs régions cérébrales dont la stimulation présente des propriétés suffisamment renforçantes ou aversives pour induire un apprentissage associatif. De cette manière, Olds identifie plusieurs structures dont la stimulation produit un renforcement positif, comme l'hypothalamus, le thalamus, le septum, ou le faisceau médian du télencéphale (MFB). Des expériences de lésions de ces structures permettront par la suite de mettre en évidence l'existence de connexions entre ces régions, formant ainsi un circuit appelé « circuit de la récompense ». Des études immunohistochimiques et pharmacologiques ont également permis de faire des avancées concernant l'identification de la nature des neurotransmetteurs impliqués dans le renforcement. En effet, l'identification du MFB comme un faisceau de fibres en provenance de la VTA et projetant notamment vers le NAc, ainsi que l'infusion d'antagonistes de la DA au cours des expériences de stimulation du MFB, mèneront notamment à l'identification de la DA comme le neurotransmetteur principal du circuit de la récompense (Olds 1956; Crow 1972; Phillips et al. 1989; Wise 2005).

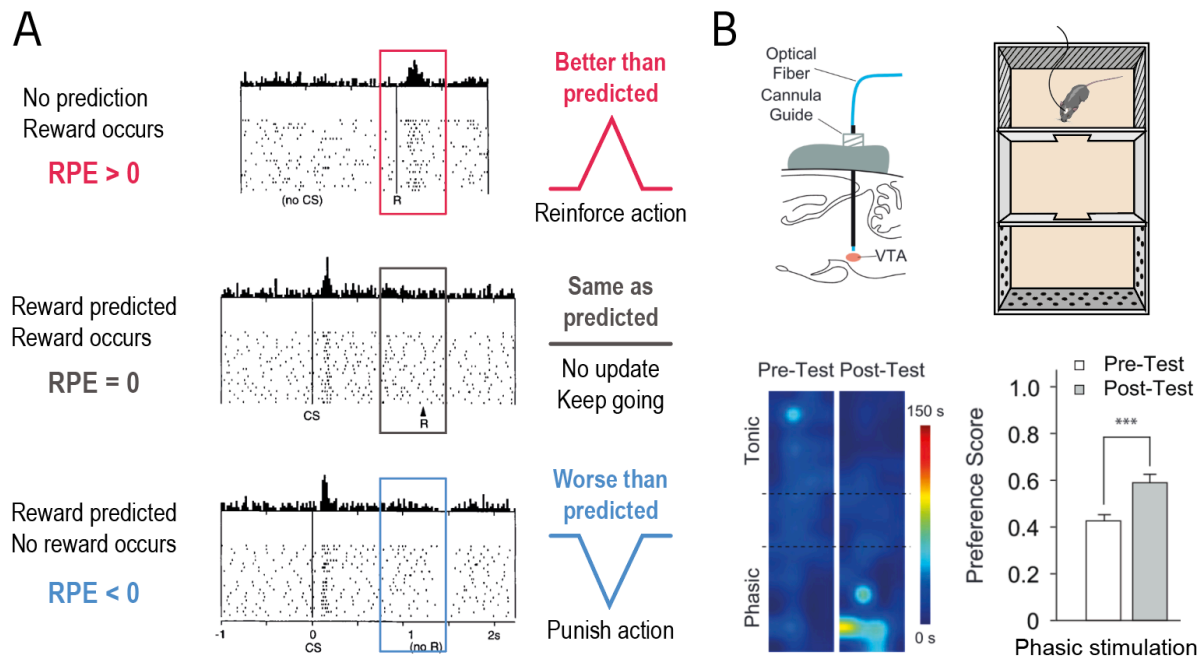


Figure 4.2 : Neurones DAergiques et renforcement | A. Exemple de l'activité d'un neurone DAergique à différentes étapes du conditionnement. Chaque point correspond à un potentiel d'action et chaque ligne correspond à un essai (rasterplot). (Haut) Avant apprentissage, la récompense induit un pic d'activité des neurones DAergiques. La récompense est inattendue, et la RPE positive. (Milieu) Après apprentissage, le stimulus conditionné prédit l'obtention de la récompense, celle-ci est donc attendue et la RPE est égale à 0. (Bas) Si le stimulus conditionné est affiché, mais que le récompense n'est pas délivrée, l'activité des neurones diminue. Le singe reçoit moins que ce à quoi il s'attendait et la RPE est négative. **B.** Expérience de manipulation optogénétique de l'activité des neurones DAergiques de la VTA. (Haut) Représentation schématique du dispositif implanté à gauche, et de l'appareil utilisé pour la préférence de place à droite. (Bas) La stimulation phasique des neurones DAergiques de la VTA (50 Hz) induit une préférence pour le compartiment associé à la stimulation. *Adapté de Schultz et al. 1997; Tsai et al. 2009; Bromberg-Martin et al. 2010.*

A la suite de ces découvertes, de nouvelles expériences d'enregistrement de l'activité électrophysiologique des neurones DAergiques du mésencéphale ont permis de mieux comprendre leur rôle dans l'encodage des récompenses. Ces expériences, réalisées chez le singe éveillé, consistent en une tâche de conditionnement pavlovien classique (voir **Figure 4.2**) (Schultz et al. 1997). Au début de l'expérience, une récompense (une goutte de jus de fruit) est délivrée de manière imprédictible, et sa consommation induit une activation phasique des neurones DAergiques. Un stimulus prédictif de la récompense (un stimulus lumineux) est ensuite introduit. De manière surprenante, après répétition de cette association, l'activité des neurones DAergiques est décalée du moment de l'obtention de la récompense à celui de l'indice prédictif. Ce décalage du pic d'activité des neurones

DAergiques s'accompagne également d'un transfert du relargage phasique de DA dans le NAc (Day et al. 2007; Hart et al. 2014). Au cours d'une troisième condition, l'indice prédictif est présenté au singe, mais la récompense n'est pas délivrée. De la même manière que dans les précédentes conditions, l'activité des neurones DAergiques augmente au moment de la présentation de l'indice lumineux. Cependant, l'absence de récompense induit une diminution de la fréquence de décharge des neurones en dessous de leur activité basale. Ces expériences permettent de mettre en évidence une caractéristique particulière des neurones DAergiques, à savoir l'encodage d'un écart entre la valeur attendue d'une récompense et la valeur réelle obtenue ; c'est ce que l'on appelle l'erreur de prédiction de récompense (RPE) (Schultz et al. 1997). Ainsi, si la récompense obtenue est meilleure que la prédiction, la RPE est positive. Si la récompense obtenue est telle que prédite, la RPE est nulle. Et enfin si la récompense obtenue est moins bien que la prédiction, la RPE est négative. Bien que l'encodage de la RPE soit largement admis, le rôle de l'élévation de l'activité des neurones DAergiques au moment de la prédiction de la récompense pourrait à la fois constituer un signal d'apprentissage ou refléter une composante motivationnelle de l'essai en cours (Bousseyrol et al. 2023). La valeur de ce signal d'erreur permettrait ainsi de moduler la force d'association entre un stimulus prédictif et une réponse : si la RPE est positive, l'association est renforcée, si celle-ci est négative, c'est l'inverse (Sutton and Barto 1998; Montague et al. 2004). D'autre part, la RPE promeut la création d'une échelle interne de valeurs attendues qui permet de construire des préférences subjectives utilisées par la suite lors de la prise de décision (Schultz 2006, 2015; Glimcher 2009). Des expériences de manipulation optogénétique ont confirmé l'implication de l'activité en bouffées des neurones DAergiques, et de la libération phasique de DA dans le NAc, dans le renforcement (voir **Figure 4.2**) (Tsai et al. 2009). En effet, l'activation spécifique des neurones DAergiques de la VTA lors d'une tâche de préférence de place conditionnée induit une préférence pour le compartiment stimulé. L'ensemble de ces expériences a donc permis de mettre en évidence l'existence d'un système de la récompense qui permet, grâce à l'encodage d'un signal d'erreur de prédiction de nature DAergique, la modulation des comportements de renforcement.

3. Dopamine et prise de décision

Les travaux sur le circuit de la récompense, et plus particulièrement la découverte de l'encodage de la RPE, ont été largement appliqués à l'étude de la prise de décision. L'équipe de Schultz s'est par exemple intéressée à l'encodage de la valeur des récompenses par les neurones DAergiques, en modulant la quantité et la probabilité d'obtention de récompenses dans la même tâche d'apprentissage associatif que précédemment (voir **Chapitre 4.2**)

(Tobler et al. 2005). Les résultats de ces expériences suggèrent l'existence d'un encodage de la quantité de la récompense, de sa probabilité d'obtention, et donc de la valeur de la récompense à travers la RPE (Tobler et al. 2005). Ainsi, la RPE soutient la création d'une échelle interne de valeurs attendues, qui permet de construire des préférences subjectives sur lesquelles un choix se base (Schultz 2006, 2015; Glimcher 2009). La prise de décision peut se découper en plusieurs processus incluant : l'évaluation des options, leur comparaison, la sélection de l'une d'entre elles et enfin l'ajustement des futures décisions en fonction des conséquences de cette décision (Ernst and Paulus 2005; Rangel et al. 2008). La valeur d'une récompense peut être modulée par différents paramètres comme sa nature, sa quantité, le délai temporel permettant son obtention, l'incertitude vis-à-vis de son obtention, le coût associé à l'action menant à la récompense ou encore la satiété et l'ennui liés à cette récompense (Yu and Dayan 2005; Ernst and Paulus 2005; Rangel et al. 2008; Heilbronner et al. 2010). La représentation de ces différents paramètres est elle-même issue de l'expérience de l'individu (voir un film au cinéma peut être mieux que le voir chez soi), ses croyances (un vin plus coûteux est meilleur qu'un vin moins cher) ou son état interne (comme le niveau de satiété au moment du choix). Par ailleurs, l'évaluation des options nécessite également l'appréciation des conséquences liées à ces différentes alternatives, qui se voient attribuer deux grandeurs : une probabilité de vraisemblance de cette conséquence, et une valence (Pessiglione 2014). Suite à l'évaluation de leurs valeurs et de leurs conséquences, les différentes options sont ensuite comparées. Il est intéressant de noter que cette confrontation des valeurs de plusieurs options se déroule malgré la grande diversité de leurs dimensions (par exemple choisir entre aller au restaurant ou aller faire du sport) (Schultz 2006; Kable and Glimcher 2009). La prise de décision consisterait alors à choisir l'option pour laquelle le produit des valeurs et des probabilités des conséquences est maximal (Schultz 2006; Pessiglione 2014). La comparaison des valeurs est également pondérée par différents types de stratégies. La stratégie visant à systématiquement maximiser la récompense obtenue est qualifiée d'exploitation, tandis qu'une stratégie exploratoire intégrera une plus grande variabilité dans les choix. Utiliser efficacement les ressources déjà identifiées et accessibles dans son environnement à moindre coût peut être considéré comme une stratégie optimale. Néanmoins, dans un environnement naturel, la capacité à explorer d'autres ressources est une adaptation essentielle (Cohen et al. 2007). L'équilibre entre ces deux comportements constitue une thématique centrale dans l'étude de la prise de décision. Finalement, une fois la décision effectuée, ses conséquences sont évaluées et comparées à ce qui avait été initialement anticipé. Ce processus d'évaluation constitue un élément essentiel dans la mise à jour des valeurs attribuées à différentes options, permettant ainsi de mieux adapter ses décisions à venir (Ernst and Paulus 2005; Pessiglione 2014).

4. Les récompenses primaires

Comme nous l'avons vu précédemment, les récompenses primaires correspondent aux stimuli possédant un caractère récompensant dès la naissance. Dans cette partie, je parlerai des récompenses primaires qui m'ont intéressée durant ce travail de doctorat, à savoir la nourriture (voir **Chapitre 8**) et les interactions sociales (voir **Chapitre 7 et 8**).

1. La nourriture

La nourriture est une récompense primaire qui répond généralement à des besoins physiologiques, au même titre que l'eau. L'accès à ces récompenses, nécessaires à la survie, peut être limité et donc participer à déterminer leur valeur motivationnelle. Outre l'accès à ces ressources, différents facteurs peuvent influencer notre réaction à des signaux alimentaires. En effet, la valeur d'une récompense alimentaire peut varier en fonction de l'état métabolique d'un individu : quand nous avons faim, la nourriture est très attrayante, tandis que lorsque nous sommes arrivés à satiété, sa valeur motivationnelle diminue (Cabanac 1971). Cette fluctuation s'expliquerait par l'existence d'interactions bilatérales entre les systèmes neuronaux et les systèmes impliqués dans le maintien de l'homéostasie, permettant ainsi à l'état métabolique (privation ou satiété) d'affecter le désir et le plaisir de se nourrir (Berthoud 2011). Les signaux métaboliques sont capables de moduler des fonctions cognitives supérieures notamment grâce aux variations des taux circulants de leptine et de ghréline (Berthoud 2002). Par exemple, la prise de décision peut être impactée par la sensation de faim et induire une augmentation de la prise de risque (Symmonds et al. 2010). Les fonctions cognitives et les informations sur les récompenses peuvent également moduler l'état métabolique et influencer l'hypothalamus par le biais de structures cortico-limbiques comme l'Amg et les cortex préfrontaux (DeFalco et al. 2001; Petrovich et al. 2007; Berthoud 2011). Enfin, l'ingestion de nourriture n'est pas systématiquement poussée par des besoins métaboliques et peut être « non-homéostasique » ou « hédonique », impliquant dans ce cas des facteurs émotionnels et ou cognitifs (Berthoud 2011).

De nombreuses études se sont également attelées à l'identification des substrats neuronaux impliqués dans l'encodage de la récompense alimentaire. Ainsi, l'encodage de la composante hédonique des récompenses serait assuré par différents neurotransmetteurs comme les opioïdes, le GABA, les cannabinoïdes et l'orexine au niveau du noyau accumbens (NAc), du pallidum ventral (VP) et du tronc cérébral (Castro and Berridge 2014; Higgs 2016). L'implication de la DA dans l'encodage de la composante hédonique est plus débattue. Le

système DAergique a d'abord été considéré comme participant à la mise à jour du système interne de valeurs grâce à la RPE. Il permettrait donc la modulation de l'état motivationnel pour une récompense (Schultz et al. 1997). Cependant, de récents travaux mettent en évidence l'existence de pics de DA résiduels après apprentissage, laissant envisager un possible encodage de la composante hédonique d'une récompense par la DA, qui s'ajouterait à son rôle dans la motivation pour une récompense (Coddington et al. 2023). Outre l'état interne d'un individu, des niveaux cognitifs plus élevés peuvent également être importants dans la manière dont nous répondons à des signaux alimentaires, comme par exemple les attentes que nous pouvons avoir quant à la façon dont nous ressentirons la consommation d'un aliment.

2. Les interactions sociales

Les comportements sociaux sont exprimés par toutes les espèces animales dont la reproduction est sexuée, et sont essentiels pour la santé et la survie de l'espèce. Par exemple, des comportements sociaux exprimés avec une intensité excessive ou à un moment inapproprié peuvent impacter de manière néfaste un individu ou un groupe social. Chez l'Homme, des déficits dans les comportements sociaux sont notamment observés dans plusieurs troubles psychiatriques comme la schizophrénie, ou les troubles du spectre autistique (Häfner et al. 1995; Dawson et al. 2002; Horan and Blanchard 2003; Kleinmans et al. 2009; Webb et al. 2010). Ils peuvent être définis comme toute forme de communication et/ou d'interaction entre deux individus d'une même espèce. Ils peuvent être de nature coopérative ou compétitive et se déclinent en un large éventail de comportements différents, comme les comportements parentaux, l'accouplement ou l'agression dans des interactions de dominance (Chen and Hong 2018).

Dans le cadre de la prise de décision sociale, les informations recueillies sont dynamiques car bilatérales et impliquent plusieurs congénères prenant leurs décisions simultanément. De plus, cette prise de décision sociale peut être modulée par l'état interne et résulte des expériences sociales passées (voir **Figure 4.3**) (Anderson 2016). Cette prise de décision sociale est également largement influencée par des niveaux élevés d'incertitude résultant de l'incapacité à prédire de manière fiable la réponse comportementale de l'autre individu (Dayan 2012; Chen and Hong 2018). Sur des échelles de temps plus longues, la décision comportementale peut être modifiée de manière stable par certaines formes d'états sociaux comme la hiérarchie, se traduisant par une expression stable du rang social (Rowell 1974; Chen and Hong 2018).

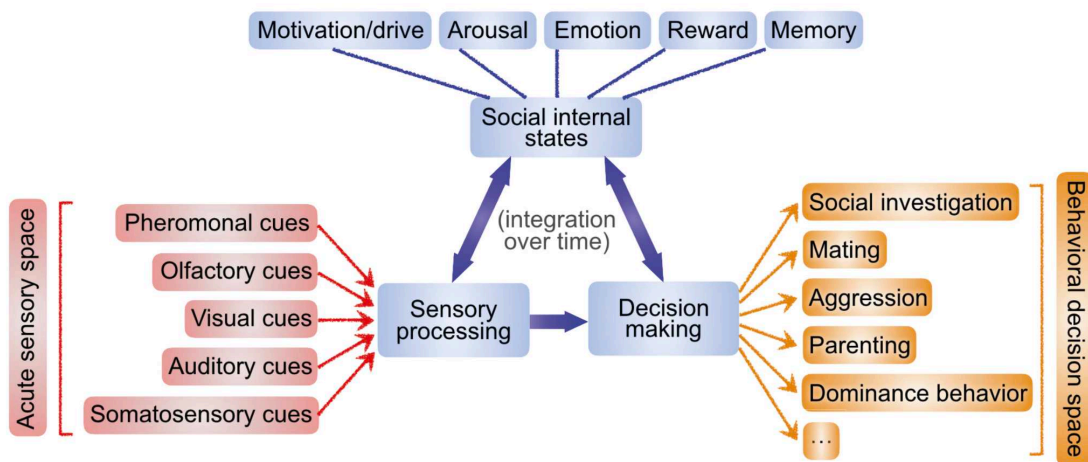


Figure 4.3 : Les différentes composantes mises en jeu lors de la prise de décision sociale | Les entrées sensorielles interagissent avec l'état interne d'un individu et sont intégrées de manière dynamique et en continu pour permettre la prise de décision sociale. *Adapté de Chen and Hong 2018.*

En accord avec les différents types d'interaction sociale existants, les substrats neuronaux des interactions sociales sont variés (Lee et al. 2014; Hong et al. 2014; Kim et al. 2015; Bariselli et al. 2018; Solié et al. 2022). L'accouplement et les comportements d'agression semblent par exemple activer à la fois des régions cérébrales distinctes, mais également des régions partagées (Hong et al. 2014). Ainsi, la stimulation à faible fréquence des neurones GABAergiques de la partie postérodorsale de l'Amg médiale induit un comportement d'accouplement, tandis que la stimulation à haute fréquence de cette même population provoque une attaque. Ces travaux suggèrent ainsi la possibilité que ces deux comportements puissent être contrôlés soit par différentes sous-populations de neurones ayant des seuils d'activation différents, soit par la quantité de neurones recrutés (Lee et al. 2014; Hong et al. 2014). Les comportements parentaux observés entre des individus adultes et juvéniles permettent la survie de ces derniers, et peuvent être dirigés soit vers les petits (toilette, nidification, couvaion, alimentation), soit vers un intrus (défense). Des expériences de lésion et d'inactivation ont permis de mettre en lumière l'importance de plusieurs régions cérébrales dans les comportements parentaux (Salzberg et al. 2002; Numan 2012), comme la PAG, mais également dans des comportements sociaux de manière générale, comme l'aire pré optique médiale de l'hypothalamus (MPOA) (Chen and Hong 2018; Mei et al. 2023).

La DA joue un rôle particulier dans l'encodage de la composante récompensante des interactions sociales. La modulation optogénétique de l'activité des neurones DAergiques

de la VTA qui projettent vers le NAc est suffisante pour moduler les interactions sociales (Gunaydin et al. 2014). De plus, les neurones DAergiques de la VTA augmentent leur activité lors d'interactions sociales, et encodent une RPE sociale, et constitueraient donc un substrat neuronal de l'apprentissage social (Gunaydin et al. 2014; Solié et al. 2022). Par ailleurs, d'autres sous-populations de neurones, comme les neurones à ocytocine du noyau para ventriculaire de l'hypothalamus (PVH), sont activés lors des interactions sociales, et la libération d'ocytocine au niveau de la VTA module l'activité des neurones projetant vers le NAc, générant ainsi une récompense sociale (Dölen et al. 2013). La préférence d'un stimulus social par rapport à un stimulus non-social, et la capacité des souris à travailler dans le but d'obtenir des interactions sociales, permettent de valider le caractère récompensant des interactions sociales (Moy et al. 2004; Solié et al. 2022).

5. Les récompenses « artificielles »

Il existe des stimuli dont le caractère récompensant est lié à une action directe du stimulus sur le système de la récompense. Ces récompenses appelées ici récompenses « artificielles » comprennent principalement les drogues d'abus. Une exposition prolongée à ces dernières, conduit à des comportements de recherche compulsifs, ainsi qu'à une perte de contrôle de la consommation. Ces comportements se manifestent malgré les conséquences néfastes sur l'organisme et au détriment d'autres activités auparavant considérées comme importantes (alimentation ou interactions sociales par exemple) (Anselme 2009). Outre les adaptations liées à une exposition prolongée aux différentes drogues d'abus, une exposition aiguë peut également court-circuiter le système de la récompense en agissant à différents niveaux sur les neurones DAergiques. Toutes les drogues d'abus induisent une augmentation de la libération de DA au niveau du NAc, mais par différents mécanismes (Di Chiara and Imperato 1988). La cocaïne va par exemple bloquer le transporteur de la DA, induisant ainsi une augmentation de la concentration de DA dans l'espace extracellulaire (Galloway 1988), tandis que les amphétamines augmentent la libération de DA par leur action sur les transporteurs VMAT2 (Fleckenstein et al. 2007). Dans le cadre de la consommation de récompenses naturelles, les signaux DAergiques évoqués par la nourriture seraient modulés par les attentes des récompenses et favoriseraient l'apprentissage, jusqu'à ce que la prédiction corresponde à la valeur réelle de la récompense, permettant ainsi une stabilité de la valeur de la récompense au cours du temps (voir **Figure 4.4**). Dans le cas des drogues d'abus, la consommation répétée de drogues induirait un renforcement des indices et actions liés à la prise de drogues à des niveaux pathologiques. D'autre part, le signal DAergique prédictif d'une récompense ne serait pas modulé par les attentes de l'individu et persisterait donc tout au long de l'apprentissage,

baisant ainsi la prise de décision en faveur de la consommation de drogues (Keiflin and Janak 2015).

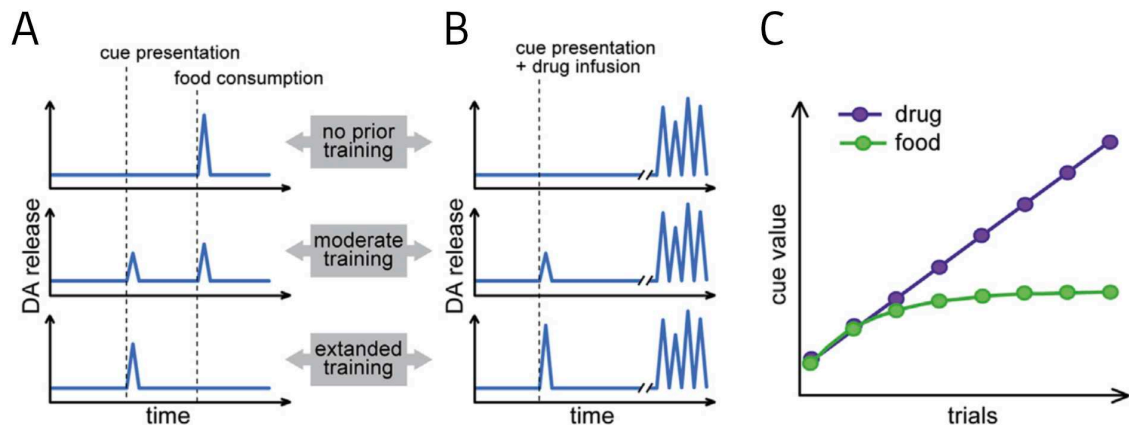


Figure 4.4 : Différences entre les signaux DAergiques phasiques liés à la nourriture ou la drogue dans le NAc| A. La consommation d’une récompense naturelle induit une libération phasique de DA dans le NAc. Au cours de l’apprentissage, le pic de libération de DA se déplace progressivement de la récompense vers l’indice prédictif de celle-ci. **B.** Dans le cas d’une drogue d’abus, l’association entre un indice et la drogue induit bien l’apparition d’un pic de libération de DA au moment de l’indice prédictif, cependant la consommation de la drogue entraîne toujours une libération de DA, même en fin d’apprentissage. **C.** Conséquence proposée sur le comportement : malgré les mises à jour, la RPE est toujours positive et induit une augmentation linéaire de la valeur attribuée à la drogue sans atteindre une représentation stable comme pour les récompenses naturelles. *Adapté de Keiflin and Janak 2015.*

Par ailleurs, il existe d’autres types de récompenses artificielles, particulièrement utilisées en laboratoire comme la stimulation électrique du MFB ou l’activation optogénétique des neurones DAergiques (Steinberg and Janak 2013; Harada et al. 2021). Celles-ci permettent de s’affranchir des effets de satiété et des effets secondaires des drogues. Elles peuvent être utilisées dans des expériences d’auto-administration à l’aide d’une cage de Skinner. Dans ce cas, l’appui sur le levier délivre une stimulation intracérébrale soit électrique soit optique, par le biais respectivement d’une électrode ou d’une fibre optique implantée dans le cerveau.

6. Interactions entre récompenses primaires et drogues d’abus

Toutes les récompenses présentées jusqu’à présent (primaires et artificielles) agissent au niveau du système de la récompense. Il est donc légitime de s’interroger sur l’existence d’interactions entre ces différents types de récompenses. Les interactions sociales sont, par exemple, susceptibles d’influencer la prise de drogues. En effet, chez l’Homme, les

interactions sociales peuvent à la fois être positives et permettre à un individu de sortir de l'addiction, ou alors négatives et constituer un stress facilitant le développement et le maintien de la consommation de drogues (Barnes and Farrell 1992; Aloise-Young and Kaeppler 2005; Venniro et al. 2018). De nombreuses études chez le rongeur ont montré l'effet de facteurs sociaux à la fois proximaux, mais aussi distaux sur la consommation de drogues (Haney et al. 1995; Covington et al. 2005; Pelloux et al. 2019). Les facteurs sociaux distaux sont ceux influençant la prise de drogue de manière non contingente à celle-ci et incluent le logement social (en groupe ou isolé), l'historique social (pro-social ou agoniste) et le statut hiérarchique de l'individu (Pelloux et al. 2019). Ainsi, l'isolement social et les interactions sociales négatives auront tous deux pour effet de prédisposer à la consommation de drogues (Haney et al. 1995; Covington et al. 2005). L'hébergement d'un individu avec un congénère expérimenté en matière de drogues prédisposera également à sa consommation (Robinson et al. 2016). Finalement, les effets du rang social sur la consommation de drogues sont quant à eux plus complexes (Pelloux et al. 2019). Les facteurs sociaux proximaux vont désigner les facteurs sociaux qui influencent la prise de drogues au moment de la consommation, et incluent le type de drogue, le partage ou non de l'expérience, et la familiarité ou non du congénère. La présence d'un congénère sobre semble avoir des effets différents sur la consommation. Ces différences pourraient dépendre de l'historique du congénère avec la drogue, un pair naïf induisant ainsi une diminution de la consommation (Smith 2012; Giorla et al. 2018). A l'inverse, la présence d'un congénère consommant également la drogue semble promouvoir les effets gratifiants de celle-ci, et augmente ainsi la consommation (Watanabe 2011, 2015). La familiarité du congénère semble aussi jouer un rôle prépondérant. En effet, la présence d'un pair inconnu et abstinente diminuera la consommation de manière plus importante que celle du compagnon de cage abstinente (Maldonado et al. 2008; Giorla et al. 2018). De la même manière que pour les facteurs distaux, dans le cas de la présence d'un congénère familier, le statut hiérarchique joue également un rôle dans le potentiel gratifiant des drogues (Giorla et al. 2018). Dans le cadre de l'addiction à la nicotine, plus précisément, des études chez l'Homme ont mis en évidence que les individus s'engagent fréquemment dans des interactions sociales lorsqu'ils fument (Piña et al. 2018). Chez le rongeur, les interactions sociales peuvent faciliter l'acquisition d'un comportement d'auto administration à la nicotine (Chen et al. 2011). Finalement, l'ensemble de ces études suggère l'importance de différents facteurs sociaux qui peuvent prédisposer à la consommation de drogue ou alors à détourner l'attention de celle-ci, le tout dépendant également du stade d'avancement de consommation de drogues de l'individu.

Une exposition prolongée aux drogues d'abus induisant des modifications des circuits à différentes échelles, celles-ci sont également susceptibles de perturber l'encodage des récompenses primaires. Aussi, l'étude de la perturbation des comportements sociaux par la nicotine a été un sujet auquel je me suis particulièrement intéressée au cours de ce travail de doctorat (voir **Chapitre 7**).

Chapitre 5 : Physiologie de la réponse à la nicotine

Ce dernier chapitre abordera un dernier axe auquel je me suis intéressée au cours de ce travail, à savoir la perturbation du circuit de la récompense par la nicotine. Je vous présenterai tout d'abord les mécanismes d'action de la nicotine suite à une exposition aiguë, puis les adaptations induites par une exposition chronique. Je vous parlerai ensuite de ses effets physiologiques parfois opposés et de leur impact sur la consommation, ainsi que de l'addiction à la nicotine. Enfin, dans une dernière partie, je vous présenterai comment le circuit mésolimbique et l'IPN participent à la physiologie de la réponse à la nicotine.

1. Action aiguë

Après inhalation, la nicotine absorbée est rapidement transportée par le sang et traverse la barrière hémato-encéphalique, lui permettant ainsi de rejoindre le cerveau et d'interagir avec différents types de nAChR. Les effets induits par la liaison de la nicotine sur les nAChR vont dépendre à la fois de la localisation des récepteurs (somatique ou axonale) mais également de la structure neuronale dans laquelle ils sont exprimés. De manière générale, la liaison de la nicotine sur les nAChR provoque l'ouverture du canal et l'entrée de cations dans la cellule, induisant une dépolarisation du neurone, elle-même à l'origine d'une augmentation de son excitabilité et donc de sa fréquence de décharge (voir **Figure 5.1**) (Pidoplichko et al. 1997; Tolu et al. 2013). L'entrée de calcium dans la cellule par les nAChR ou les canaux calciques voltage-dépendants peut recruter des kinases sensibles au calcium et entraîner différentes cascades intracellulaires qui pourront participer à l'élaboration d'une plasticité synaptique liée à la nicotine (Dajas-Bailador and Wonnacott 2004; Steiner et al. 2007; Shen and Yakel 2009; Grundey et al. 2018). L'activation somatique du neurone se traduit également au niveau axonal par une augmentation de la libération de neurotransmetteurs, qui peut être modulée par l'activation de nAChR terminaux (voir **Figure 5.1**). Contrairement à l'ACh, qui une fois libérée est rapidement dégradée par l'AChE puis recapturée au niveau de l'élément présynaptique, la nicotine est dégradée au niveau du foie. La nicotine serait donc présente en excès dans le milieu extracellulaire, stabilisant les nAChR dans un état désensibilisé (voir **Figure 5.1**) (Pidoplichko et al. 1997; Gentry et al. 2003).

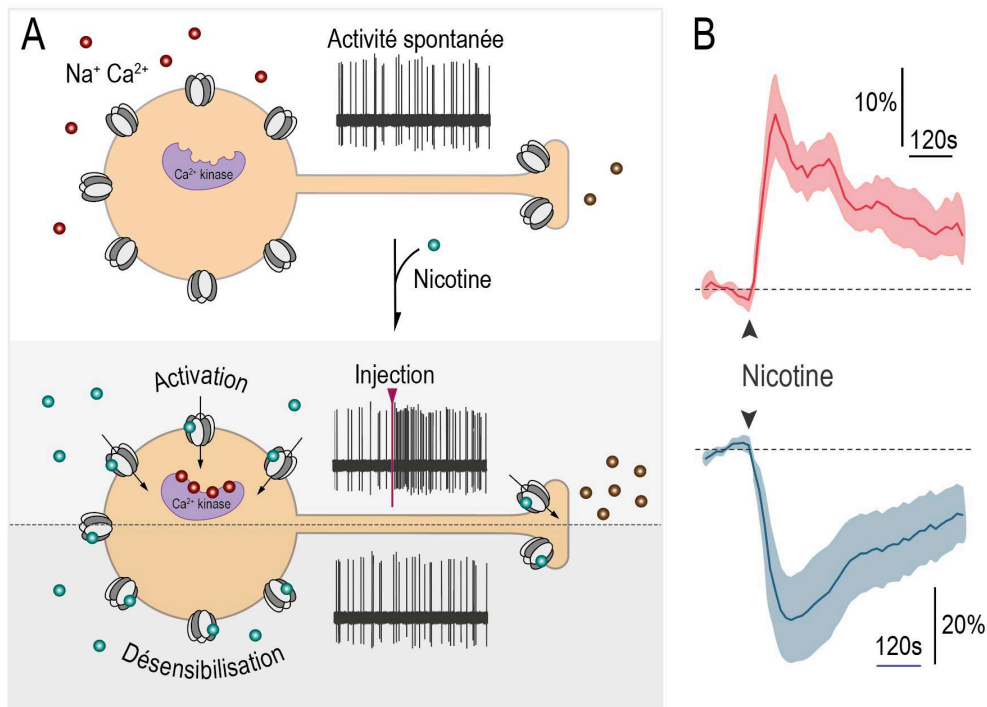


Figure 5.1 : Effets d'une exposition aiguë à la nicotine | A. (Haut) Le neurone est actif spontanément en absence de nicotine. (Milieu) La nicotine se lie à la fois aux nAChR somatiques, induisant une entrée de cations, une dépolarisation du neurone et des cascades intracellulaires calcium dépendantes, mais également aux nAChR terminaux menant à une augmentation de la libération de neurotransmetteur. (Bas) Les nAChR sont dans un état désensibilisé non-conducteur. **B.** Hétérogénéité de la réponse des neurones DAergiques de la VTA à une injection intraveineuse de nicotine: le neurone du haut est activé et celui du bas inhibé. *Adapté de Nguyen et al. 2021.*

Au niveau de la VTA, la nicotine agit sur les neurones DAergiques, mais également au niveau des neurones GABAergiques et des terminaisons glutamatergiques. En effet, l'application de nicotine *ex vivo* sur des neurones DAergiques induit des courants entrants ainsi qu'une augmentation de la fréquence de décharge (voir **Figure 5.1**), qui sont atténués après l'ajout d'antagoniste nicotinique (Pidoplichko et al. 1997; Klink et al. 2001; Zhao-Shea et al. 2011; Durand-de Cuttoli et al. 2018). L'injection intraveineuse de nicotine *in vivo* a également permis de confirmer ces résultats. En effet, les neurones DAergiques répondent par une augmentation de l'activité en bouffées qui persiste entre six et sept minutes (temps de demi-vie de la nicotine chez le rongeur Petersen et al. 1984), probablement le temps que la nicotine soit évacuée (Mameli-Engvall et al. 2006; Exley et al. 2011; Marti et al. 2011; Tolu et al. 2013). D'autre part, en présence de nicotine dans le bain, les neurones DAergiques répondent plus fortement à un puff d'ACh, malgré la désensibilisation des nAChR, suggérant ainsi une augmentation de l'excitabilité des neurones (Pidoplichko et al. 1997). La nicotine peut aussi agir au niveau des terminaisons DAergiques via une activation des nAChR $\alpha 4\beta 2^*$, augmentant la probabilité de libération de DA au niveau des structures cibles (Cachope et

al. 2012) mais également en provoquant la genèse de *back propagating* PA (Liu et al. 2022a; Kramer et al. 2022), ou d'EPSP (potentiel postsynaptique excitateur) axonaux (Kramer et al. 2022). L'application de nicotine sur les neurones DAergiques *ex vivo* a également permis de mettre en évidence une augmentation des courants post-synaptiques inhibiteurs, traduisant l'activation des neurones GABAergiques par la nicotine et donc l'augmentation de la transmission GABAergique (Mansvelder et al. 2002).

La nicotine va également agir au niveau des terminaisons cholinergiques et glutamatergiques en provenance respectivement du pont et du PFC, présentes au sein de la VTA et exprimant les nAChR $\alpha 4\beta 2$ ou $\alpha 7$ (Changeux 2010b). En effet, les entrées glutamatergiques des neurones DAergiques de la VTA sont augmentées par l'activation des nAChR (Mansvelder and McGehee 2000). Par ailleurs, l'action concomitante de la nicotine et d'un antagoniste des récepteurs $\alpha 7$ (MLA) ou d'un antagoniste des récepteurs non- $\alpha 7$ (DH β E) sur les neurones DAergiques, se traduit respectivement par une augmentation de la fréquence de décharge des neurones ou une augmentation de l'activité en bouffées (Schilström et al. 2003). Ainsi, les différents types de nAChR pourraient être impliqués différemment dans la réponse des neurones DAergiques à la nicotine. Les récepteurs $\alpha 7$ participeraient à la modulation de l'activité en bouffées et les $\alpha 4\beta 2$ en augmenteraient la fréquence de décharge. Cependant, plusieurs études du laboratoire ont obtenu des résultats opposés, à savoir une absence de réponse à une injection intraveineuse de nicotine chez des souris délétées pour la sous-unité $\beta 2$ des nAChR ($\beta 2^{-/-}$) à la fois en fréquence et en bouffées (Mameli-Engvall et al. 2006; Tolu et al. 2013; Durand-de Cuttoli et al. 2018). Malgré ces divergences de résultats, l'ensemble de ces études suggère l'importance du contrôle nicotinique dans la réponse à la nicotine des neurones DAergiques. La stimulation des nAChR $\alpha 7$ par la nicotine peut également participer à la potentialisation à long terme des terminaisons excitatrices sur lesquelles ils sont localisés (Mansvelder and McGehee 2000; Mansvelder et al. 2002; Gao et al. 2010). Il existe une hétérogénéité des neurones DAergiques de la VTA en réponse à la nicotine (Eddine et al. 2015; Nguyen et al. 2021). En effet, une injection intraveineuse de nicotine produit l'activation d'une population de neurones DAergiques localisée de manière latérale et projetant vers le NAc, et l'inhibition d'une seconde population plus médiale, et projetant vers l'Amg. De plus, la polarité de la réponse de ces neurones est conservée, quelle que soit la dose employée, démontrant ainsi l'existence de deux populations bien distinctes répondant différemment à la nicotine (voir **Figure 5.1**).

Finalement, en augmentant l'activité des neurones DAergiques, et donc la libération phasique de DA au niveau du NAc, la nicotine perturbe l'activité du circuit de la récompense et détourne l'encodage de la RPE, augmentant ainsi la valeur qui lui est associée (Di Chiara and Imperato 1988; Redish 2004; Keiflin and Janak 2015).

2. Action chronique

Comme nous l'avons vu, l'exposition aiguë à la nicotine va tout d'abord activer les nAChR neuronaux puis les désensibiliser (voir **Figure 5.1**). Le maintien de ces mécanismes de manière chronique induit des modifications à long terme à des échelles à la fois moléculaires, cellulaires et comportementales (Lester et al. 2009). En effet, une exposition prolongée à la nicotine engendre des régulations homéostatiques comme la désensibilisation des nAChR permettant de bloquer le passage des cations et notamment de Ca^{2+} , toxique pour la cellule, afin de limiter une activation aberrante de ces canaux (Dani 2003; Lester et al. 2009). Cet état de désensibilisation, qui est favorisé par la stagnation de la nicotine dans le milieu extracellulaire, concerne particulièrement les récepteurs à haute affinité comme $\alpha 4\beta 2$. Cet état serait à l'origine de l'apparition d'une tolérance, puisqu'une même dose de nicotine ne permettrait donc plus d'activer les neurones DAergiques (Fenster et al. 1997; Brody et al. 2006; Nashmi et al. 2007; Lester et al. 2009; De Biasi and Dani 2011).

Des mécanismes d'*up-régulation* vont ensuite se mettre en place afin de compenser la désensibilisation des nAChR en augmentant le nombre de récepteurs à la membrane, et en assurant de ce fait une cholinergie « normale » (voir **Figure 5.2**). En effet, des études chez le rat (Schwartz and Kellar 1983), la souris (Marks et al. 1983), et confirmées par des études post-mortem chez l'Homme (Benwell 1988; Perry et al. 1999), ont permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de nAChR chez les individus exposés de manière chronique à la nicotine par rapport à des individus témoins. L'étude des mécanismes d'*up-régulation* a été largement permise par l'expression des nAChR en système hétérologue. Ainsi, ces processus sont dépendants de la concentration de nicotine, se mettent en place en l'espace de quelques heures et impactent majoritairement les récepteurs présentant les affinités apparentes à la nicotine les plus élevées, à savoir les $\alpha 4\beta 2^*$ (Fenster et al. 1997; Corringier et al. 2006; Srinivasan et al. 2011). Outre l'augmentation du nombre de nAChR à la membrane des neurones, les mécanismes d'*up-régulation* vont également modifier la stœchiométrie des récepteurs (Nelson et al. 2003; Sallette et al. 2005; Tapia et al. 2007; Colombo et al. 2013). Ils favorisent l'expression des récepteurs $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ beaucoup plus affins pour les agonistes que les récepteurs $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ mais disposant d'une conductance et

une perméabilité calcique plus faible (Nelson et al. 2003). La nicotine peut aussi perturber la régulation de l'expression des nAChR (Corringer et al. 2006; Lester et al. 2009; Colombo et al. 2013; Henderson and Lester 2015). En effet, lorsqu'elle est non chargée, celle-ci peut traverser la membrane cellulaire et agir comme une chaperonne, permettant d'augmenter le nombre de récepteurs exprimés à la membrane (voir **Figure 5.2**). De plus, la nicotine est capable de stabiliser l'assemblage des sous-unités entre elles, et de diminuer le taux de *turn-over* des nAChR en facilitant leur maturation et leur migration vers la membrane.

Les processus de désensibilisation et d'*up-régulation* des nAChR agissent de manière conjointe chez le fumeur. Ce dernier fume tout au long de la journée afin de maintenir son taux sanguin de nicotine à un niveau plateau et d'éviter les sensations de manque liées à sa diminution. Des études ont montré que ce taux sanguin se trouve en moyenne entre 10 et 50 ng/mL (Isaac and Rand 1972; Russell et al. 1980). La valeur de ce taux, bien supérieur à la dose associée à une occupation de 50 % des récepteurs $\alpha 4\beta 2^*$ (Brody et al. 2006), suggère un maintien des nAChR dans un état désensibilisé chez le fumeur (Matta et al. 2007). La diminution du taux sanguin de nicotine (par exemple durant la nuit) permettrait aux nAChR de sortir de l'état désensibilisé. Cependant, le nombre de nAChR à la membrane étant fortement augmenté suite aux mécanismes d'*up-régulation* des récepteurs, le système se trouverait donc dans un état d'hypercholinergie qui se traduirait par une suractivation de la transmission nicotinique, et l'émergence de symptômes de manque (Le Houezec 2003).

L'exposition chronique à la nicotine produit une augmentation de l'activité basale des neurones DAergiques de la VTA, ainsi qu'une diminution de leur réponse à une injection aiguë de nicotine (Nashmi et al. 2007; Caillé et al. 2009; Tolu et al. 2017; Morel et al. 2018). De plus, la nicotine va perturber l'activité du circuit de la récompense et détourner l'encodage de la RPE (Di Chiara and Imperato 1988; Redish 2004; Keiflin and Janak 2015). En effet, après apprentissage, le pic de libération phasique de DA est normalement transféré du moment de la récompense à celui de l'indice prédicteur de celle-ci, et devient nul au moment de la récompense indiquant une estimation correcte de la valeur de la récompense attendue. Dans le cas de la nicotine, le pic phasique se décalerait également au moment du prédicteur, mais la nicotine continuerait d'induire un pic de DA au moment de la prise. Cet encodage témoignerait d'une mauvaise évaluation de la valeur associée à la nicotine qui serait alors incrémentée à chaque prise, sans jamais atteindre de plateau comme pour des récompenses naturelles. De cette manière, la nicotine court-circuite le fonctionnement normal du système de la récompense, conduisant les individus à sur-sélectionner les actions menant à la prise de nicotine, et perturbant ainsi leur prise de décision (Redish

2004; Keiflin and Janak 2015). En effet, le laboratoire a démontré qu'une exposition prolongée à la nicotine, qu'elle soit active ou passive, entraîne une augmentation de l'activité des neurones DAergiques de la VTA, associée à des modifications des choix de stratégies (voir **Figure 5.2**) (Dongelmans et al. 2021). Dans une tâche où trois points sont récompensés de manière probabiliste (25 %, 50 % et 100 %) par une stimulation intracrâniale, les animaux exposés chroniquement à la nicotine optimisent leurs choix pour obtenir le taux de récompense maximum (i.e. 75 %) en privilégiant la visite des points récompensés à 100 et 50 %. La nicotine va ainsi perturber la prise de décision en augmentant le choix d'une stratégie d'exploitation par rapport à l'exploration.

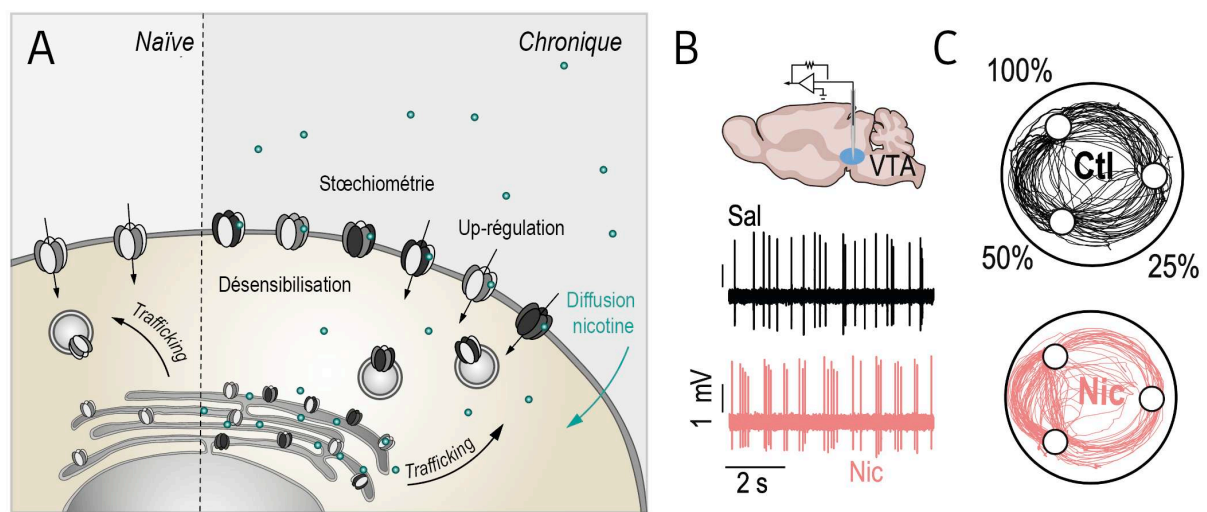


Figure 5.2 : Effets d'une exposition chronique à la nicotine | A. A une échelle moléculaire, l'exposition chronique à la nicotine induit une désensibilisation des nAChR, leur up-régulation, et un changement au niveau de leur stœchiométrie. La nicotine passe dans le milieu intracellulaire et agit comme une chaperonne. **B.** Une exposition chronique induit une augmentation de l'activité spontanée des neurones DAergiques. **C.** Les souris exposées chroniquement à la nicotine maximisent l'obtention de récompenses dans la tâche trois points probabiliste en utilisant une stratégie d'exploitation. *Adapté illustration Sarah Mondoloni, Dongelmans et al. 2021.*

3. Effets opposés de la nicotine et impact sur la consommation

La nicotine produit un ensemble d'effets sur le consommateur, à la fois positifs, liés à l'activation de la voie mésolimbique et à l'origine du renforcement à la nicotine, mais également négatifs. Ces effets négatifs ou aversifs peuvent être aigus, comme l'irritation induite par la fumée de cigarette ou le goût amer de la nicotine, et peuvent induire à de fortes doses des états dysphoriques, des nausées, ou des vertiges chez l'Homme (Henningfield et al. 1983; Carpenter et al. 2007; Mangold et al. 2008) et des comportements

d'évitement chez l'animal (Risinger and Oakes 1995). L'ensemble de ces effets négatifs s'oppose aux effets renforçants de la nicotine et tendent à limiter la consommation de nicotine. À ces effets aversifs s'ajoutent d'autres effets négatifs liés au manque de nicotine, ayant pour effet de promouvoir la consommation dans le but d'amoindrir la sensation de ces effets de manque. Ces derniers ne seront pas plus développés dans cette thèse. Aussi, sauf mention du contraire, les « effets négatifs » se référeront dorénavant aux effets négatifs aigus qui s'opposent à la consommation.

Un élément particulièrement important dans l'équilibre entre les effets positifs et négatifs est la dose de nicotine administrée. Des études ont montré des effets comportementaux opposés, à savoir une préférence ou un évitement du compartiment associé à la nicotine, en fonction de la dose utilisée (Risinger and Oakes 1995; Jackson et al. 2010). A faible dose, la nicotine aurait ainsi un effet anxiolytique et serait associée à un renforcement (Durand-de Cuttoli et al. 2018), tandis que des doses plus importantes produiraient des effets aversifs (Fowler and Kenny 2014). Malgré l'importance de la concentration de la nicotine dans la manifestation d'un effet par rapport à l'autre, des effets anxiolytiques et anxiogènes semblent coexister pour n'importe quelle concentration, et ont pu être observés selon les études pour une seule et même dose (Ouagazzal et al. 1999; Picciotto et al. 2002; Fowler and Kenny 2014; Durand-de Cuttoli et al. 2018; Nguyen et al. 2021). Ainsi, une même dose de nicotine peut induire des effets opposés, et ne serait donc pas renforçante ou aversive dans l'absolu.

Cette idée de balance des effets renforçants et aversifs a donné lieu à des expériences d'auto-administration de différentes doses de nicotine chez l'Homme et le rongeur, et ont permis de mettre en évidence une courbe dose réponse en « U inversé » (voir **Figure 5.3**) (Isaac and Rand 1972; Ashton et al. 1980; Henningfield et al. 1983; Corrigan and Coen 1989; Picciotto 2003; Fowler and Kenny 2014). Ainsi, jusqu'à un certain seuil, différent selon les individus, la concentration de nicotine est trop faible pour induire des effets et le sujet n'est pas motivé pour s'auto-administrer la drogue. Passé la dose seuil, le sujet expérimente des effets récompensants, qui le motive à s'auto-administrer pour augmenter l'effet, induisant un rapprochement du nombre de prises. À mesure que la dose augmente, et se rapproche de la dose permettant de maximiser les effets récompensants tout en minimisant les effets aversifs, l'individu titre sa consommation en espaçant les prises et/ou en diminuant leur nombre, permettant ainsi de maintenir le taux de nicotine sanguin à un plateau. Au-delà de cette dose, les effets aversifs prennent le pas sur les effets récompensants et l'individu diminue sa consommation. L'ensemble de ces mécanismes de titration dépend à la fois de

l'individu, mais également du mode d'administration de la drogue et de son historique de consommation, et a été observé chez l'Homme et l'animal (Russell et al. 1980; Ashton et al. 1980; Corrigall and Coen 1989; Fowler and Kenny 2014; Morel et al. 2014).

L'ensemble de ces paramètres a été utilisé pour modéliser les processus permettant de maintenir activement une consommation de nicotine (Kozłowski and Herman 1984). Ce modèle repose sur l'existence de deux zones aversives délimitant une zone de satisfaction générale qui correspond à une gamme de dose n'induisant pas de changements comportementaux (voir **Figure 5.3**). Il propose ainsi une implication des effets positifs dans l'initiation de la dépendance, mais pas dans la régulation de la consommation qui serait dépendante des effets aversifs. La zone aversive basse correspondrait à une dose de nicotine trop faible induisant un état de manque poussant à augmenter la consommation. La zone haute, quant à elle, correspondrait à une dose de nicotine trop élevée poussant à réduire la consommation de l'individu ; en résulterait ainsi un équilibre permettant d'éviter les deux types d'effets aversifs. Dans ce modèle, l'individu serait motivé uniquement pour masquer les effets désagréables liés à la consommation de nicotine. Ce modèle est dynamique et postule une évolution de ces zones selon l'état de dépendance d'un individu. Il introduit également l'impact d'influences biologiques et psychosociales sur la consommation, avec les zones de plus fortes influences biologiques portées par les deux zones d'effets aversifs, et la zone de plus forte influence psychosociale associée à la zone intermédiaire (Kozłowski and Herman 1984). Si l'on considère l'importance des effets récompensants et leur évolution dans la dépendance à la nicotine, nous pouvons retrouver des similitudes entre ce modèle et la théorie allostatique développée par R. L. Solomon et J. D. Corbit postulant l'existence de régulations homéostatiques émotionnelles dans le cadre de l'addiction (Solomon and Corbit 1974).

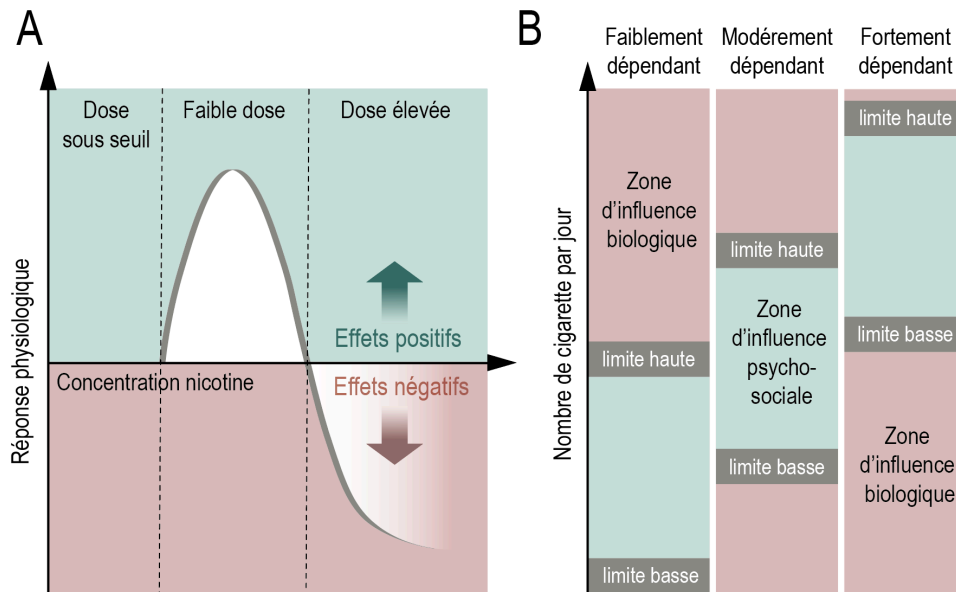


Figure 5.3 : Effets de la nicotine sur sa consommation | A. Représentation schématique de la courbe dose-réponse en U inversé. **B.** « Boundary Model ». Représentation de trois profils de consommateur différents. Les zones vertes correspondent aux zones des effets physiologiques visés et de forte influence psychosociale. Les zones rouges basses correspondent aux effets aversifs de manque tandis que les zones hautes correspondent aux effets négatifs dus à une consommation trop élevée de nicotine. *Adapté de Kozlowski and Herman 1984.*

4. Addiction à la nicotine

Une exposition chronique à la nicotine conduit à terme à la mise en place de mécanismes d'adaptation à la fois moléculaires et cellulaires permettant d'atteindre un nouvel équilibre homéostatique en présence de nicotine. Cet équilibre est notamment caractérisé par un état émotionnel négatif lié à des symptômes de manque en absence de nicotine, qui pousse l'individu à re-consommer, et le mène à la dépendance (Koob and Volkow 2010; De Biasi and Dani 2011). L'addiction qui en découle est une maladie psychiatrique qui se manifeste par des symptômes affectifs tels que l'anxiété, l'irritabilité, un état dépressif et la recherche compulsive de la drogue, mais également par des symptômes physiques comme la bradycardie, des problèmes digestifs ou de poids (Hughes et al. 1984; Hughes 1992; Kenny and Markou 2001; Benowitz 2010; De Biasi and Dani 2011; Antolin-Fontes et al. 2015). Selon le DSM-5, le diagnostic de l'addiction passe par différents critères comme la recherche compulsive de la substance et sa consommation malgré les conséquences négatives qu'elle peut entraîner, au détriment d'activités initialement importantes pour l'individu, ou alors par le temps consacré à sa recherche (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association 2013). La mise en place de la maladie se déroule en plusieurs phases,

la première prise jouant un rôle déterminant dans son évolution. En effet, plusieurs études ont montré que des individus ayant présenté des réactions aversives fortes au cours de leur première prise sont moins susceptibles de développer un usage habituel du tabac (Sartor et al. 2010; de Wit and Phillips 2012). En revanche, si cette première prise a été récompensante, et associée à un sentiment subjectif de « plaisir », on assiste à un renforcement, c'est-à-dire une augmentation de la probabilité de réitération des comportements ayant mené à la prise de tabac. La répétition de la prise de nicotine conduit ensuite vers un usage occasionnel, contrôlé, ne nécessitant pas de prises rapprochées, mais durant lequel la motivation pour chercher la substance est augmentée. Chez certains consommateurs, cet usage récréatif évolue vers une perte de contrôle de la consommation qui devient compulsive, et ce, malgré les conséquences négatives associées. Se développe alors un phénomène de tolérance nécessitant une consommation supérieure à chaque prise pour obtenir un effet équivalent à ceux de la première prise. Des périodes d'abstinence prolongées vont conduire à l'apparition de symptômes de manque à l'origine de nombreuses rechutes suite à des tentatives de sevrage (Benowitz 2010). De plus, certaines études ont montré que la nicotine potentialiserait le renforcement en consolidant l'association entre la drogue et des stimuli environnementaux, ce qui constituerait ensuite des facteurs de rechute après dissipation des effets de manque (Caggiula et al. 2002b, a; Palmatier et al. 2006; Kauer and Malenka 2007; Garcia-Rivas and Deroche-Gamonet 2019). Par ailleurs, l'addiction à la nicotine est particulière, car sa commercialisation est légale, et elle est également moins sujette à une stigmatisation sociale par rapport à d'autres drogues d'abus, facilitant ainsi son accès et sa consommation.

La durée des symptômes de manque est très variable selon les individus, mais semble atteindre son apogée à sept jours et dure généralement quelques semaines. Cette durée coïncide avec le temps nécessaire pour retrouver un équilibre au niveau de l'expression des nAChR (Hughes 1992; Staley et al. 2006). Ces observations ont mené à l'élaboration d'un modèle par Dani et Heinemann concernant la participation de la densité de nAChR ainsi que leur état allostérique dans la mise en place et le maintien de l'addiction à la nicotine (Dani and Heinemann 1996). Dans leur modèle, la répétition de l'activation des nAChR au niveau des circuits de la récompense induit un relargage massif de DA et donc un renforcement à la nicotine. La prise répétée de nicotine mène à une désensibilisation des nAChR à l'origine d'une tolérance de l'individu, nécessitant une augmentation de la prise de nicotine pour atteindre les mêmes effets. Pour compenser cette désensibilisation, et maintenir une transmission nicotinique « normale », le nombre de nAChR à la membrane est *up-régulé*. Lors d'une période d'abstinence, la resensibilisation des nAChR associée à l'augmentation

de leur densité se traduit par une hypercholinergie à l'origine des symptômes de manque, favorisant ainsi la consommation de la nicotine pour rétablir ce nouvel équilibre neuronal pathologique.

Ce modèle n'inclut cependant que le circuit de la récompense et sa modulation dans l'addiction à la nicotine, sans intégrer les altérations des circuits impliqués dans les états émotionnels négatifs. En effet, la voie mHb-IPN, qui possède l'une des plus fortes densités en nAChR du cerveau, est impliquée dans les états émotionnels négatifs et jouerait également un rôle crucial dans les processus d'addiction à la nicotine.

5. Circuits impliqués

1. La voie mésolimbique

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement d'une dépendance à la nicotine résulte principalement du détournement de l'activité du système de la récompense. En effet, les dynamiques d'activité des neurones DAergiques de la VTA constituent un élément central des processus d'apprentissage par renforcement, et sont perturbées dans le cadre d'une addiction à la nicotine (Schultz 2006). En augmentant la libération phasique de DA lors de sa consommation, la nicotine perturbe l'encodage de la RPE en la maintenant à une valeur positive au cours de l'apprentissage, lui attribuant ainsi une valeur motivationnelle et biaisant la prise de décision (Maskos 2008; De Biasi and Dani 2011). Le renforcement qui en découle est souvent associé à des stimuli environnementaux qui participent au maintien de la consommation de nicotine et aux rechutes après la dissipation des symptômes de manque. De nombreuses études ont permis de confirmer que les propriétés appétitives de la nicotine dépendent de son action sur la VTA grâce à l'induction de comportements d'auto-administration par une infusion locale de nicotine (Corrigall et al. 1994; Maskos et al. 2005; Exley et al. 2011; Tolu et al. 2013; Harrington et al. 2016; Durand-de Cuttoli et al. 2018).

L'utilisation de souris délétées pour des sous-unités spécifiques des nAChR a permis de mettre en évidence leur importance dans la modulation de l'activité des neurones DAergiques (voir **Chapitre 2.5**) et dans la mise en place des effets renforçants de la nicotine. Par exemple, des souris $\beta 2^{-/-}$ ne s'auto-administrent pas de nicotine et ne présentent pas non plus de préférence de place à la nicotine (Maskos et al. 2005; Walters et al. 2006; Tolu et al. 2013). Des expériences de réexpression de la sous-unité $\beta 2$ au niveau des neurones de la VTA ont permis de mettre en évidence la nécessité de son expression sur les deux types de neurones, DAergiques et GABAergiques, pour rétablir le comportement d'auto-

administration de la nicotine (Maskos et al. 2005; Tolu et al. 2013). Aussi, le blocage de la transmission nicotinique endogène par les nouveaux outils chémogénétiques développés par le laboratoire, empêche l'acquisition de la préférence de place pour le compartiment pairé à la nicotine lors d'une tâche de CPP (Durand-de Cuttoli et al. 2018). De la même manière que pour les souris $\beta 2^{-/-}$, les souris $\alpha 4^{-/-}$ présentent également une abolition de la préférence de place évoquée par la nicotine, ainsi qu'une absence de maintien du comportement d'auto-administration de la nicotine dans le temps. Ces déficits sont restaurés après réexpression de la sous-unité $\alpha 4$ dans la VTA (Exley et al. 2011; McGranahan et al. 2011). Les études réalisées chez les souris $\alpha 5^{-/-}$ ont permis de montrer des différences dans les comportements d'auto-administration (Fowler et al. 2011; Morel et al. 2014). En effet, celles-ci commencent à s'auto-administrer à des doses plus élevées, et régulent leur consommation différemment, aboutissant à une administration totale de nicotine beaucoup plus importante que celle de souris de type sauvage. La réexpression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les neurones DAergiques de la VTA restaure un comportement d'auto-administration comparable à celui de souris de type sauvage. Ces expériences mettent en lumière le rôle primordial de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau du seuil de sensibilité des neurones DAergiques à la nicotine et donc dans le renforcement à cette drogue (Morel et al. 2014). Finalement la délétion des sous-unités $\beta 4$ se traduit chez les souris par une augmentation de leur consommation de nicotine et des altérations au niveau de la régulation de la consommation (Harrington et al. 2016; Mondoloni et al. 2023).

Bien que la VTA soit impliquée dans les aspects renforçants et appétitifs de l'addiction à la nicotine, elle est également impliquée dans la transmission de ses propriétés aversives. En effet, une étude du laboratoire a montré que les souris $\beta 2^{-/-}$ ne s'auto-administrent pas la nicotine, et que la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ au niveau des interneurones GABAergiques de la VTA induit d'une part une inhibition des neurones DAergiques à une injection de nicotine, et d'autre part un évitement du bras associé à son administration de manière intra-crâniale (Tolu et al. 2013). De plus, il a été mis en évidence l'existence de projections glutamatergiques provenant de la Lhb au niveau des interneurones GABAergiques de la VTA, qui induiraient une inhibition de l'activité des neurones DAergiques projetant vers le PFC (Lammel et al. 2012). Leur activation optogénétique produit un évitement du compartiment pairé à la stimulation dans une tâche de conditionnement d'aversion de place (CPA). Une récente étude a également constaté une aversion suite à l'injection d'une forte dose de nicotine, et a mis en évidence une réduction de la libération de DA au niveau du NAcLat (Liu et al. 2022b). Cette réduction de la libération de DA serait liée à une inhibition des neurones DAergiques de la VTA résultant à la fois de la

désensibilisation des nAChR $\alpha 4\beta 2$, mais également de l'activation des nAChR $\alpha 7$, présents sur les terminaisons GABAergiques du LDTg au niveau de la VTA. En effet, l'inhibition de ces entrées sur la VTA prévient à la fois la réduction de libération de DA au niveau du NAcLat et l'aversion à la nicotine (Liu et al. 2022b). De plus, l'inhibition de l'activité DAergique de la VTA est impliquée dans l'émergence des propriétés anxiogènes de la nicotine. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, il existe une sous-population de neurones DAergiques de la VTA projetant vers l'Amg dont l'activité diminue en réponse à une injection de nicotine (Eddine et al. 2015; Nguyen et al. 2021). Ainsi, l'activation optogénétique de cette voie diminue l'anxiété induite par la nicotine dans une tâche de labyrinthe surélevé, et son inhibition induit de l'anxiété ainsi qu'un évitement du compartiment pairé dans un protocole de CPA (Nguyen et al. 2021). Finalement, l'ensemble de ces données tend à montrer que la VTA n'est pas uniquement impliquée dans le renforcement à la nicotine et ses propriétés appétitives, mais serait également importante dans la transmission de ses propriétés aversives.

2. La voie mHb-IPN

La densité très importante de nAChR au niveau de la voie mHb-IPN, qui la rend particulièrement sensible à la nicotine, et son implication de manière endogène dans la mémoire aversive et les états émotionnels négatifs, ont conduit la communauté scientifique à chercher à comprendre comment cette voie pourrait être impliquée dans l'expression des comportements aversifs à la nicotine (Fowler and Kenny 2014; Antolin-Fontes et al. 2015). Les premières descriptions des effets aversifs de la nicotine ont été réalisées par des expériences de dose-réponse. Ces dernières ont permis de déterminer des fenêtres de concentration en deçà desquelles la nicotine possède des propriétés renforçantes, et au-dessus desquelles celle-ci est associée à des propriétés aversives. Ainsi, une dose de 0.5 mg/kg est couramment utilisée pour induire une préférence à la nicotine dans un paradigme de préférence de place conditionnée (Walters et al. 2006; Durand-de-Cuttoli et al. 2018), tandis que des concentrations supérieures à 1.5 mg/kg induiront généralement une aversion à la nicotine (Grieder et al. 2010; Wolfman et al. 2018). Ces fortes doses de nicotine induisent une augmentation du marquage *cfos*, un facteur de transcription témoignant de l'activation neuronale, au niveau de l'IPN, tandis que des doses plus faibles et renforçantes ne semblent pas l'activer (Fowler et al. 2011). Cette question de la gamme de concentration de nicotine capable d'induire une réponse des neurones de l'IPN a fait l'objet d'un de mes travaux de thèse et, à l'inverse de cette étude, nous avons observé une réponse de l'IPN à de faibles concentrations de nicotine (voir **Chapitre 6**).

Par ailleurs, l'utilisation de souris transgéniques TABAC, caractérisées par la surexpression de la sous-unité $\beta 4$ des nAChR au niveau des sites endogènes (i.e. principalement dans la voie mHb-IPN), a permis de mettre en évidence un abaissement des doses de nicotine induisant une aversion (Frahm et al. 2011). Ces expériences suggèrent ainsi une implication de la voie mHb-IPN dans l'aversion à la nicotine. Ces hypothèses ont été confirmées par des expériences d'inhibition optogénétique des terminaisons de l'IPN au niveau du LDTg, qui permettent une abolition de l'aversion à la nicotine (Wolfman et al. 2018). Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale (IP) de mécamylamine (un antagoniste des nAChR) produit à la fois des symptômes de manque, une augmentation du nombre de cellules exprimant le marqueur *cfos* au niveau de l'IPN et de la mHb, ainsi qu'une augmentation des EPSCs dans l'IPN, suggérant l'implication de la voie mHb-IPN dans les propriétés aversives de la nicotine (Salas et al. 2004; Grieder et al. 2010; Zhao-Shea et al. 2011, 2013; Shih et al. 2014). Ces résultats ont été confirmés et précisés à l'aide d'expériences d'infusion locale de mécamylamine au niveau de l'IPN qui ont également permis d'observer l'apparition de symptômes de manque (Salas et al. 2009; Zhao-Shea et al. 2011, 2013). Une étude *in vivo* de photométrie fibrée a constaté une augmentation de l'activité des neurones GABAergiques de l'IPN pendant une période de sevrage induite par une injection de mécamylamine, mais également pendant des comportements d'expression somatique du manque dans un labyrinthe surélevé. Ces symptômes sont précipités par une activation optogénétique de l'IPN, et bloqués par son inhibition (Zhao-Shea et al. 2013; Klenowski et al. 2022). De plus, l'absence de symptôme de manque à la nicotine chez les souris $\beta 4^{-/}$, et leur induction suite à l'inhibition sélective des nAChR $\alpha 3\beta 4^*$ chez des souris de type sauvage, ont permis de mettre en évidence l'importance de la sous-unité $\beta 4$ dans ces processus (Salas et al. 2009; Zhao-Shea et al. 2011, 2015; Görlich et al. 2013).

Outre son implication dans les symptômes de manque, la voie mHb-IPN serait également importante dans la régulation de consommation de nicotine, comme le montre l'augmentation du comportement d'auto-administration suite à une inhibition de l'IPN ou de la mHb (Fowler et al. 2011). De plus, des variations alléliques du cluster de gènes encodant les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$, largement exprimées dans la voie mHb-IPN, ont été découvertes chez l'Homme et associées à un risque accru de développer une addiction à la nicotine (Bierut et al. 2008). Ainsi, les rongeurs $\alpha 5^{-/}$ présentent une consommation de nicotine beaucoup plus élevée, une diminution de la sensibilité des neurones de l'IPN à la nicotine, ainsi qu'un taux de rechute supérieur à ceux des animaux sauvages. La réexpression de cette sous-unité dans la voie mHb-IPN restaure un profil de consommation normal (Fowler et al. 2011; Forget et al. 2018). Finalement, un autre élément qui montre

l'implication de la sous-unité $\beta 4$ dans la régulation de la consommation de nicotine est que sa surexpression chez les souris TABAC se traduit par une consommation très faible de nicotine, liée à l'abaissement des seuils aversifs (Frahm et al. 2011; Ślimak et al. 2014). Enfin, j'ai participé à une étude démontrant l'importance de la transmission nicotinique dépendante de $\beta 4$ au niveau de l'IPN dans les comportements d'aversion (voir **Annexe Mondoloni et al. 2023**). En effet, nous avons observé qu'une exposition chronique à la nicotine induit à la fois une diminution de l'amplitude des courants nicotiques dans l'IPN ainsi qu'une diminution de l'aversion à la nicotine. De la même manière, nous avons également constaté une diminution de l'aversion à la nicotine chez des souris délétées pour la sous-unité $\beta 4$, corrélée à une amplitude faible des courants nicotiques dans l'IPN. Les phénotypes de type sauvage se sont vus restaurés après réexpression de la sous-unité $\beta 4$ dans l'IPN. L'ensemble de ces études tend à montrer l'importance de la voie mHb-IPN à la fois dans la transmission des effets aversifs de la nicotine, dans la mise en place des symptômes de manque, mais également dans la régulation de la consommation de nicotine (Salas et al. 2009; Fowler et al. 2011; Frahm et al. 2011; Zhao-Shea et al. 2013; Fowler and Kenny 2014; Antolin-Fontes et al. 2015; Molas et al. 2017a; Ables et al. 2017).

3. Interaction VTA-IPN

Comme nous l'avons vu précédemment, lors d'une expérience d'auto-administration, la courbe dose réponse représentant le nombre de prises de nicotine en fonction de la dose proposée a la forme d'un U inversé (voir **Chapitre 5.3**) (Risner and Goldberg 1983; Corrigan and Coen 1989; Harvey et al. 2004; de Wit and Phillips 2012; Fowler and Kenny 2014; Wills et al. 2022). Ces résultats sont couramment expliqués par les effets opposés de la nicotine, qui dépendraient de la dose, une faible dose étant récompensante, tandis qu'une dose élevée induirait des effets aversifs. En se basant sur cette représentation, différentes hypothèses ont été proposées afin de comprendre les mécanismes à l'origine de cette dualité des effets de la nicotine à des doses différentes (Wills et al. 2022). Selon l'une d'entre elles, les effets récompensants de la nicotine seraient portés par les nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ à haute affinité de la VTA qui seraient activables par de faibles doses de nicotine. Les effets aversifs, quant à eux, seraient portés par les récepteurs $\alpha 3\beta 4^*$ de l'IPN à plus faible affinité, qui s'activeraient pour de fortes doses de nicotine (Klink et al. 2001; Azam 2002; Salas et al. 2003). La nicotine à une concentration peu élevée activerait donc les nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ de la VTA pour produire un effet renforçant, et ne permettrait cependant pas d'activer les nAChR $\alpha 3\beta 4^*$ pour lesquels la dose serait infraliminaire. La consommation d'une concentration élevée de nicotine induirait alors une activation des nAChR $\alpha 3\beta 4^*$ qui conduirait à l'apparition de symptômes négatifs. Selon cette proposition, l'objectif du fumeur serait alors de maximiser l'activation

des nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ sans jamais atteindre le seuil d'activation des nAChR $\alpha 3\beta 4^*$. Cependant, l'activation de l'IPN à de fortes, mais pas de faibles doses se base sur un ensemble de données indirectes, comme des stimulations optogénétiques de l'IPN à faible ou haute fréquence, ou par l'utilisation du marqueur *cfos* comme proxy de l'activité des neurones de l'IPN (Fowler et al. 2011; Wolfman et al. 2018). En effet, l'activité électrophysiologique des neurones de l'IPN en réponse à la nicotine *in vivo* n'a encore jamais été enregistrée. Par ailleurs, il est important de noter que l'on trouve également des nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ au niveau de l'IPN, dont le rôle n'est pas encore connu, mais qui pourraient être activés lors d'exposition à de faibles doses de nicotine, ainsi qu'une forte variabilité interindividuelle dans la réponse des individus à la nicotine (Grady et al. 2009; Beiranvand et al. 2014; Mondoloni et al. 2023). De plus, de manière surprenante, une étude a montré que les neurones DAergiques de la VTA étaient capables de répondre à de plus faibles concentrations de nicotine chez les souris délétées pour la sous-unité $\beta 4$ (Harrington et al. 2016). Ces souris s'auto-administrent à la fois moins que les souris contrôles à de faibles doses, mais plus que celles-ci pour de fortes doses de nicotine, et la réexpression de la sous-unité $\beta 4$ au niveau de l'IPN permet de restaurer le phénotype sauvage (Harrington et al. 2016; Husson et al. 2020). Ces données suggèrent ainsi l'existence d'une modulation de la réponse de la VTA à la nicotine par la transmission nicotinique dépendante de $\beta 4$ dans l'IPN. Cette modulation, à laquelle je me suis intéressée au cours de ma thèse (voir **Chapitre 6**), pose de ce fait la question de l'existence d'un circuit de la récompense étendu incluant la voie mHb-IPN dans l'addiction à la nicotine.

6. Outils optopharmacologiques et chémogénétiques

L'addiction à la nicotine est une maladie complexe caractérisée par le détournement de l'activité de différentes voies neuronales par le biais de modifications des niveaux d'expression des nAChR, ainsi que de leur équilibre allostérique. Caractériser l'implication des différentes sous-unités nicotiques dans ces processus constitue un enjeu dans la compréhension des différents mécanismes sous-tendant l'addiction. L'utilisation d'outils à la fois génétiques et pharmacologiques a permis de faire des avancées majeures dans l'appréhension de ces processus, cependant ceux-ci se heurtent à plusieurs limites. En effet, les outils génétiques ont une excellente spécificité moléculaire et cellulaire, mais présentent de pauvres spécificités temporelles et peuvent être à l'origine de différents phénomènes compensatoires. Les outils pharmacologiques possèdent de meilleures résolutions temporelles que les outils génétiques, mais leurs pharmacocinétiques ne leur permettent néanmoins pas de rivaliser avec les dynamiques d'activité neuronale. De plus, ils sont généralement peu spécifiques d'un type de récepteur et peuvent diffuser ailleurs

que dans la structure d'intérêt lors d'une injection intracérébrale. Enfin, les outils optogénétiques ont permis de révolutionner la recherche en neurosciences en permettant de lier modulation temporelle précise au rôle fonctionnel d'un circuit. Cependant, leur spécificité s'arrête à une échelle cellulaire et ne permet donc pas de sonder les rôles spécifiques de différents types de récepteurs.

Afin de surmonter ces limites, le laboratoire a développé de nouveaux outils optopharmacologiques permettant de contrôler des sous-types spécifiques de nAChR avec de grandes résolutions pharmacologique, temporelle et spatiale (voir **Figure 5.4**) (Tochitsky et al. 2012; Kramer et al. 2013; Paoletti et al. 2019). Cette technologie repose sur la mutation ponctuelle d'un acide aminé glutamate proche du site de liaison du ligand en une cystéine servant de point d'ancrage à différents types de ligands (agonistes ou antagonistes), développés par le laboratoire. Ces outils permettent ainsi de manipuler de manière bimodale (activation/inhibition) l'activité des nAChR. Cette technique allie la spécificité moléculaire de la génétique, avec le développement de ligands attachés spécifiques et la précision temporelle de l'optique. Outre les nAChR, cette approche a été développée pour d'autres types de récepteurs comme les récepteurs du glutamate (Volgraf et al. 2006; Berlin et al. 2016), du GABA (Lin et al. 2014) et de la DA (Donthamsetti et al. 2017). Le laboratoire a donc créé plusieurs types de ligands donnant lieu à différentes stratégies permettant un contrôle réversible ou non de l'activité des nAChR, que j'ai pu caractériser et implémenter *in vivo* durant ma thèse :

Stratégie optopharmacologique: Elle repose sur l'utilisation d'un antagoniste photoswitchable appelé le MAHoCh qui se lie au niveau du récepteur muté (Tochitsky et al. 2012). Le MAHoCh est constitué i) d'un maléimide qui réagit avec la mutation cystéine proche du site de liaison du nAChR pour former une liaison covalente, ii) d'un azobenzène capable de changer de configuration avec la lumière, et iii) de l'HomoCholine qui bloque le site de liaison du récepteur (voir **Figure 5.4**). Le MAHoCh a comme particularité de pouvoir changer de configuration en fonction de la longueur d'onde d'illumination. En effet, dans le noir et sous lumière verte (525 nm), il se trouve dans une configuration *trans*, allongée, ne permettant pas de bloquer le site de liaison de l'agoniste. Une exposition à de la lumière violette (380 nm) le fait passer dans une configuration *cis*, repliée, lui permettant d'entrer en compétition avec l'agoniste et donc d'inhiber le récepteur. Ce changement de configuration est donc réversible et peut se faire soit grâce à la lumière avec une résolution de l'ordre de la milliseconde, soit par relaxation thermique, sa demi-vie en configuration *cis* étant d'environ 1 heure dans l'obscurité. Ces LinAChR (*light controllable nAChR*) deviennent

ainsi photocontrôlables et sont donc fonctionnels à la fois dans le noir et sous lumière verte (i.e. activable ou non par un ligand ou par l'ACh endogène), et inhibés sous lumière violette. Ces outils nous permettent ainsi de manipuler la transmission nicotinique de manière réversible et avec de très hautes résolutions spatio-temporelles. Récemment, le laboratoire a exprimé les LinAChR *in vivo* par transduction virale chez la souris afin de manipuler la transmission nicotinique durant une expérience de CPP à la nicotine (Durand-de Cuttoli et al. 2018). Les résultats ont démontré une perte de la préférence pour le compartiment pairé à la nicotine lorsque les LinAChR sont inhibés sous lumière violette.

Stratégie chémogénétique : Le laboratoire a également développé un second ligand appelé le MPEG₄Ch permettant d'inhiber de manière irréversible la transmission nicotinique (voir **Figure 5.4**). Celui-ci fonctionne sur le même principe que le MAHoCh, à la seule différence que l'azobenzène est ici remplacé par un groupement polyéthylèneglycol (PEG) flexible ne réagissant pas à la lumière et permettant d'antagoniser de manière irréversible et durable le récepteur. Ces deux outils sont complémentaires, le premier permettant de contrôler de manière réversible la transmission nicotinique, et le second permettant d'antagoniser les nAChR de manière spécifique et durable. Ces caractéristiques confèrent au MPEG₄Ch une facilité d'utilisation dans des tâches comportementales de longue durée. Un axe important de mon travail a été de caractériser cet outil et de l'implémenter *in vivo* (voir **Chapitre 6**).

Ces stratégies chémogénétiques ont été développées dans un premier temps en utilisant la transduction virale pour faire exprimer le mutant cystéine. Bien que cette technique permette de restreindre l'expression du transgène à une structure et donc d'étudier le rôle de la localisation des récepteurs sur l'élément pré ou postsynaptique, elle possède également certaines limites (voir **Figure 5.4**). En effet, la sous-unité mutée ne remplace que partiellement la sous-unité endogène, ne permettant qu'un contrôle partiel de la transmission nicotinique. De plus, la transduction virale peut en théorie conduire à des niveaux d'expression des nAChR non-physiologiques (que nous n'avons cependant pas observé dans nos expériences), et à l'expression de nAChR sur des populations ne l'exprimant originellement pas (Durand-de Cuttoli et al. 2018). Les nAChR ne pouvant pas être uniquement formés de sous-unité β , leur expression au niveau d'une structure n'exprimant pas de sous-unité α ne devrait cependant pas être problématique. Dans le but de pallier ces limites, nous avons ainsi développé deux lignées de souris transgéniques *knock-in* (KI). La première est appelée KI β 2E61C et exprime la sous-unité β 2 mutée, et la seconde notée KI β 4E61C exprime la sous-unité β 4 mutée. La caractérisation de ces outils a constitué l'un de mes principaux travaux de thèse (voir **Chapitre 6**). Ainsi, les sous-unités

mutées chez ces souris devraient être exprimées à des niveaux physiologiques et au niveau des sites d'expression intrinsèque des nAChR, et nous permettent de moduler la transmission nicotinique endogène de ces animaux au cours de différents types de tâches comportementales (voir **Chapitre 6**).

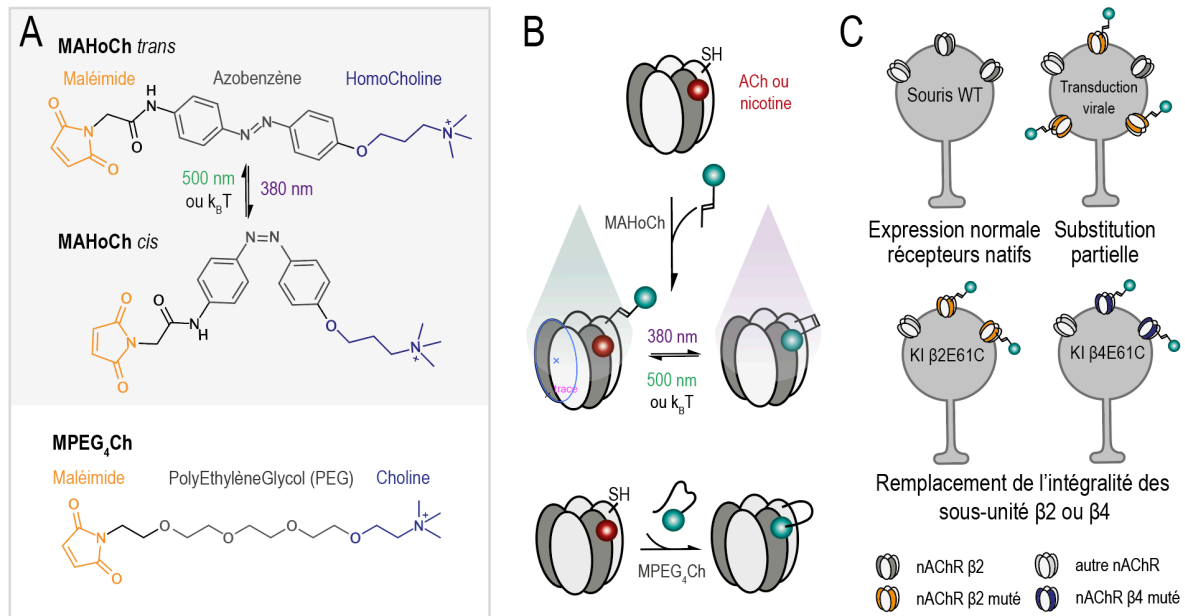


Figure 5.4 : Stratégies chémogénétiques de manipulation des nAChR | A. (Haut) Structure chimique de l'antagoniste photocontrôlable (MAHoCh) en configuration allongée dans l'obscurité ou sous lumière verte. (Milieu) MAHoCh en configuration repliée. (Bas) Structure chimique de l'antagoniste irréversible (MPEG₄Ch). **B.** Représentation schématique des deux types de stratégies chémogénétiques : optique en haut et irréversible en bas. Le récepteur muté est fonctionnel en l'absence de MAHoCh ou de MPEG₄Ch. **C.** Différentes techniques d'expression des sous-unités.

Résultats

Chapitre 6 : Première publication scientifique

The interpeduncular nucleus blunts the rewarding properties of nicotine

Joachim Jehl*, Maria Ciscato*, **Éléonore Vicq***, Gabrielle Dejean de la Batie, Nicolas Guyon, Sarah Mondoloni, Jacinthe Frangieh, Claire Nguyen, Jean-Pierre Hardelin, Fabio Marti, Pierre-Jean Corringer, Philippe Faure** and Alexandre Mouro. ** (* co-first, ** co-last). **En révision.**

La nicotine est la principale substance psychoactive retrouvée à la fois dans le tabac et les cigarettes électroniques. Elle agit au niveau neuronal en se liant aux nAChR. En fonction de la dose consommée, la nicotine possède des propriétés récompensantes ou aversives. Ainsi, une faible dose de nicotine possède des propriétés récompensantes qui facilite sa consommation, tandis que de fortes doses produiront des effets aversifs s'opposant à sa consommation. Ces propriétés seraient portées par des circuits neuronaux différents, respectivement la voie mésolimbique et l'IPN. En effet, en agissant au niveau des nAChR $\alpha 4\beta 2$ à forte affinité et fortement exprimés au niveau du système DAergique, la nicotine détourne l'activité du système de la récompense pour aboutir à un renforcement. La nicotine agit également au niveau d'autres structures comme l'IPN qui exprime de très fortes densités de nAChR, notamment des sous-types rares comme $\alpha 3\beta 4$, des nAChR à plus faible affinité. La transmission nicotinique de l'IPN serait donc importante pour encoder les propriétés aversives de la nicotine à des doses plus élevées. L'objectif de ce travail a donc été de mieux caractériser les réponses de l'IPN à de faibles doses de nicotine et de voir comment celui-ci pourrait jouer un rôle dans renforcement.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité des réponses des neurones de l'IPN suite à une injection IV de nicotine. Nous avons également pu démontrer l'engagement de l'IPN à de faibles doses de nicotine n'élicitant pas de réponse dans la VTA. A l'aide de nouveaux outils chémogénétiques développés par le laboratoire, nous avons pu bloquer la transmission nicotinique dépendante de $\beta 4$ sélectivement dans l'IPN, et nous avons pu montrer que cette manipulation augmente la réponse à la nicotine dans la VTA. Comportementalement, cette augmentation de la réponse des neurones de la VTA à de faibles doses de nicotine s'accompagne d'un renforcement dans une tâche de CPP à des doses n'élicitant initialement pas de renforcement. Ces

résultats nous ont ainsi permis de mettre en lumière l'existence d'un contrôle de l'activité de la VTA par l'IPN. Par ailleurs, ces travaux démontrent que l'IPN ne serait pas uniquement engagé à de fortes doses pour médier les propriétés aversives de la nicotine, et serait également important dans le renforcement à de faibles doses de nicotine.

1 **The interpeduncular nucleus blunts the rewarding effect of nicotine**

2

3

4 Joachim Jehl^{1,2*}, Maria Ciscato^{1*}, Eléonore Vicq^{1,2*}, Gabrielle Dejean de la Batie³, Nicolas
5 Guyon¹, Sarah Mondoloni², Jacinthe Frangieh³, Claire Nguyen², Jean-Pierre Hardelin^{1,2}, Fabio
6 Marti^{1,2}, Pierre-Jean Corringer³, Philippe Faure^{1,2**} and Alexandre Mourot^{1,2**}

7

8

9 1. Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 75005 Paris, France

10 2. Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris
11 Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France.

12 3. Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR 3571, Channel-Receptors Unit, Paris,
13 France

14 * Equal contribution

15 ** Co-last author

16

17 Lead contact email: alexandre.mourot@inserm.fr

18 **Summary**

19 Nicotine, by stimulating ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons, has a
20 rewarding effect that drives tobacco consumption. In turn, the interpeduncular nucleus (IPN) is
21 thought to become activated at high nicotine doses to restrict drug intake. However, the
22 dynamics of the IPN response to nicotine and its impact on the rewarding effect of the drug
23 remain unknown. To address this issue, we have developed a genetically-modified mouse
24 model, in which a "suicide" antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs)
25 selectively attaches to a designer $\beta 4$ nAChR subunit. By locally infusing this antagonist in the
26 IPN, we achieved pharmacologically-specific and sustained antagonism of nAChRs containing
27 the $\beta 4$ subunit. By combining this chemogenetic method with *in vivo* electrophysiology, we
28 show that even at low doses, nicotine activates and inhibits two different populations of IPN
29 neurons, and that $\beta 4$ -containing nAChRs are only involved in the activation response.
30 Furthermore, blocking the response to nicotine selectively in the IPN increased both the
31 sensitivity of the VTA to the drug and its rewarding effect in a conditioned place preference
32 paradigm. These findings indicate that the IPN is engaged across a large range of nicotine doses
33 and acts as a regulatory brake on the nicotine reward circuit.

34

35 Introduction

36

37 Nicotine is an addictive chemical substance found in the tobacco plant. Even though the
38 percent of cigarette smokers currently decreases worldwide, there is a dramatic rise in the use
39 of electronic nicotine delivery systems, particularly in teenagers.¹ Understanding the
40 physiological mechanism of nicotine addiction is thus crucial for developing effective strategies
41 to help individuals break free from its grip. Nicotine exerts its effects by binding to nicotinic
42 acetylcholine receptors (nAChRs). There are nine different alpha (α 2-9) and three different beta
43 (β 2-4) nAChR subunits in the brain, which assemble to form a variety of hetero- and homo-
44 pentameric structures.²

45 The initiation of addiction to nicotine involves the mesolimbic dopamine (DA) reward
46 system.³ Nicotine acts as a positive reinforcer by activating α 4 β 2 nAChRs located in the ventral
47 tegmental area (VTA),⁴⁻⁸ which leads to the release of DA in the nucleus accumbens.⁹ Nicotine
48 also elicits negative effects, depending on the dose. In particular, a reinforcing dose that
49 motivates drug intake⁵ also drives anxiety.⁹ At higher doses, nicotine has been described as
50 aversive, thus motivating avoidance.¹⁰⁻¹³ These competing reinforcing and aversive properties
51 of nicotine, together with the feeling of satiety, are consistent with the observation that humans
52 and laboratory rodents titrate their nicotine intake when high doses are available.^{5,11,12,14}

53 The aversive effect of high-dose nicotine involves the neural pathway projecting from
54 the medial habenula (Mhb) to the interpeduncular nucleus (IPN).^{5,10,11} Neurons belonging to
55 this pathway express high densities of rare nAChR subunits, notably α 3, α 5 and β 4.¹⁵⁻¹⁷ In
56 particular, the α 3 and β 4 subunits are almost absent in the VTA¹⁸ and in other parts of the
57 brain.^{17,19} Knock-out mice lacking α 5¹¹ or β 4^{12,20,21} consume more nicotine than wild-type (WT)
58 mice, especially at high doses, and their consumption level is restored upon viral re-expression
59 of these nAChR subunits in the Mhb^{11,20} or IPN.^{12,20,21} Similarly, knocking down α 3 selectively

60 in the Mhb or IPN²², or pharmacologically blocking $\alpha 3\beta 4$ nAChRs in the IPN²³, results in
61 increased self-administration of nicotine in the rat. Because the $\alpha 3\beta 4$ nAChR has lower affinity
62 for nicotine than the $\alpha 4\beta 2$ nAChR^{2,24}, one current hypothesis is that nicotine is rewarding at
63 low doses because it activates primarily $\alpha 4\beta 2$ receptors of the VTA, while it is aversive at high
64 doses because only then does it activate $\alpha 3\beta 4$ nAChRs of the MHb-IPN axis.^{5,13} It is currently
65 unknown whether the IPN also responds to low doses of nicotine *in vivo*, and how this may
66 affect the balance between the reinforcing and aversive properties of the drug.

67

68 **Results**

69

70 Conditioning at a low dose of nicotine in $\beta 4^{-/-}$ mice

71 To assess the rewarding properties of low-dose nicotine, we employed an unbiased
72 conditioned place preference (CPP) paradigm. Acute intraperitoneal administration of nicotine
73 at a dose of 0.5 mg/kg consistently induces a preference for the drug-paired chamber in
74 C57BL/6 mice.^{68,25-27} However, lower doses of nicotine typically produce neither aversion nor
75 preference for the drug in WT mice.²⁷⁻²⁹ Accordingly, a low dose of nicotine (0.2 mg/kg) did
76 not induce a preference compared to saline in wild-type mice, but did induce nicotine preference
77 in mutant mice lacking the nAChR $\beta 4$ subunit (Figure 1A). This subunit is abundant in the
78 MHb-IPN pathway but virtually absent in other brain regions including the VTA,¹⁸ suggesting
79 that low doses of nicotine may act through $\beta 4$ -containing nAChRs, conceivably within the
80 MHb-IPN pathway, to modulate the rewarding effect of the drug. To address this question, we
81 devised a method that enables long-lasting and exclusive manipulation of $\beta 4$ -containing
82 nAChR subtypes in targeted brain regions.

83

84 Designing chemogenetic tools for sustained nAChR antagonism.

85 We have previously developed a chemogenetic method to manipulate specific nAChR
86 subtypes in the living mouse with light.^{6,30} It relies on the covalent attachment of a
87 photoswitchable tethered ligand called MAHoCh near the acetylcholine binding pocket, by
88 replacing the amino acid glutamate at position 61 by a cysteine (E61C) in the $\beta 2$ or $\beta 4$ nAChR
89 subunit. While this method allows rapid and reversible control of nicotinic signaling, its *in vivo*
90 application requires mice to be continuously connected to an external light source, which poses
91 challenges for long-term behavioral experiments.³¹ To overcome this limitation, we sought to
92 extend the chemogenetic toolbox for nAChR control, by developing a method that would allow
93 sustained receptor antagonism without the need for light stimulation. The idea was to covalently
94 attach a synthetic antagonist to a genetically-encoded cysteine tag at the nAChR surface, in
95 close proximity to the agonist binding pocket (Figure 1B). The antagonist acts as a suicide
96 inhibitor: its covalent attachment to the cysteine residue increases the local concentration of the
97 antagonist in the vicinity of the receptor and leads to permanent occupation of the agonist
98 binding pocket, resulting in sustained antagonism. The newly developed tethered antagonist,
99 named MPEG₄Ch, contains a cysteine-reactive maleimide (M) group at one end, a choline (Ch)
100 ligand at the other end, and a flexible poly-ethylene glycol (PEG) linker in between (Figure
101 1B). To maximize the versatility of our chemogenetic toolbox, we designed MPEG₄Ch so that
102 it antagonizes nAChRs after attachment to the very cysteine residue (E61C) that makes nAChRs
103 photocontrolable (Figure 1B).^{6,30} The size of the PEG linker (consisting of four ethylene glycol
104 units) was thus chosen to match that of the photoswitchable azobenzene linker in MAHoCh
105 (Figure S1A).

106 To experimentally validate our strategy, we heterologously expressed WT and cysteine-
107 substituted $\alpha 3\beta 4$ nAChRs in *Xenopus* oocytes. The mutation E61C in $\beta 4$ had minimal effect
108 on the receptor sensitivity to acetylcholine (Figure S1B), indicating that the mutant receptor is
109 functional, which is consistent with our previous findings.³⁰ After incubation of the oocytes

110 with 15 μ M MPEG₄Ch and subsequent washing, there was a robust inhibition of α 3 β 4E61C
111 receptors at both EC₅₀ and saturating concentrations of acetylcholine (~90% and 80%,
112 respectively, Figure 1C), but no effect on WT receptors, indicating that the cysteine substitution
113 is required for the antagonistic action of MPEG₄Ch.

114

115 Knock-in mice for the manipulation of endogenous nAChRs.

116 To manipulate nicotinic signaling while preserving endogenous nAChR expression
117 patterns, we produced a knock-in mouse line carrying a single point mutation at codon position
118 61 in the gene encoding the nAChR β 4 subunit (β 4E61C, Figure S1C). The amplitudes of
119 nicotine-induced currents were identical in the knock-in and the WT mice (Figure 1D),
120 suggesting unchanged nAChR expression profiles in the neurons of mutant mice, as expected.
121 We also verified that IPN neurons of these mice had no obvious electrophysiological alteration
122 (Figure S1D-G), and that the mice had no discernable phenotypical alteration (Figure S1H-I).
123 These results indicate that the β 4E61C minimally (if at all) perturbs nicotinic signaling.

124 We then assessed the ability of MPEG₄Ch to inhibit β 4-containing nAChRs in neurons
125 of the knock-in mouse. IPN brain slices of adult WT and β 4E61C mice were treated with
126 MPEG₄Ch, extensively washed, and the amplitude of nicotine-induced currents was measured
127 in whole-cell recordings. MPEG₄Ch treatment markedly decreased the amplitude of the
128 response to nicotine in β 4E61C mice (> 60%), but had no effect in WT mice (Figure 1D). This
129 result confirms that β 4-containing nAChRs are the main receptor subtypes in the IPN,¹² and
130 that the engineered E61C mutation is required for MPEG₄Ch-induced nAChR antagonism.

131 Next, we examined the ability of MPEG₄Ch to conjugate to β 4E61C-containing
132 nAChRs *in vivo*. MPEG₄Ch was infused into the IPN of anesthetized mice, and brain slices
133 were prepared on the following day. MPEG₄Ch reduced nicotine-induced currents in IPN
134 neurons of β 4E61C mice by about 80%, but had no effect in WT mice (Figure 1E). Since

135 MPEG₄Ch irreversibly reacts with cysteine residues, the antagonism should persist as long as
136 the MPEG₄Ch-conjugated receptors remain at the cell surface. To investigate the duration of
137 antagonism, brain slices were prepared 1 to 10 days after a single injection of MPEG₄Ch in the
138 IPN, and we found that the antagonistic effect persisted up to 10 days (Figure 1E). Therefore,
139 MPEG₄Ch can be used as a cysteine-reactive covalent ligand, providing efficient, long-lasting,
140 and subtype-specific antagonism of β 4E61C-containing nAChRs.

141

142 Blocking the IPN is sufficient to induce a preference to low-dose nicotine

143 We then investigated whether the rewarding effect of low-dose nicotine in β 4 knock-
144 out mice (Figure 1A) was due to the absence of β 4 in the IPN. We selectively blocked β 4
145 nAChRs in the IPN with MPEG₄Ch, and carried out the CPP test. Sham-injected β 4E61C mice
146 served as the control group. MPEG₄Ch was injected 3 days prior to the conditioning phase, to
147 ensure continuous nAChR antagonism throughout the protocol. Only the MPEG₄Ch-treated
148 mice, but not the sham-treated mice, developed a preference for low-dose nicotine (Figure 1F),
149 therefore reproducing the result with the knock-out mice, and indicating that β 4-containing
150 nAChRs of the IPN play a key role in setting the rewarding value of nicotine, especially at low
151 dose.

152

153 Dose-dependent effects of nicotine on IPN neurons *in vivo*

154 To understand the mechanism by which the IPN affects the rewarding effect of the drug,
155 we first assessed the sensitivity of the IPN to acute nicotine injections *in vivo*. We used a
156 microdrive multielectrode manipulator to record the electrical activity of IPN neurons in
157 anesthetized mice (Figure 2A). Acute intravenous (i.v.) injection of 30 μ g/kg nicotine, a
158 reinforcing dose typically used to probe nicotine response in VTA neurons^{6,9,32}, evoked
159 opposing responses (activation vs. inhibition) in IPN neurons (Figure 2A). Of the 168 neurons

160 recorded, 97 (58 %) showed an increase in firing rate, while 71 (42 %) showed a decrease, and
161 these variations were absent with saline injection (Figure 2B-C and S2A). The two populations
162 of neurons could not be distinguished based on their spontaneous firing rates (Figure S2B), but
163 there was a correlation between the spontaneous firing rate and the amplitude of the response
164 to nicotine, in both activated and inhibited cells (Figure S2C). These results are consistent with
165 previous data obtained using the juxtacellular technique in neurons that were labelled and
166 confirmed to be located in the IPN.¹²

167 We then assessed the sensitivity of IPN neurons to a range of nicotine doses (7.5 to 60
168 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and found that the effect of nicotine was dose-dependent, but that the polarity of the
169 response (*i.e.*, activation or inhibition) was not. Indeed, neurons that were activated by nicotine
170 at 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were activated across all doses tested, and similarly, inhibited neurons maintained
171 their inhibition at all doses (Figure 2D). The two populations of neurons are thus distinct and
172 not overlapping. Most of the neurons (36/37), whether activated or inhibited, responded to the
173 lowest dose of 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

174

175 $\beta 4$ -containing nAChRs mediate activation of IPN neurons by nicotine

176 We employed our new chemogenetic strategy to assess the contribution of $\beta 4$ -
177 containing nAChRs to the response of IPN neurons to nicotine *in vivo*. MPEG₄Ch (or saline for
178 the control sham group) was locally infused in the IPN of $\beta 4\text{E}61\text{C}$ mice with the microdrive
179 multielectrode manipulator, and the electrical activity of IPN neurons was recorded after a
180 couple of hours (Figure 2E). MPEG₄Ch did not affect the spontaneous electrical activity of IPN
181 cells (Figure S2E). However, the amplitude of nicotine-induced activation was markedly
182 reduced in MPEG₄Ch-treated animals, for both 7.5 and 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses (Figure 2E-F). In
183 contrast, the amplitude of nicotine-induced inhibition was unaffected by the MPEG₄Ch
184 treatment, in agreement with observations previously made in $\beta 4^{-/-}$ mice¹². We reproduced these

185 experiments in WT mice and showed that MPEG₄Ch, without the ability to anchor to nAChRs,
186 had no effect on the response to nicotine, confirming the molecular specificity of the method
187 (Figure S2D). Together, these results indicate that IPN β 4-containing nAChRs are recruited
188 even at low nicotine doses, and predominantly contribute to the nicotine response in activated
189 neurons.

190

191 The IPN is more sensitive to nicotine than the VTA.

192 Our results indicate that IPN neurons respond to i.v. nicotine doses as low as 7.5 μ g/kg.
193 In comparison, previous studies have reported that VTA DA neurons start responding at twice
194 this dose (15 μ g/kg).^{8,31,32} To compare the relative sensitivities of the VTA and IPN to nicotine,
195 we conducted two independent experiments. First, we recorded bulk neuronal activity in each
196 brain region using fiber photometry. The VTA or IPN of WT mice were transduced with the
197 calcium sensor GCaMP7c, and proper transduction and fiber location were verified with *post-*
198 *hoc* immunohistochemistry (Figures 3A-B). Mice were anesthetized and different doses of nicotine
199 (7.5 - 60 μ g/kg) were injected i.v. while monitoring the GCaMP signal. Nicotine increased the
200 calcium signal in the IPN across all doses tested (Figure 3A), while responses in the VTA were
201 only detected from the 30 μ g/kg dose onward (Figure 3B).

202 In a second step, we positioned one tetrode in the VTA and another one in the IPN to
203 simultaneously record in the two structures. Overall, the amplitude of firing frequency variation
204 was greater in IPN neurons than in putative DA (pDA) neurons of the VTA at all nicotine doses
205 tested (Figure 3C). VTA pDA neurons started to respond at a dose of 15 μ g/kg (Figure 3C), in
206 agreement with previous recordings of identified VTA dopaminergic neurons,^{7,9} while IPN
207 neurons responded at all doses. Specifically, the lowest nicotine dose tested (7.5 μ g/kg)
208 increased the firing rate of IPN neurons but not of VTA pDA neurons (Figure 3D). Collectively,

209 these optical and electrophysiological recordings strongly suggest that IPN neurons respond to
210 nicotine with greater sensitivity and greater amplitude than VTA DA neurons.

211

212 The IPN lowers the rewarding effect of nicotine

213 We then hypothesized that the response to nicotine in the IPN impacts on the response
214 in the VTA, potentially explaining why animals with a reduced nicotine response in the IPN
215 showed an increased preference for nicotine. We took advantage of our newly-developed
216 chemogenetic approach to inhibit the response to nicotine solely in the IPN while recording in
217 the VTA. MPEG₄Ch (or saline for control mice) was infused into the IPN of β 4E61C mice, and
218 the response of VTA neurons to nicotine i.v. injections was subsequently measured with
219 tetrodes. Strikingly, VTA neurons of MPEG₄Ch-treated mice, but not of control mice,
220 responded to the injection of low-dose nicotine (7.5 μ g/kg, Figure 3E). Furthermore, the
221 amplitude of the response to nicotine was greater for MPEG₄Ch-treated mice than for control
222 animals, even when a higher, more standard dose of 30 μ g/kg was administered. To rule out the
223 possibility that MPEG₄Ch may have diffused outside the IPN, we carried out two control
224 experiments. First, we infused MPEG₄Ch in the VTA of β 4E61C mice, and found that this
225 treatment had no effect on the response of VTA pDA neurons to nicotine (Figure S3A), in
226 agreement with the reported absence of β 4-containing nAChRs in the VTA.¹⁸ Then, we checked
227 whether infusion of MPEG₄Ch in the IPN could affect neurons of the MHb, a distant brain
228 region with dense expression of β 4-containing nAChRs. Incubation of MHb slices with
229 MPEG₄Ch profoundly decreased the amplitude of nAChR currents, confirming the strong
230 expression level of β 4 in the MHb,¹⁷ but infusion of MPEG₄Ch in the IPN had no effect on the
231 response of MHb neurons to nicotine (Figure S3B). Taken together, these experiments indicate
232 that the effect of MPEG₄Ch on VTA neurons is unlikely to be attributed to its diffusion
233 outside the IPN. Therefore, blocking the response to nicotine selectively in the IPN boosted the

234 amplitude of the response to the drug in the VTA, providing a mechanistic understanding of the
235 increased sensitivity to nicotine in $\beta 4^{-/-}$ mice.²¹

236

237 **Discussion**

238

239 Making receptors light-controllable is a valuable method for probing neurotransmission
240 with high spatiotemporal precision.^{31,33} However, it is not convenient for manipulations that
241 require long-term effects, particularly in behaving mice. To overcome this limitation, we
242 expanded the toolbox for controlling nAChRs, by developing a knock-in mouse line ($\beta 4E61C$)
243 and a corresponding suicide inhibitor (MPEG₄Ch) that forms a covalent bond with the cysteine
244 amino acid installed in the knock-in mouse. The method provides efficient antagonism
245 (approximately 80%) with immediate onset (maleimides react within minutes with thiols³⁴),
246 sustained effect (several days), absolute pharmacological specificity (nAChRs containing the
247 $\beta 4$ subunit only) and anatomical precision. This combination of properties is difficult to achieve
248 with traditional pharmacological tools, because small molecules rarely show receptor-subtype
249 specificity, and their effects wear off rapidly due to diffusion in brain tissues. While gene knock-
250 down strategies using shRNAs can achieve long-lasting inhibition of receptors in targeted
251 tissue, the overall degree of silencing was found to vary tremendously,^{35,36} and the effect takes
252 weeks to occur.

253 In this study, we used this chemogenetic method in knock-in mice, where the WT
254 nAChR $\beta 4$ subunit has been replaced with a “silent” mutant subunit, ensuring proper expression
255 profiles and untouched nicotinic transmission. We provide here direct evidence that $\beta 4$ -
256 containing nAChRs are functionally expressed at high levels in both IPN and MHb neurons. In
257 principle, this mouse line could also be used in combination with previously-developed
258 photoswitchable tethered ligands^{6,30} to afford rapid, optical manipulation of endogenous

259 nAChRs. Alternatively, local injection of a viral vector could be used to get restricted
260 expression of the β_{4E61C} subunit in targeted cell types.^{6,33} In β_{4E61C} knock-in mice, a single
261 bolus dose of MPEG₄Ch resulted in robust receptor inhibition for several days, which suggests
262 that bioconjugation of MPEG₄Ch to the thiol group of cysteine residues is fully irreversible, as
263 demonstrated for other PEG-substituted maleimide reagents.³⁴ This finding also suggests that
264 the lifetime of nAChRs *in vivo* is in the order of weeks, which is compatible with the median
265 lifetime of about 10 days measured for neuronal receptors in the mouse brain.³⁷

266 A previous study utilizing c-fos imaging reported that the IPN only responds to high,
267 aversive doses of nicotine, and not to a lower, rewarding dose.¹¹ This led to the hypothesis that
268 the IPN is only engaged at high nicotine doses to limit drug intake.^{5,13} By recording IPN neurons
269 in live animals, we have revealed their sensitivity to a wider range of nicotine concentrations.
270 We found that the IPN responds to concentrations of nicotine that do not activate the VTA.
271 More importantly, we found that the effect of low-dose nicotine on the IPN translates into a
272 reduced potency of the drug in the VTA. This implies that the mesolimbic DA and MHB-IPN
273 pathways, which encompass the IPN and VTA, do not work independently. Our results also
274 uncover that low, sub-rewarding doses of nicotine can act through $\alpha_3\beta_4$ nAChRs, which are
275 commonly considered as low-affinity receptors.²⁴ We suggest that the IPN acts as a brake on
276 the VTA to decrease the rewarding value of the drug and ultimately to limit drug intake.

277 The mechanism by which the IPN reduces the effect of nicotine in the VTA remains
278 unclear. Currently, there is no evidence for a direct neural connection from the IPN to the
279 VTA.^{38,39} However, the laterodorsal tegmentum (LDTg) has been identified as an important
280 functional relay between these two structures. GABAergic projections from the IPN to the
281 LDTg are modulated by nicotine, and their optogenetic stimulation elicits avoidance behavior.¹³
282 The LDTg, in turn, sends excitatory glutamatergic and cholinergic inputs to the VTA, and their
283 activation mediates reward.^{40,41} It is thus plausible that nicotine, by activating GABAergic

284 projections from the IPN to the LDTg, gates afferent excitatory signals onto the VTA, thereby
285 decreasing the direct impact of the drug on DA neurons. The IPN is nevertheless a complex,
286 heterogenous structure with multiple subnuclei and different populations of GABAergic
287 projection neurons and interneurons, each with precise molecular and anatomical
288 signatures.^{38,42,43} Nicotine-activated and -inhibited neurons could not be identified solely on
289 basis of electrophysiological criteria. Further investigations are necessary to determine whether
290 IPN neurons projecting to the LDTg are activated or inhibited by nicotine, and whether the IPN
291 regulates the encoding of rewards other than nicotine in the VTA.

292

293 **Acknowledgements**

294 The authors would like to thank Romain Durand-de Cuttoli (Sorbonne University, Paris,
295 France) for his help with electrophysiology experiments, and the animal facilities at IBPS
296 Sorbonne University and ESPCI Paris.

297 Funding :

298 Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE16-0012 CHOLHAB to AM and ANR-21-
299 CE37-0026 NICOPTOTOUCHE to AM and PJC)

300 Fondation pour la Recherche Médicale, Equipe FRM grant (EQU201903007961 to PF), PhD
301 fellowship (ECO201806006688 to JJ) and fourth-year PhD fellowship (FDT201904008060 to
302 SM).

303 Institut National du Cancer, Grant TABAC-16-022 and TABAC-19-02 (to PF) and PhD
304 fellowship (to GBD)

305 Memolife Labex, fourth-year PhD fellowship (to JJ and EV)

306 Biopsy Labex, fourth-year PhD fellowship (to CN)

307 The Swedish Research Council, Post-doctoral fellowship (2022-06168 to NG)

308

309

310 **Author contribution**

311 Conceptualization: AM and PF

312 Methodology: AM

313 Validation: FM, PJC, PF, AM

314 Formal analysis: JJ, EV, MC, GDB, JF, NG, SM, CN, AM

315 Investigation: JJ, EV, MC, GDB, JF, NG, SM, CN

316 Writing, original draft: AM, JJ, MC, JPH

317 Writing, review and editing: all authors

318 Visualization: JJ, MC, EV, AM

319 Supervision: FM, PJC, PF, AM

320 Funding acquisition: PJC, PF, AM

321

322 **Declaration of interests**

323 The authors declare no competing interest.

324 **Figure titles and legends**

325 **Figure 1: Chemogenetic method for sustained antagonism of $\beta 4$ -containing nAChRs.**

326 **A.** Left, unbiased CPP protocol. Middle, representative heat maps for a WT and a $\beta 4^{-/-}$ mouse.

327 Right, preference for the nicotine-paired chamber.

328 **B.** Top left, $\beta 4E61C$ -containing nAChR irreversibly antagonized after covalent attachment of

329 MPEG₄Ch. Bottom left, chemical structure of MPEG₄Ch. Right, side view of the agonist

330 binding site in the $\alpha 3\beta 4$ nAChR in complex with nicotine (PDB: 6pv7)⁴⁴, with E61 shown in

331 red.

332 **C.** Left, ACh-induced currents recorded using two-electrode voltage clamp, before and after

333 MPEG₄Ch treatment. Right, average currents before and after MPEG₄Ch treatment.

334 **D.** Left, patch-clamp recording with puff application of nicotine on IPN slices. Representative

335 (middle) and average (right) nicotine-induced currents recorded from slices treated or not with

336 MPEG₄Ch.

337 **E.** Left, local infusion of MPEG₄Ch in the IPN, 1 to 10 days before preparing the slices. Middle,

338 percent inhibition of nicotinic current in IPN neurons one day after MPEG₄Ch infusion. Right,

339 nicotine-induced current 1 to 10 days after MPEG₄Ch infusion.

340 **F.** Left, nicotine CPP protocol after MPEG₄Ch treatment. Middle, representative animal

341 positions. Right, preference for the nicotine-paired chamber.

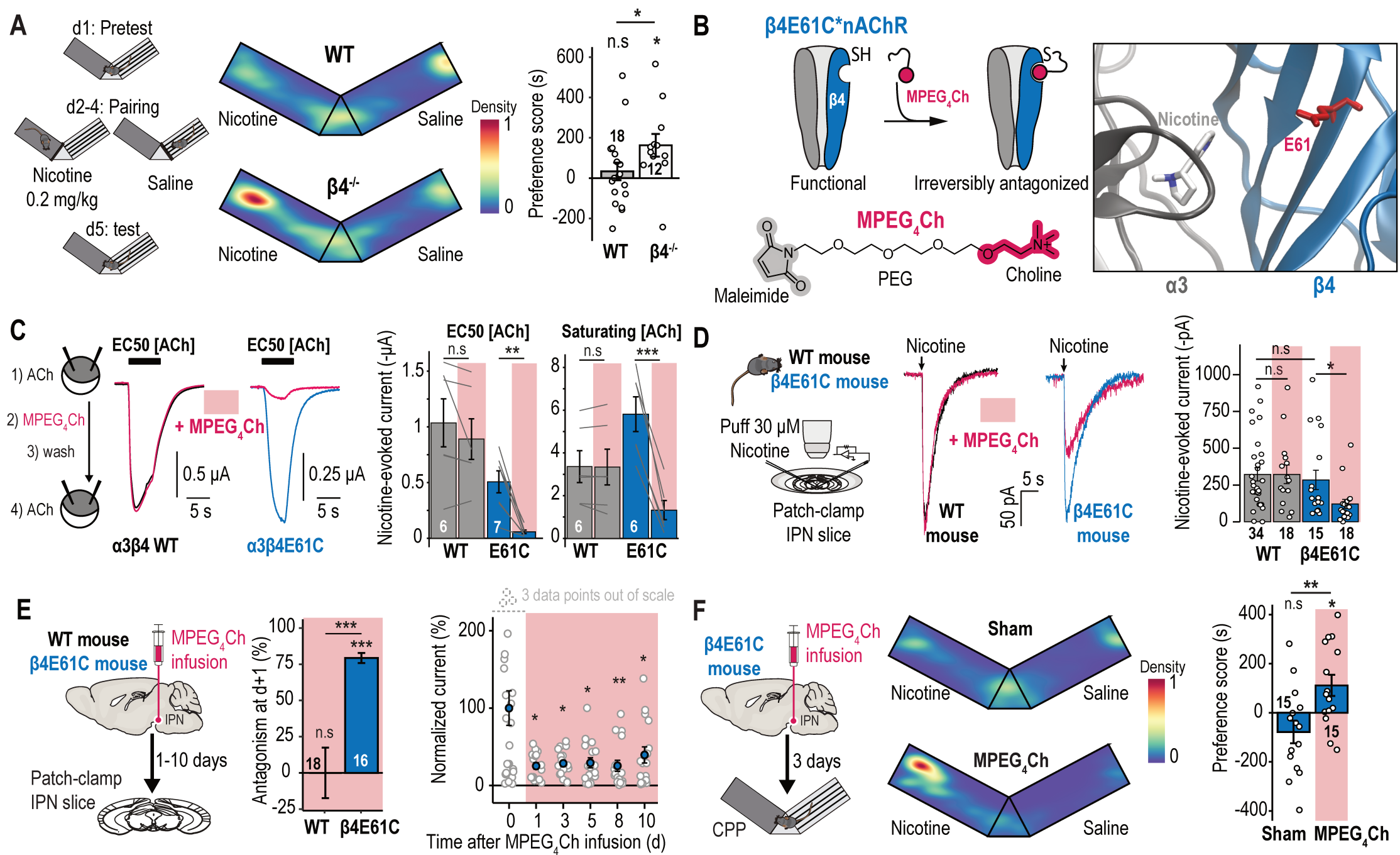


Figure 1

342 **Figure 2: $\beta 4$ -containing nAChRs are specifically involved in the activation of IPN**
343 **neurons by nicotine**

344 **A.** Left, schematics of the microdrive multielectrode manipulator setup for tetrode recordings.
345 Middle, a blue dye was injected at the recording site coordinates. Right, two IPN neurons
346 recorded simultaneously on two channels, one activated (blue) and one inhibited (red) by
347 nicotine.

348 **B.** Distribution of the responses to i.v. injections of nicotine or saline.

349 **C.** Time course (left) and firing frequency variation (right) after i.v. nicotine (or saline)
350 injections, for nicotine-activated and -inhibited IPN neurons.

351 **D.** Variation in firing frequency for nicotine-activated and -inhibited IPN neurons, following
352 i.v. injections of different doses of nicotine. Neurons were classified as activated or inhibited
353 based on their response at the 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose (or alternatively 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for a few neurons not
354 recorded at 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

355 **E.** Left, infusion of MPEG₄Ch (or saline for controls) in the IPN of $\beta 4\text{E}61\text{C}$ mice, followed by
356 tetrode recordings in the IPN. Middle, time course of responses to nicotine injection. Right,
357 cumulative fraction of the percent change in firing rate in response to nicotine injection.

358 **F.** Maximum amplitude of activation or inhibition following an i.v. injection of nicotine or
359 saline.

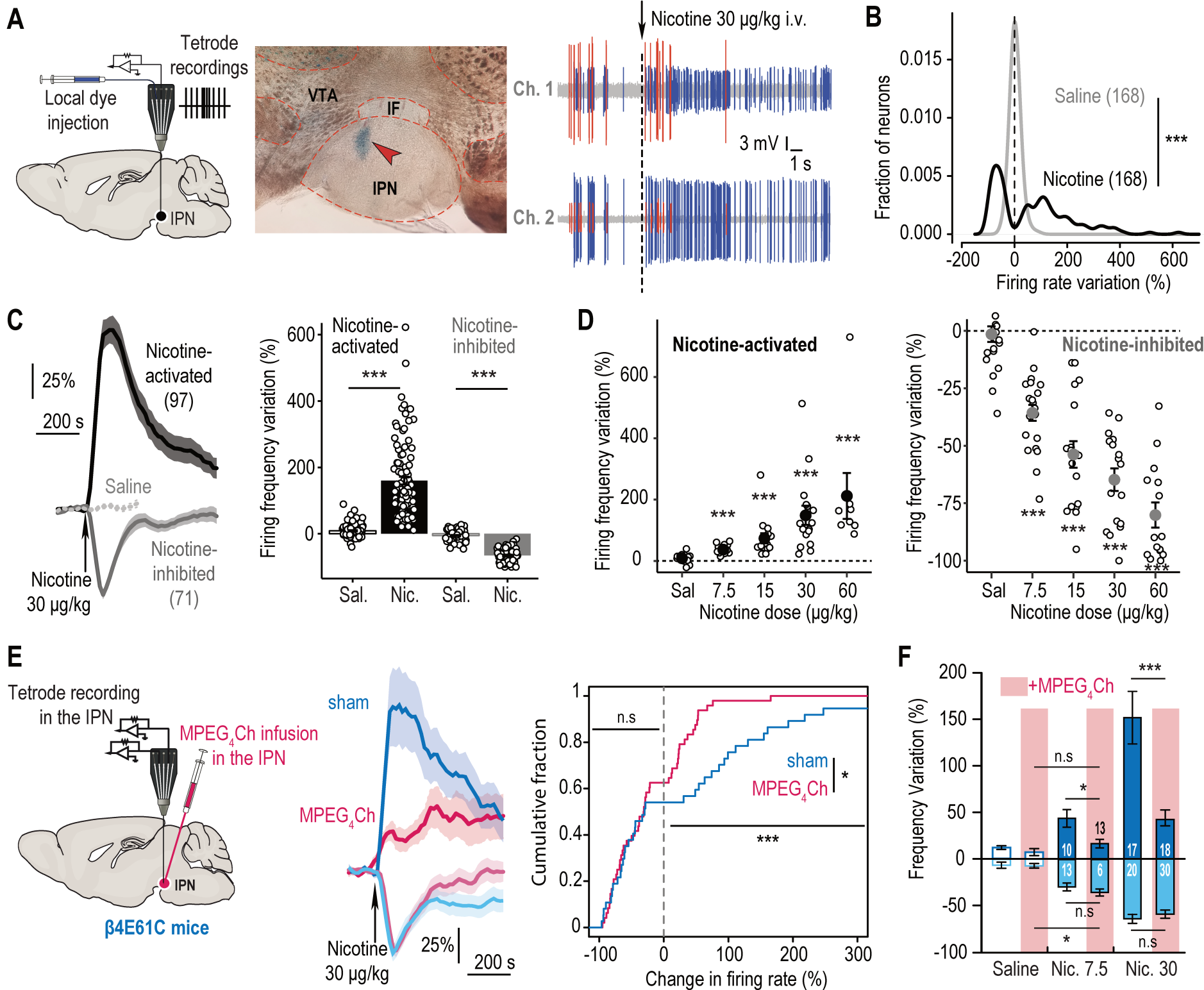


Figure 2

360 **Figure 3: The IPN decreases the VTA response to nicotine.**

361 **A.** Transduction of the IPN with AAV1-hSyn-GCaMP7c, followed by implantation of the optic
362 fiber, and a representative coronal brain slice showing the fiber tip and proper expression of
363 GCaMP7c. Time course (middle) and maximum amplitude (right) of the GCaMP7c response
364 after i.v. injection of nicotine at different doses.

365 **B.** Same as in A) but for the VTA.

366 **C.** Top left, simultaneous tetrode recordings with one electrode in the IPN and another one in
367 the VTA. Representative (bottom left) and average (right) change in firing frequency in IPN
368 and pDA neurons following i.v. injection of nicotine.

369 **D.** Time course (left) and average change (right) of the response of IPN and VTA neurons to
370 an i.v. injection of 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nicotine or saline.

371 **E.** Left, tetrode recordings in the VTA following local infusion of MPEG₄Ch into the IPN of a
372 β4E61C mouse. Middle, time course of the response to an i.v. injection of 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nicotine
373 (or saline). Only about a third (6/16) of the pDA neurons responded to the nicotine injection in
374 sham-treated mice, whereas almost all of them (18/19) responded in MPEG₄Ch-treated mice.
375 Right, average response to an i.v. injection of nicotine or saline.

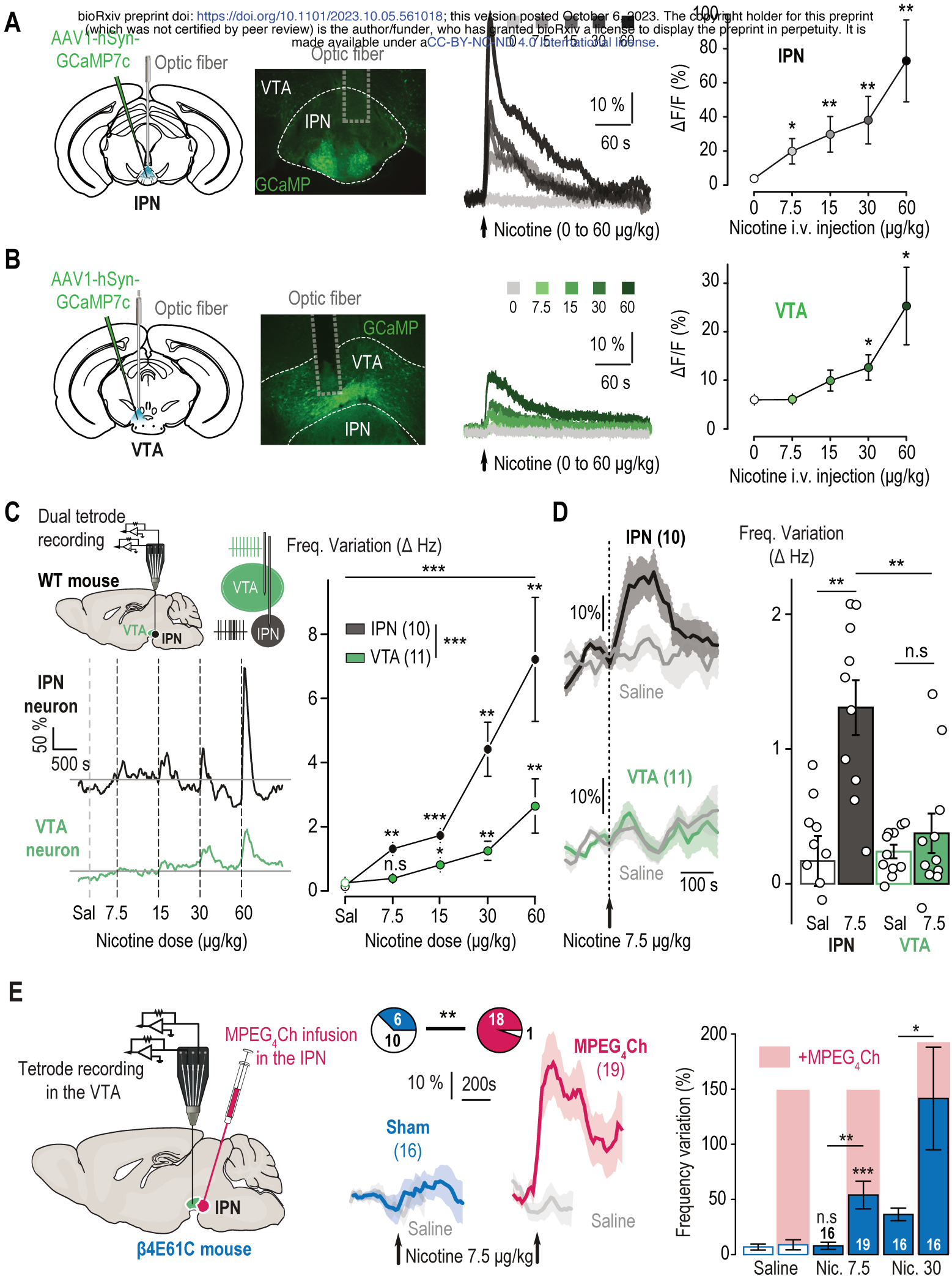


Figure 3

376 **STAR Methods**

377

378 Animals

379 Mice were housed at 18-23 °C under a 12-hour light/dark cycle, with food and water available
380 ad libitum. WT mice were on the C57BL/6 N genetic background. Female and male mice were
381 used for the electrophysiological recordings, whereas only male mice were used for the fiber
382 photometry and behavioral experiments. All behavioral tests were conducted during the light
383 period of the animal cycle. All procedures for animal maintenance, surgery and behavioral tests
384 used protocols that were in accordance with the recommendations for animal experiments
385 issued by the European Commission directives 2010/63, and approved by Sorbonne University
386 and Paris Sciences et Lettres (PSL) University.

387

388 The transgenic mouse line Chrnb4E61C was produced on a C57BL/6 N genetic background
389 using homologous recombination, at the core facility Phenomin (Institut Clinique de la Souris,
390 Illkirch, France). Exons 3 and 4 were fused in both lines to prevent alternative splicing, owing
391 to the overlap between the codon for E61 and the splice acceptor site. The following primers
392 were used to genotype Chrnb4E61C mice: forward 5'-
393 CCAAGAGAGATTTAGGTGACAGCTGG-3' and reverse 5'-
394 CCTAACTCTAGACTTTGGCCACCCC-3'. Mice were bred as homozygotes.

395

396 Chemicals

397 MPEG₄Ch (maleimide - tetraethylene glycol - choline) chloride (purity 99.8%) was custom-
398 synthesized by Broadpharm (San Diego, CA) and stored at -20°C in water-free DMSO. The
399 nicotine used for all experiments is a nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich, USA). For
400 tetrode and fiber photometry recordings, we performed i.v. injection of both nicotine (example

401 dose of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and saline (water with 0.9% NaCl) solutions. For the conditioned place
402 preference (CPP) paradigm, mice were injected intra-peritoneally (i.p.) with nicotine at 0.2
403 mg/kg and immediately placed in the apparatus. All solutions were prepared in the laboratory.

404

405 Two-electrode voltage-clamp

406 *Xenopus laevis* oocytes were obtained from EcoCyte Bioscience, Germany and from Tefor
407 Paris-Saclay UAR2010 and maintained in modified Barth's medium (87.34 mM NaCl, 1 mM
408 KCl, 0.66mM NaNO₃, 0.75 mM CaCl₂, 0.82mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES
409 pH 7.6). Defolliculated oocytes were submitted to intranuclear injection of ~2-6 ng of cDNA
410 and kept at 18 °C for 2-3 days before recording.

411 Recordings were performed with a Digidata 1550A digitizer (Molecular Devices), an Axon
412 Instruments GeneClamp 500 amplifier (Molecular Devices), an automated voltage-controlled
413 perfusion system which controls an 8-port and a 12-port electric rotary valve (Bio-Chem
414 Fluidics) both connected to a 2-way 4-port electric rotary valve (Bio-Chem Fluidics) and the
415 pClamp 10.6 software (Molecular Devices).

416 Electrode pipettes were pulled using a Narishige PC-10 puller. Oocytes were perfused with
417 Ringer's buffer (100 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH
418 7.3). MPEG₄Ch solutions were applied after dilution in Ringer's buffer and all currents were
419 measured at a holding potential of -60mV.

420 For all the experiments, the oocytes were perfused with Ringer's buffer for 30 s, then 5 s with
421 acetylcholine (concentrations as indicated in the figures) followed by a 1 to 2-minute wash. For
422 the experiments with MPEG₄Ch, the oocytes were first perfused with acetylcholine followed
423 by a 1 to 2-minute wash, then treated with a perfusion of 5 min with MPEG₄Ch (15 μM in
424 Ringer's), followed by another 1-2 minute wash and a 5 s acetylcholine perfusion.
425 Acetylcholine responses were measured at the peak of the response.

426

427 Patch-clamp electrophysiology

428 Mice were deeply anesthetized with an i.p. injection of a mixture of ketamine (150 mg/kg,
429 Imalgene 1000, Merial) and xylazine (60 mg/kg, Rompun 2%, Bayer). Coronal midbrain
430 sections (250 μ m) were sliced using a Compressstome (VF-200; Precisionary Instruments) after
431 intra-cardiac perfusion of cold (0-4°C) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (aCSF)
432 containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 5.9 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 25 sucrose,
433 2.5 glucose, 1 kynurenate. After 10 min at 35°C for recovery, slices were transferred into
434 oxygenated (95% CO₂/ 5% O₂) aCSF containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄,
435 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 15 sucrose, 10 glucose at room temperature for the rest of the
436 day. Slices were labeled individually with MPEG₄Ch (50 μ M) in oxygenated aCSF for 10 min,
437 and transferred to a recording chamber continuously perfused at 2 ml/min with oxygenated
438 aCSF.

439 Patch pipettes (5-8 M Ω) were pulled from thin-wall borosilicate glass (G150TF-3, Warner
440 Instruments) using a micropipette puller (P-87, Sutter Instruments) and filled with a K-
441 gluconate based intra-pipette solution containing (in mM): 135 KGlu, 10 HEPES, 0.1 EGTA,
442 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 ATP-Mg, 0.2 GTP-Na and 2 mg/mL biocytin (pH adjusted to 7.35). Cells
443 were visualized using an upright microscope with a Dodt contrast lens and illuminated with a
444 white light source (Scientifica). Whole-cell recordings were performed using a patch-clamp
445 amplifier (Axoclamp 200B, Molecular Devices) connected to a Digidata (1550 LowNoise
446 acquisition system, Molecular Devices). Currents were recorded in voltage-clamp mode at -60
447 mV. Signals were low-pass filtered (Bessel, 2 kHz) and collected at 10 kHz using the data
448 acquisition software pClamp 10.5 (Molecular Devices). Electrophysiological recordings were
449 extracted using Clampfit (Molecular Devices) and analyzed with R. To record nicotinic currents
450 from IPN neurons, local puffs (200 ms) of nicotine tartrate (30 μ M in aCSF, Sigma-Aldrich)

451 were applied every minute, using a glass pipette (2-3 μm diameter) positioned 20 to 30 μm
452 away from the soma and connected to a picospritzer (World Precision Instruments, adjusted to
453 ~ 2 psi).

454

455 Stereotaxic surgeries

456 For virus and MPEG₄Ch injections, as well as for optic fiber implantations, mice were exposed
457 to a gas mixture of oxygen (1 L/min) and 3% isoflurane (Piramal Healthcare, UK) for induction
458 of anesthesia, and then placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA, USA) under
459 1% isoflurane to maintain proper anesthesia throughout the surgery. A local anesthetic
460 (Lurocaine®, 100 μL at 0.67 mg/kg) was applied at the location of the scalp incision before the
461 procedure. A median incision revealed the skull which was drilled at the level of the targeted
462 structure. At the end of the surgery, an analgesic solution of buprenorphine (Buprecare®, 1
463 mg/kg) was injected subcutaneously to prepare awakening, and supplemented the following
464 recovery days if necessary.

465

466 Tetrode recordings

467 Mice were deeply anaesthetized with i.p. injection of chloral hydrate (8%, 400 mg/kg),
468 supplemented as required to maintain optimal anesthesia throughout the experiment. After
469 placement of the animal in the stereotaxic apparatus, the saphenous vein was catheterized (30G
470 needle fitted into polyethylene tubing PE10 connected to a Hamilton syringe) for i.v.
471 administration of either saline or nicotine. The scalp was opened and a hole was drilled in the
472 skull above the location of the targeted structure (IPN and/or VTA). Experiments were carried
473 out with a Thomas Recording Mini-Matrix fitted with independently movable tetrodes (Tip
474 shape A, Z = 1-2 M Ω) to record neuronal activity, and a stainless-steel cannula (OD 120 μm)
475 for MPEG₄Ch and dye injections. Each recording consisted in a baseline period of 5 minutes

476 before injection of either saline or nicotine, selected pseudo-randomly. Subsequent injections
477 were spaced by at least 5 minutes after saline and 15 minutes after nicotine. For nicotine dose-
478 response experiments, mice received two to four injections of nicotine at doses of 7.5, 15, 30
479 and/or 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (pseudo-randomly administered).

480 Electrophysiological signals were acquired with a 20-channel pre-amplifier included in the
481 Mini Matrix connected to an amplifier (Digital Lynx SX 32 channels, Neuralynx) digitized and
482 recorded using Cheetah software (Neuralynx). Spikes were detected (CSC Spike Extractor
483 software, Neuralynx) and sorted using a classical principal component analysis associated with
484 a cluster cutting method (SpikeSort3D software, Neuralynx). The electrophysiological activity
485 was sampled in the VTA (coordinates: 3.0 to 3.4 mm posterior to bregma, 0.3 to 0.6 mm lateral
486 to midline, and 4 to 4.8 mm below brain surface) and in the IPN (coordinates: 3.3 to 3.6 mm
487 posterior to bregma, 0.35 to 0.5 mm lateral to midline, and 4.2 to 4.9 mm below brain surface).
488 We used a 5° angle for both IPN and simultaneous IPN plus VTA recordings.

489 Firing frequency was measured on successive windows of 60 s shifted by 15-s time steps (45 s
490 overlapping period). Basal neuronal activity was defined on at least five-minute recording. For
491 each neuron, the firing frequency was rescaled as a percentage of its baseline value averaged
492 during 3 minutes before i.v. injection. The responses to both saline and nicotine are thus
493 presented as a percentage of variation from baseline (mean \pm S.E.M.). To classify neurons as
494 “activated” or “inhibited”, we performed the following analysis. First, we calculated the
495 maximal variation from the baseline per neuron, within the first 3 minutes following nicotine
496 injection. Neurons displaying an increase in firing frequency were defined as activated, while
497 neurons displaying a decrease in firing frequency were defined as inhibited. For the dose-
498 response curves, neurons were classified as activated or inhibited based on their response to the
499 highest nicotine dose received. For saline injections, the polarity of the variation was defined
500 based on the response to nicotine (i.e., in activated neurons, we considered that saline also

501 increased activity). We used a bootstrapping method to identify neurons that significantly
502 responded to nicotine injections. Baseline spike intervals were randomly shuffled 1000 times.
503 For each neuron we determined the percentile from the shuffled data corresponding to the
504 nicotine-evoked response (maximum or minimum frequency after nicotine injection). Neurons
505 were individually considered as responsive to nicotine injection if this percentile was ≥ 0.98
506 (activated) or ≤ 0.02 (inhibited). The effect of nicotine was assessed by comparing the
507 maximum of firing frequency variation induced by nicotine and saline injection. For activated
508 (respectively inhibited) neurons, the maximal (respectively minimal) value of firing frequency
509 was measured within the response period (3 minutes) that followed nicotine or saline injection.
510 To assess the proper location of recordings, injections of dye (Chicago Sky Blue 6B, Sigma-
511 Aldrich) were performed at the mean stereotaxic coordinates of recordings (500 nL at 10 nL/s).
512 Recordings in mice where dye location was outside of the targeted structure were excluded
513 from the analysis. Spontaneously active pDA neurons were identified on the basis of previously
514 established electrophysiological criteria (regular firing rate; firing frequency between 1 and 10
515 Hz) and proper *post hoc* dye location in the VTA. For chemogenetic experiments, MPEG₄Ch
516 was infused (250 μ M in aCSF at the rate of 10 nL/s) within either the VTA (500 nL) or the IPN
517 (700 nL) at least an hour before recordings started. All the data were analyzed with R
518 (<https://www.r-project.org>).

519

520 Fiber photometry

521 8-week-old WT mice were injected with AAV1-syn-jGCaMP7c (pGP-AAV-syn-jGCaMP7c
522 variant 1513-WPRE, titer 1.1×10^{13} vg/mL, Addgene, MA, USA,
523 <https://www.addgene.org/105321/>) in either the VTA (AP -3.10 mm, ML \pm 0.5 mm, DV -4.5
524 mm from bregma, 1 μ L, 100 nL/min) or the IPN (AP - 3.50 mm, ML \pm 0.40 mm, DV - 4.7 mm
525 from bregma, 700 nL, 100 nL/min). Optical fibers (200 μ m core, NA = 0.39, Thor Labs)

526 coupled to a stainless-steel ferule (1.25 mm diameter) were implanted after virus injection
527 slightly above (0.05 to 0.2 mm) those coordinates, and fixed to the skull with dental cement
528 (SuperBond, Sun medical). Recordings started at least 4 weeks after surgery.

529 Fluorescent levels were recorded using a Doric Lenses 1-site 2-color fiber photometry system.
530 The fiber photometry console was connected to the LED driver to control two connectorized
531 LED in lock-in mode (CLEDs, 405 nm CLED modulated at 333.786 Hz and 465 nm CLED
532 modulated at 220.537 Hz) that were connected to their respective ports on the Mini Cube
533 through an optic patch cord. Light stimulation and recorded fluorescence were transmitted
534 through an optical fiber (400 μm core, NA = 0.39, Thorlabs) connected both to the animal's
535 implanted optical fiber via a zirconia sleeve and to the sample port on the Mini Cube. Finally,
536 the photoreceiver converting recorded light to electrical signals (AC Low setting, New Focus
537 2151 Visible Femtowatt Photoreceiver, New Focus, San Jose, CA, USA) was connected to the
538 Mini Cube through an optic path cord (600 μm core, NA = 0.48, FC-FC, Doric Lenses) fitted
539 on a fiber optic adapter (Doric Lenses) and to the fiber photometry console. Signal was acquired
540 through Doric Neuroscience Studio software (version 5.2.2.5) with a sampling rate of 12.0 kS/s
541 (kilosamples per second) and a low-pass filter with a cutoff frequency of 12.0 Hz.

542 We assessed changes in GCaMP activity in response to i.v. injections of saline or nicotine. Mice
543 were deeply anesthetized with an i.p. injection of chloral hydrate (8%, 400 mg/kg),
544 supplemented as required to maintain optimal anesthesia throughout the experiment.
545 Intravenous administration of saline or nicotine was carried out through a catheter (30G needle
546 connected to polyethylene tubing PE10) connected to a Hamilton syringe, into the saphenous
547 vein of the animal. The injection protocol was the same as in tetrode recordings.

548 All fiber photometry data were analyzed on R software. First, data were down-sampled by a
549 100-factor. We subtracted the mean value of "autofluorescence" (signal acquired after each
550 recording with the same parameters, but without the optic fiber attached to the mouse) to the

551 signal. We then fitted an exponential to this signal and subtracted it before adding an offset
552 equal to the mean of the signal before detrending to account for the slow decay of the signal
553 due to bleaching during recording. We defined a baseline fluorescence value (F_0) as the mean
554 fluorescence of the signal during 120 s before injection time, for each injection (saline and
555 nicotine) individually. We then calculated normalized variation in fluorescence ($\Delta F/F$) as $(F -$
556 $F_0)/F_0$ for each injection. The analysis was carried out by averaging each $\Delta F/F$ obtained for
557 each condition (all saline or nicotine injections done in IPN implanted ($n = 7$) mice, same for
558 saline or nicotine in VTA ($n = 5$) mice) and mean data were smoothed using a normal kernel fit
559 (bandwidth = 120). For each injection (saline and nicotine), maximum fluorescence was
560 detected within a 180 s window after injection.

561

562 Conditioned place preference (CPP)

563 The conditioned place preference (CPP) experiments were performed in a Y-maze apparatus
564 (Imetronic, Pessac, France) with one closed arm and two other arms with manually operated
565 doors. Two rectangular chambers (11 x 25 cm) with different cues (texture and color) are
566 separated by a center triangular compartment (side of 11 cm) used as a neutral compartment.
567 One pairing compartment has grey textured floor and walls and the other one has smooth black
568 and white striped walls and floor. The CPP apparatus was illuminated at 100 lux during the
569 experiments. All animals were handled for at least five days before starting the experiment. The
570 first day (pretest) of the experiment, without previous habituation to the apparatus, mice ($n =$
571 6-8 animals/group) explored the environment for 900 s (15 min) and the time spent in each
572 compartment was recorded. Conditioning was unbiased: pretest data were used to segregate the
573 animals with equal bias so each group has an initial preference score almost null, indicating no
574 preference on average. On day 2, 3 and 4, animals received an i.p. injection of saline (0.9%
575 NaCl) or nicotine tartrate (0.2 mg/kg, in saline), and were immediately confined to one of the

576 pairing chambers for 1200 s (20 min). Groups were balanced so that animals did not all receive
577 nicotine in the same chamber. On the same day, at least 5 hours after the first pairing, mice
578 received an injection of the alternate solution (nicotine or saline) and were placed in the opposite
579 pairing chamber. On day 5 (test), animals were allowed to freely explore the whole apparatus
580 for 900 s (15 min), and the time spent in each chamber was recorded. The preference score is
581 expressed in seconds and is calculated by subtracting pretest from test data. Trajectories and
582 time spent on each side are calculated based upon animal detection. Place preference and
583 locomotor activity were recorded using a video camera, connected to a video-track system. A
584 home-made software (Labview 2014, National Instruments) tracked the animal, recorded its
585 trajectory (30 frames per s) for the duration of each session.

586 For chemogenetic experiments, MPEG₄Ch (250 μM in aCSF, 700 nL at 100 nL/min) or an
587 equivalent volume of aCSF was injected under light gas anesthesia 3 days before the start of
588 CPP paradigm. The experiments were performed in a double-blind fashion. Behavioral data
589 were collected using home-made LabVIEW (National Instruments) and analyzed using
590 ezTrack⁴⁵.

591

592 Open field and elevated o-maze tests

593 The open field test was run one week before the o-maze test, on the same batch of animals (n =
594 7-8/group). All animals were handled for at least five days before starting the open field test.
595 The open field consisted of a circular arena (74 cm diameter), illuminated at 100 lux. Each
596 mouse could move freely in the apparatus for 15 minutes. Total distance traveled (m), and time
597 spent in the center area (diameter of 44 cm) were measured.

598

599 The elevated O-maze (EOM) apparatus consists of two open (stressful) and two enclosed
600 (protecting) elevated arms that together form a zero or circle (diameter of 47 cm, height of 52

601 cm, 7 cm-wide circular platform). The EOM apparatus was illuminated at 150 lux in open arms
602 and at 120 lux in closed arms. Mice were placed in the o-maze apparatus and recorded for
603 15 minutes. The time spent exploring the open arms, which indicates the anxiety level of the
604 animal, was measured. Behavioral data was collected using a video camera, connected to a
605 video-track system. LabVIEW (National Instruments) was used to track the animals and record
606 their trajectory (30 frames per s) for the duration of each test. All data was analyzed using
607 ezTrack⁴⁵.

608

609

610 Immunostaining

611 After euthanasia, brains were rapidly removed and fixed in 4% paraformaldehyde. After a
612 period of at least three days of fixation at 4°C, serial 60- μ m sections were cut from the midbrain
613 with a vibratome. Immunostaining experiments were performed as follows: free-floating brain
614 sections were incubated for 1 hour at 4°C in a blocking solution of phosphate-buffered saline
615 (PBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma; A4503) and 0.2% Triton X-100, and
616 then incubated overnight at 4°C with a chicken anti-GFP antibody (Life technologies Molecular
617 Probes, A-6455) at 1:500 dilution, in PBS containing 1.5% BSA and 0.2% Triton X-100. The
618 following day, sections were rinsed with PBS, and then incubated for 3 hours at 22-25°C with
619 Alexa488-conjugated anti-chicken secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 711-225-
620 152) at 1:1000 dilution in a solution of 1.5% BSA in PBS. After three rinses in PBS, slices were
621 wet-mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930). Microscopy was
622 carried out with an epifluorescent microscope (Leica), and images captured using a camera and
623 analyzed with ImageJ.

624

625 Statistical analysis

626 All statistical analyses were carried out using the R software with home-made routines. No
627 statistical methods were used to predetermine sample sizes. In all figures, data are plotted as
628 mean \pm SEM. Total number (n) of observations in each group and statistics used are indicated
629 in figure and/or figure legend. Unless otherwise stated, comparisons between means were
630 carried out using parametric tests (Student's t-test, one-way or two-way repeated measures
631 ANOVA) when parameters followed a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test with p
632 > 0.05), and non-parametric tests (here, Wilcoxon or Mann-Whitney U-test) when this was not
633 the case. Homogeneity of variances was tested preliminarily and the t-tests were Welch-
634 corrected if needed. Likewise, one-sample comparisons to 0 were carried out using a t-test when
635 the parameter followed a normal distribution and with a Wilcoxon test otherwise. Multiple
636 comparisons were Holm-Bonferroni corrected. Comparison between the cumulative
637 distributions was carried out using a Kolmogorov-Smirnov test (p > 0.05 was considered to be
638 not statistically significant). Proportion of nicotine-activated VTA neurons in sham versus
639 MPEG₄Ch experiments (Figure 3E) were compared with Pearson's Chi-squared test.

640 **Supplementary figures**

641 **Figure S1: New chemogenetic tools for nAChR control.**

642 **A.** Chemical structures of the photoswitchable tethered ligand MAHoCh (top)³⁰ and the suicide
643 antagonist MPEG₄Ch (bottom).

644 **B.** Bottom, acetylcholine dose-response curve for $\alpha 3\beta 4$ ($EC_{50} = 82 \mu M$, $n_H = 1.7$) and
645 $\alpha 3\beta 4E61C$ ($EC_{50} = 120 \mu M$, $n_H = 1.7$) recorded in *Xenopus* oocytes.

646 **C.** Top, glutamate at position 61 in the $\beta 4$ nAChR subunit was mutated to cysteine (E61C).

647 Bottom, PCR to genotype the $\beta 4E61C$ mutant mouse.

648 **D.** Representative voltage-gated potassium currents (left) and current-voltage relationship
649 (right) recorded from IPN neurons of WT and $\beta 4E61C$ mice.

650 **E.** Membrane resistance of IPN neurons from WT and $\beta 4E61C$ mice.

651 **F.** Resting membrane potential of IPN neurons from WT and $\beta 4E61C$ mice.

652 **G.** Representative (left) and average (right) firing frequency vs. current relationships recorded
653 from IPN neurons of WT and $\beta 4E61C$ mice.

654 **H.** Open field test. Total distance traveled and time spent in the center for WT and $\beta 4E61C$
655 mice.

656 **I.** Time spent in the open arm of the elevated O-maze for WT and $\beta 4E61C$ mice.

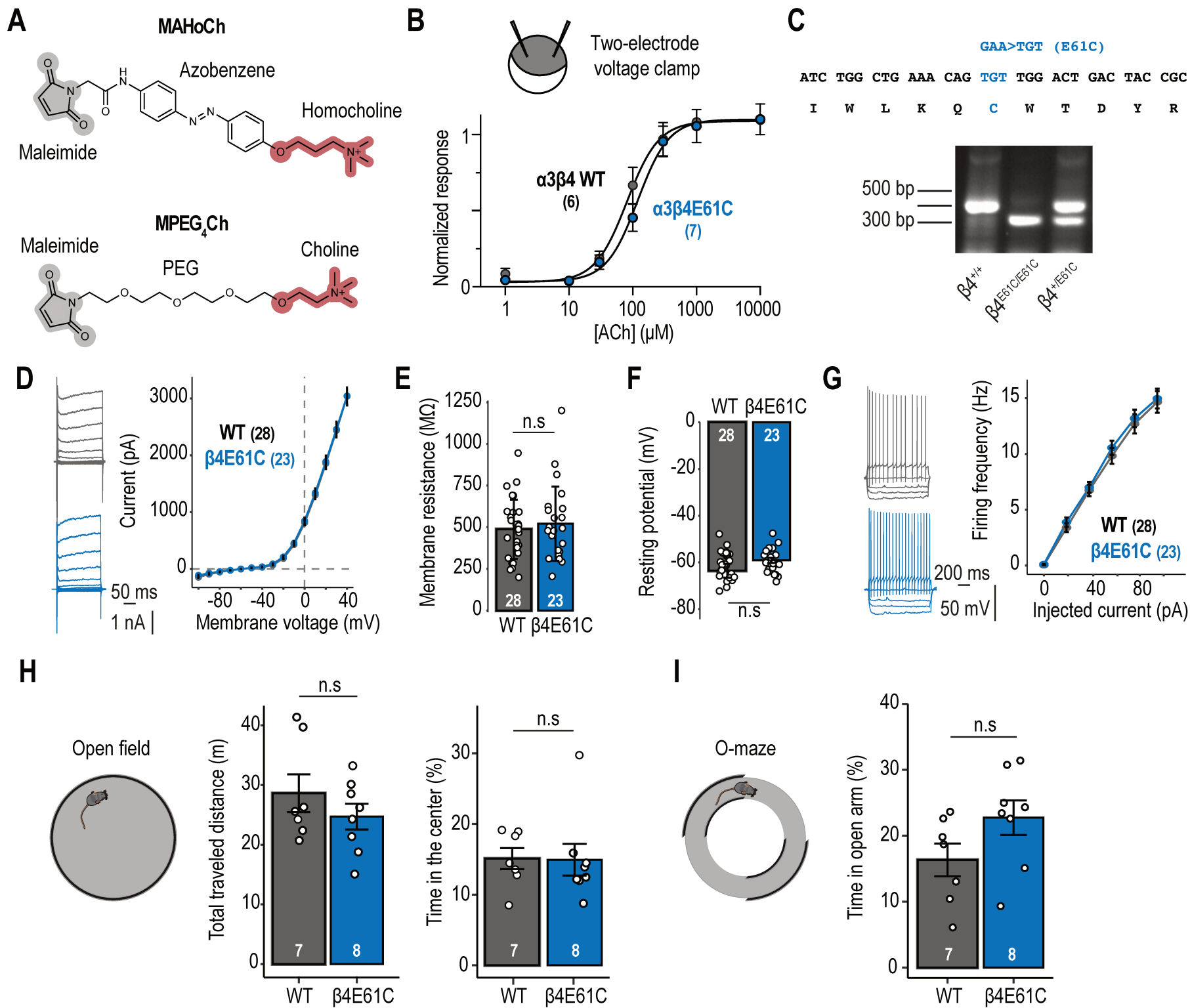


Figure S1

657 **Figure S2: Electrophysiological characterization of the response of IPN neurons to**
658 **nicotine injection.**

659 **A.** Firing rate under basal conditions and after saline or nicotine injections, for nicotine-
660 activated and -inhibited IPN neurons.

661 **B.** Basal firing frequency of nicotine-activated and -inhibited IPN neurons.

662 **C.** Correlation between the basal firing frequency and the change in firing frequency following
663 an injection of nicotine, for nicotine-activated and inhibited neurons.

664 **D.** Time course (left) and firing frequency variation (right) after i.v. nicotine (or saline)
665 injections, for nicotine-activated and -inhibited IPN neurons of WT mice treated or not with
666 MPEG₄Ch in the IPN.

667 **E.** Spontaneous activity of nicotine-activated and -inhibited IPN neurons of β E61C mice, with
668 and without MPEG₄Ch treatment.

Nicotine-activated (97)

Nicotine-inhibited (19)

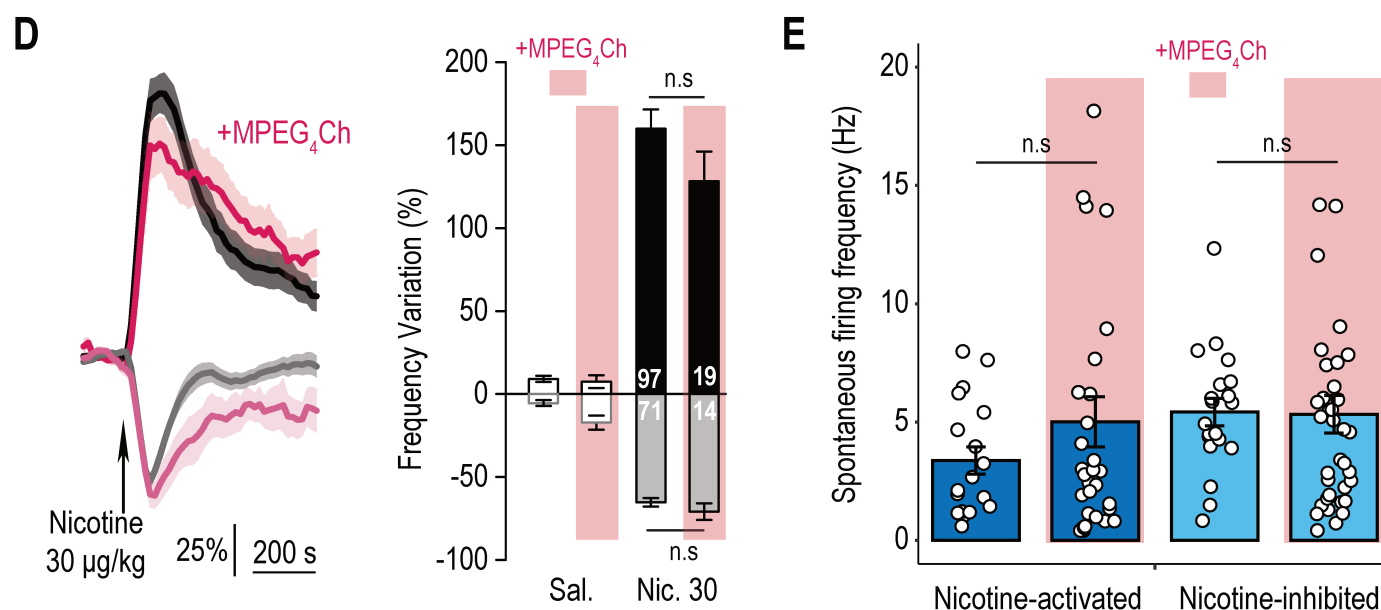
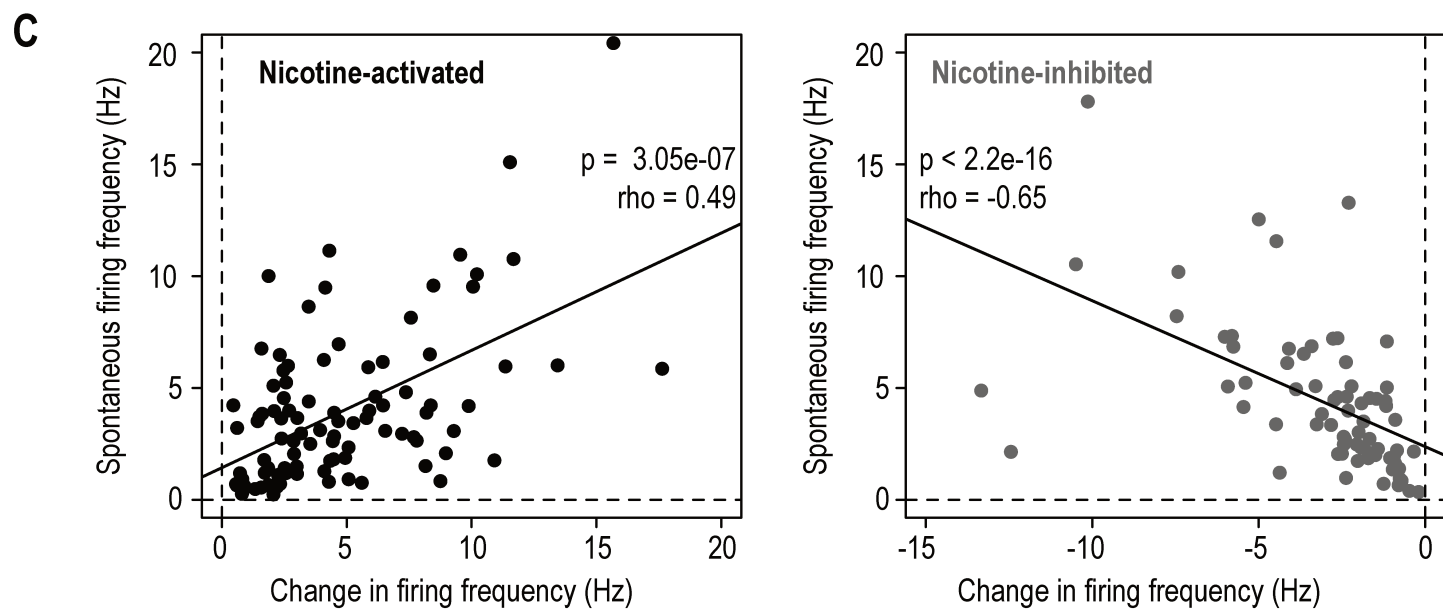
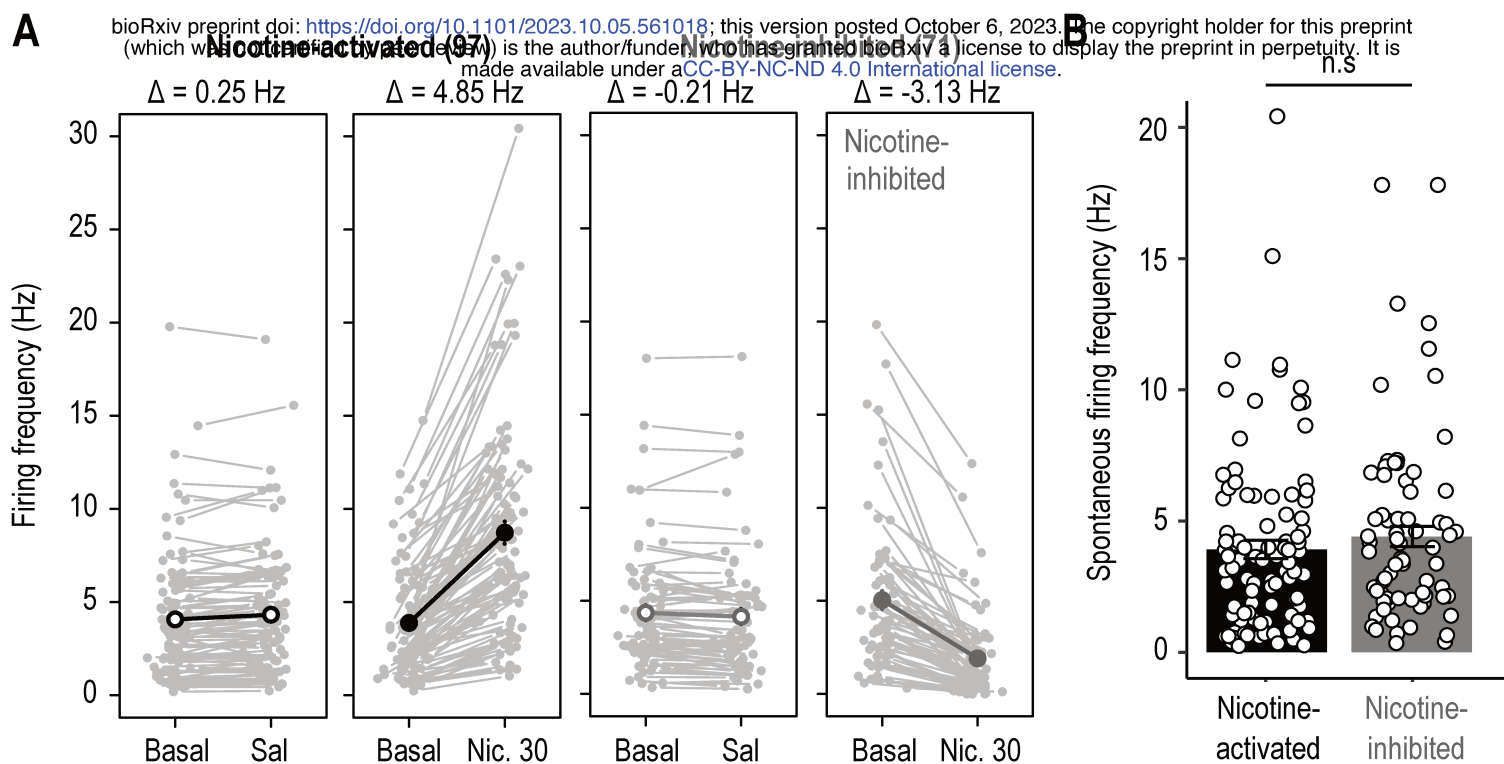


Figure S2

669 **Figure S3: Effect of MPEG₄Ch in other brain structures.**

670 **A.** Left, tetrode recording in the VTA of β 4E61C mice, after infusion of MPEG₄Ch in the VTA.

671 Right, firing rate variation from baseline induced by nicotine or saline i.v. injection, in VTA

672 neurons of β 4E61C mice infused with MPEG₄Ch in the VTA. β 4E61C mice infused with ACSF

673 (Sham) in the IPN were used as controls (same as in Figure 3E).

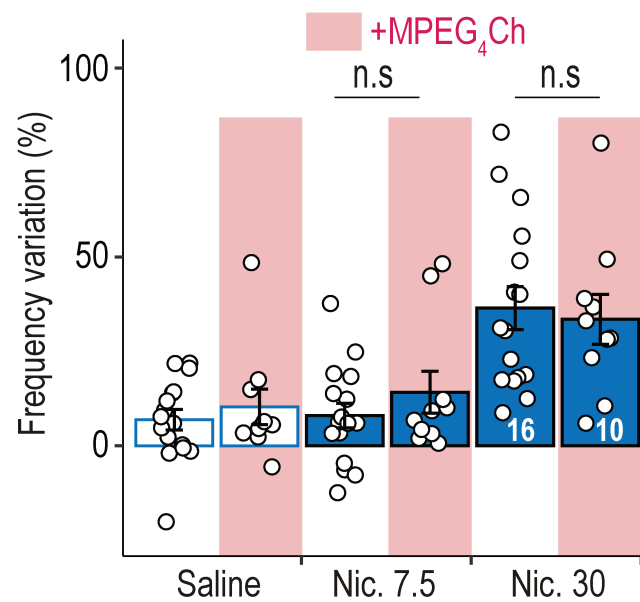
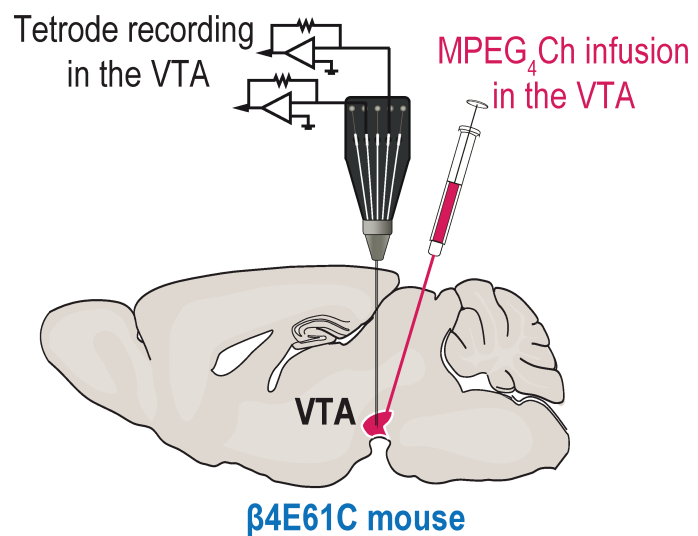
674 **B.** Left, patch-clamp recording in MHb slices from β 4E61C mice. Right, average current

675 induced by a puff of nicotine (30 μ M) for MHb control slices, compared with that recorded

676 from MHb slices of β 4E61C mice infused with MPEG₄Ch in the IPN, and with that recorded

677 from MHb slices directly treated with MPEG₄Ch.

A



B

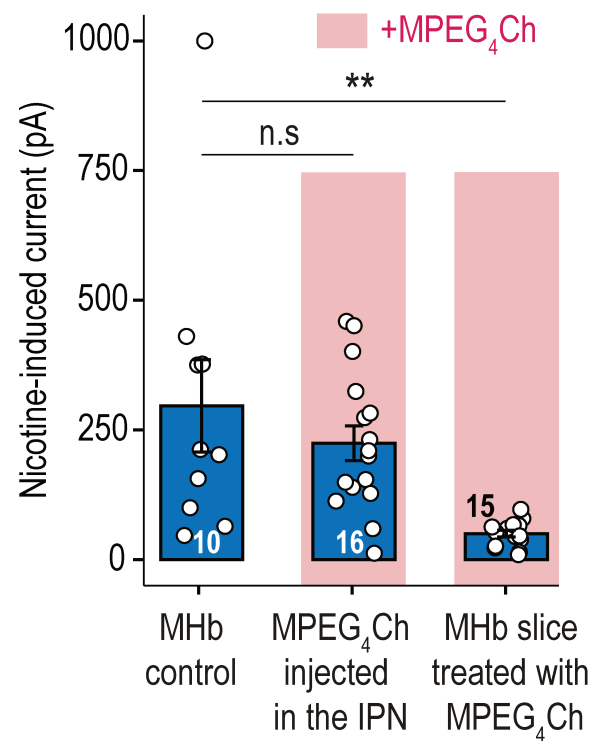
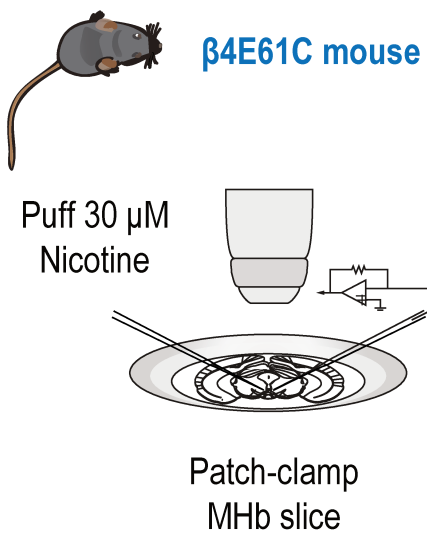


Figure S3

678 **References**

679

680 1. WHO report on the global tobacco epidemic, 2021: addressing new and emerging products
681 (2021).

682 2. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., and Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic
683 receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug*
684 *Discov* 8, 733–750. [10.1038/nrd2927](https://doi.org/10.1038/nrd2927).

685 3. Volkow, N.D., and Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction.
686 *Cell* 162, 712–725. [10.1016/j.cell.2015.07.046](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046).

687 4. Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A.,
688 Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005). Nicotine reinforcement and
689 cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103–107.
690 [10.1038/nature03694](https://doi.org/10.1038/nature03694).

691 5. Wills, L., Ables, J.L., Braunscheidel, K.M., Caligiuri, S.P.B., Elayouby, K.S., Fillinger, C.,
692 Ishikawa, M., Moen, J.K., and Kenny, P.J. (2022). Neurobiological Mechanisms of Nicotine
693 Reward and Aversion. *Pharmacological Reviews* 74, 271–310.
694 [10.1124/pharmrev.121.000299](https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299).

695 6. Cuttoli, R.D., Mondoloni, S., Marti, F., Lemoine, D., Nguyen, C., Naudé, J., d’Izarny-
696 Gargas, T., Pons, S., Maskos, U., Trauner, D., et al. (2018). Manipulating midbrain dopamine
697 neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors.
698 *eLife* 7. [10.7554/elife.37487](https://doi.org/10.7554/elife.37487).

699 7. Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson,
700 M., Besson, M., Reperant, C., et al. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons
701 mediates nicotine reinforcement. *Mol Psychiatry* 18, 382–393. [10.1038/mp.2012.83](https://doi.org/10.1038/mp.2012.83).

702 8. Tapper, A.R., McKinney, S.L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C.,
703 Whiteaker, P., Marks, M.J., Collins, A.C., and Lester, H.A. (2004). Nicotine activation of
704 alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 306, 1029–1032.
705 [10.1126/science.1099420](https://doi.org/10.1126/science.1099420).

706 9. Nguyen, C., Mondoloni, S., Borgne, T.L., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., Solié, C.,
707 Reynolds, L.M., Cuttoli, R.D., Tolu, S., et al. (2021). Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala
708 dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron* 109, 2604-2615.e9.
709 [10.1016/j.neuron.2021.06.013](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013).

710 10. Frahm, S., Ślimak, M.A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S.,
711 Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.-F., Tsetlin, V., et al. (2011). Aversion to Nicotine Is
712 Regulated by the Balanced Activity of beta4 and alpha5 Nicotinic Receptor Subunits in the
713 Medial Habenula. *Neuron* 70, 522–535. [10.1016/j.neuron.2011.04.013](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.013).

- 714 11. Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular $\alpha 5$
715 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* *471*, 597–601.
716 10.1038/nature09797.
- 717 12. Mondoloni, S., Nguyen, C., Vicq, E., Ciscato, M., Jehl, J., Cuttoli, R.D., Torquet, N.,
718 Tolu, S., Pons, S., Maskos, U., et al. (2023). Prolonged nicotine exposure reduces aversion to
719 the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus. *eLife* *12*,
720 e80767. 10.7554/elife.80767.
- 721 13. Wolfman, S.L., Gill, D.F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J.G., Bruchas,
722 M.R., and McGehee, D.S. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic
723 interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nature Communications* *9*, 2710.
724 10.1038/s41467-018-04654-2.
- 725 14. Tuesta, L.M., Chen, Z., Duncan, A., Fowler, C.D., Ishikawa, M., Lee, B.R., Liu, X.-A.,
726 Lu, Q., Cameron, M., Hayes, M.R., et al. (2017). GLP-1 acts on habenular avoidance circuits
727 to control nicotine intake. *Nature Neuroscience* *20*, 708–716. 10.1038/nn.4540.
- 728 15. Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M.,
729 Pedrazzi, P., Pucci, L., and Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain
730 neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* *78*, 703–711.
731 10.1016/j.bcp.2009.05.024.
- 732 16. Grady, S.R., Moretti, M., Zoli, M.M., Marks, M.J.M., Zanardi, A.A., Pucci, L.L.,
733 Clementi, F., and Gotti, C.C. (2009). Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a
734 large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the $\alpha 3\beta 4^*$ and
735 $\alpha 3\beta 3\beta 4^*$ subtypes mediate acetylcholine release. *J. Neurosci.* *29*, 2272–2282.
736 10.1523/jneurosci.5121-08.2009.
- 737 17. Salas, R., Pieri, F., Fung, B., Dani, J.A., and Biasi, M.D. (2003). Altered anxiety-related
738 responses in mutant mice lacking the $\beta 4$ subunit of the nicotinic receptor. *J. Neurosci.* *23*,
739 6255–6263.
- 740 18. Klink, R., d’Exaerde, A. de K., Zoli, M., and Changeux, J.-P. (2001). Molecular and
741 physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic
742 nuclei. *J. Neurosci.* *21*, 1452–1463.
- 743 19. Zoli, M., Pistillo, F., and Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes
744 in mammalian brain. *Neuropharmacology* *96*, 302–311. 10.1016/j.neuropharm.2014.11.003.
- 745 20. Husson, M., Harrington, L., Tochon, L., Cho, Y., Ibañez-Tallon, I., Maskos, U., and
746 David, V. (2020). $\beta 4$ -Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related
747 Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. *J. Neurosci.* *40*, 3465–3477.
748 10.1523/jneurosci.0356-19.2020.
- 749 21. Harrington, L., Viñals, X., Herrera-Solís, A., Flores, A., Morel, C., Tolu, S., Faure, P.,
750 Maldonado, R., Maskos, U., and Robledo, P. (2016). Role of $\beta 4^*$ Nicotinic Acetylcholine
751 Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice.
752 *Neuropsychopharmacology* *41*, 1790–1802. 10.1038/npp.2015.346.

- 753 22. Elayouby, K.S., Ishikawa, M., Dukes, A.J., Smith, A.C.W., Lu, Q., Fowler, C.D., and
754 Kenny, P.J. (2021). $\alpha 3^*$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenula-Interpeduncular
755 Nucleus Circuit Regulate Nicotine Intake. *J. Neurosci.* *41*, 1779–1787.
756 10.1523/jneurosci.0127-19.2020.
- 757 23. Glick, S.D., Sell, E.M., McCallum, S.E., and Maisonneuve, I.M. (2011). Brain regions
758 mediating $\alpha 3\beta 4$ nicotinic antagonist effects of 18-MC on nicotine self-administration.
759 *European Journal of Pharmacology* *669*, 71–75. 10.1016/j.ejphar.2011.08.001.
- 760 24. Grady, S.R., Drenan, R.M., Breining, S.R., Yohannes, D., Wageman, C.R., Fedorov, N.B.,
761 McKinney, S., Whiteaker, P., Bencherif, M., Lester, H.A., et al. (2010). Structural differences
762 determine the relative selectivity of nicotinic compounds for native $\alpha 4\beta 2^*$ -, $\alpha 6\beta 2^*$ -, $\alpha 3\beta 4^*$ -
763 and $\alpha 7$ -nicotine acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* *58*, 1054–1066.
764 10.1016/j.neuropharm.2010.01.013.
- 765 25. Ignatowska-Jankowska, B.M., Muldoon, P.P., Lichtman, A.H., and Damaj, M.I. (2013).
766 The cannabinoid CB2 receptor is necessary for nicotine-conditioned place preference, but not
767 other behavioral effects of nicotine in mice. *Psychopharmacology* *229*, 591–601.
768 10.1007/s00213-013-3117-6.
- 769 26. Tang, J., and Dani, J.A. (2009). Dopamine Enables In Vivo Synaptic Plasticity Associated
770 with the Addictive Drug Nicotine. *Neuron* *63*, 673–682. 10.1016/j.neuron.2009.07.025.
- 771 27. Walters, C.L., Brown, S., Changeux, J.-P., Martin, B., and Damaj, M.I. (2006). The beta2
772 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-
773 conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology* *184*, 339–344. 10.1007/s00213-
774 005-0295-x.
- 775 28. Grieder, T.E., Besson, M., Maal-Bared, G., Pons, S., Maskos, U., and Kooy, D. van der
776 (2019). $\beta 2^*$ nAChRs on VTA dopamine and GABA neurons separately mediate nicotine
777 aversion and reward. *Proc National Acad Sci* *116*, 25968–25973. 10.1073/pnas.1908724116.
- 778 29. McGranahan, T.M., Patzlaff, N.E., Grady, S.R., Heinemann, S.F., and Booker, T.K.
779 (2011). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine
780 reward and anxiety relief. *J. Neurosci.* *31*, 10891–10902. 10.1523/jneurosci.0937-11.2011.
- 781 30. Tochitsky, I., Banghart, M.R., Mourot, A., Yao, J.Z., Gaub, B., Kramer, R.H., and
782 Trauner, D. (2012). Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic
783 acetylcholine receptors. *Nature Chemistry* *4*, 105–111. 10.1038/nchem.1234.
- 784 31. Paoletti, P., Ellis-Davies, G.C.R., and Mourot, A. (2019). Optical control of neuronal ion
785 channels and receptors. *Nat Rev Neurosci* *20*, 514–532. 10.1038/s41583-019-0197-2.
- 786 32. Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y.A., Marti, F., Lambolez, B., Biasi, M.D., Lathrop,
787 M., Fratta, W., Maskos, U., et al. (2014). Nicotine consumption is regulated by a human
788 polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry* *19*, 930–936. 10.1038/mp.2013.158.
- 789 33. Mondoloni, S., Cutillo, R.D., and Mourot, A. (2019). Cell-Specific Neuropharmacology.
790 *Trends in Pharmacological Sciences* *40*, 696–710. 10.1016/j.tips.2019.07.007.

- 791 34. Szijj, P.A., Bahou, C., and Chudasama, V. (2018). Minireview: Addressing the retro-
792 Michael instability of maleimide bioconjugates. *Drug Discov Today Technologies* 30, 27–34.
793 10.1016/j.ddtec.2018.07.002.
- 794 35. Knott, S.R.V., Maceli, A.R., Erard, N., Chang, K., Marran, K., Zhou, X., Gordon, A.,
795 El Demerdash, O., Wagenblast, E., Kim, S., et al. (2014). A Computational Algorithm to
796 Predict shRNA Potency. *Mol Cell* 56, 796–807. 10.1016/j.molcel.2014.10.025.
- 797 36. Avale, M.E., Faure, P., Pons, S., Robledo, P., Deltheil, T., David, D.J., Gardier, A.M.,
798 Maldonado, R., Granon, S., Changeux, J.-P., et al. (2008). Interplay of beta2* nicotinic
799 receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proceedings of*
800 *the National Academy of Sciences* 105, 15991–15996. 10.1073/pnas.0807635105.
- 801 37. Fornasiero, E.F., Mandad, S., Wildhagen, H., Alevra, M., Rammner, B., Keihani, S.,
802 Opazo, F., Urban, I., Ischebeck, T., Sakib, M.S., et al. (2018). Precisely measured protein
803 lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. *Nat*
804 *Commun* 9, 4230. 10.1038/s41467-018-06519-0.
- 805 38. Quina, L.A., Harris, J., Zeng, H., and Turner, E.E. (2017). Specific connections of the
806 interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. *J.*
807 *Comp. Neurol.* 525, 2632–2656. 10.1016/j.cub.2013.09.041.
- 808 39. Lima, L.B., Bueno, D., Leite, F., Souza, S., Gonçalves, L., Furigo, I.C., Donato, J., and
809 Metzger, M. (2017). Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with
810 special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. *J Comp Neurol* 525,
811 2411–2442. 10.1002/cne.24217.
- 812 40. Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K.,
813 and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral
814 tegmental area. *Nature* 491, 212–217. 10.1038/nature11527.
- 815 41. Dautan, D., Souza, A.S., Huerta-Ocampo, I., Valencia, M., Assous, M., Witten, I.B.,
816 Deisseroth, K., Tepper, J.M., Bolam, J.P., Gerdjikov, T.V., et al. (2016). Segregated
817 cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional
818 circuits. *Nature Neuroscience* 19, 1025–1033. 10.1038/nn.4335.
- 819 42. Ables, J.L., Görlich, A., Antolin-Fontes, B., Wang, C., Lipford, S.M., Riad, M.H., Ren, J.,
820 Hu, F., Luo, M., Kenny, P.J., et al. (2017). Retrograde inhibition by a specific subset of
821 interpeduncular $\alpha 5$ nicotinic neurons regulates nicotine preference. *Proceedings of the*
822 *National Academy of Sciences*. 10.1073/pnas.1717506114.
- 823 43. DeGroot, S.R., Zhao-Shea, R., Chung, L., Klenowski, P.M., Sun, F., Molas, S., Gardner,
824 P.D., Li, Y., and Tapper, A.R. (2020). Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by
825 Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *BPS*, 1–12.
826 10.1016/j.biopsych.2020.06.018.
- 827 44. Gharpure, A., Teng, J., Zhuang, Y., Noviello, C.M., Jr, R.M.W., Cabuco, R., Howard,
828 R.J., Zaveri, N.T., Lindahl, E., and Hibbs, R.E. (2019). Agonist Selectivity and Ion
829 Permeation in the $\alpha 3\beta 4$ Ganglionic Nicotinic Receptor. *Neuron* 104, 501-511.e6.
830 10.1016/j.neuron.2019.07.030.

831 45. Pennington, Z.T., Dong, Z., Feng, Y., Vetere, L.M., Page-Harley, L., Shuman, T., and
832 Cai, D.J. (2019). ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of
833 animal behavior. *Sci Rep-uk* 9, 19979. [10.1038/s41598-019-56408-9](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56408-9).

834

Résultats complémentaires

Ces travaux nous ont permis de démontrer la sensibilité de l'IPN à de faibles doses de nicotine, et l'existence d'une modulation de la réponse à la nicotine de la VTA par l'IPN, se traduisant par des altérations de la sensibilité à la drogue. En effet, bloquer à l'aide de $MPEG_4Ch$ la réponse à la nicotine dans l'IPN conduit à une augmentation de la réponse à la nicotine des neurones de la VTA. Comportementalement, ce blocage de l'IPN se traduit par un renforcement à de faibles doses de nicotine (0,2 mg/kg) n'induisant normalement pas de préférence. L'IPN exercerait donc un frein sur la VTA, l'empêchant de répondre à de faibles doses de nicotine. Ces résultats sont importants, car le domaine considère généralement la VTA comme la zone la plus sensible à la nicotine.

L'article a été soumis à la revue *Neuron* et est actuellement en révision. Les *reviewers* ont soulevé différents points nécessitant la réalisation d'expériences complémentaires. Notamment, nos résultats suggèrent une diminution des concentrations de nicotine nécessaires pour induire un renforcement en présence de $MPEG_4Ch$ dans l'IPN. Cependant, pour vérifier ce décalage de la courbe dose-réponse vers les faibles concentrations, les *reviewers* ont suggéré de montrer la capacité de la nicotine à induire un renforcement à une concentration plus élevée chez la souris de type sauvage. Nous avons donc choisi de réaliser une CPP en utilisant une concentration de 0,5 mg/kg, classiquement décrite dans la littérature et précédemment démontrée comme étant renforçante dans l'équipe (Grabus et al. 2006; Durand-de Cuttoli et al. 2018). Cependant, nous n'avons pas réussi à induire de préférence pour le compartiment pairé à la nicotine à cette dose en utilisant le même protocole que précédemment (données non montrées). Ces résultats ne sont pas forcément surprenants, car le conditionnement à la nicotine est connu pour être particulièrement difficile à établir (Grabus et al. 2006). Nous avons donc décidé de doubler le nombre d'appariement de chaque chambre à la saline ou la nicotine (à savoir deux appariements par jour au lieu d'un, à 0,5 mg/kg). Dans ces conditions, nous avons observé une préférence pour le compartiment pairé à la nicotine (voir **Figure 6.1A**). Ces résultats démontrent ainsi l'importance du frein exercé par l'IPN sur la VTA, et comment son inhibition facilite grandement le renforcement à la nicotine (plus faible dose, et deux fois moins d'appariements). Il sera cependant important de vérifier que l'utilisation de ce protocole (appariements doublés) ne permet pas d'induire de préférence pour une faible concentration de nicotine (0,2 mg/kg) chez des souris WT. Les *reviewers* nous ont également demandé d'effectuer des expériences de CPP contrôles saline/saline pour les différents génotypes, avant de pouvoir conclure que la nicotine est renforçante. Nos résultats ne

montrent aucune préférence pour un compartiment particulier dans la condition saline/saline, pour aucun génotype (**Figure 6.1B-C**). Globalement, nos résultats montrent un conditionnement pour de faibles doses de nicotine (0.2 mg/kg) uniquement lorsque la réponse à la drogue est bloquée dans IPN, et un conditionnement à plus forte dose (0,5 mg/kg, double appariement) chez la souris WT.

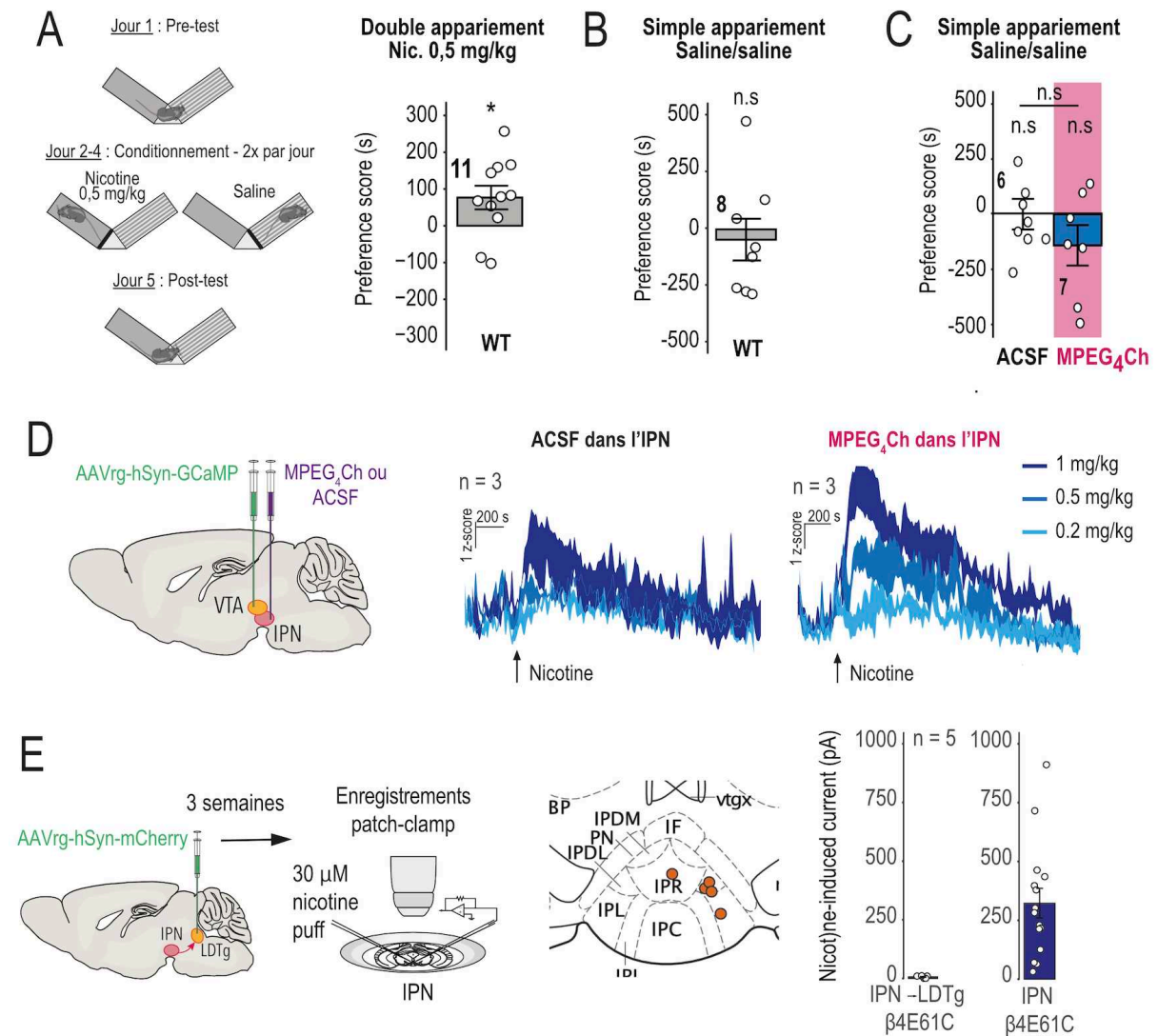


Figure 6.1 : Résultats complémentaires | **A.** Gauche, protocole expérimental de CPP à la nicotine 0,5 mg/kg avec 2 appariements par jour. Droite, ce protocole induit un renforcement à la nicotine chez les souris WT. One-sample t-test p-value=0,03866). **B.** La saline n'induit pas de renforcement chez les souris WT. t-test p-value = 0,6357. **C.** La saline n'induit pas de renforcement chez des souris beta4E61C injectées avec du MPEG₄Ch ou de l'ACSF dans l'IPN. Welch two-sample t-test p-value= 0,2471, MPEG₄Ch: one-sample t-test p-value = 0.1757, ACSF: one-sample t-test p-value = 0,9984. **D.** (Gauche) les souris beta4E61C sont transduites avec GCaMP dans la VTA puis injectées avec du MPEG₄Ch ou de l'ACSF dans l'IPN. (Droite) enregistrements préliminaires en photométrie fibrée de l'activité des neurones de la VTA en réponse à une injection à la nicotine. Les réponses de la VTA chez les souris injectées avec du MPEG₄Ch dans l'IPN semblent plus élevées que celles des souris contrôles. **E.**

(Gauche) représentation schématique du protocole expérimental d'enregistrement des neurones de l'IPN qui projettent vers le LDTg en patch-clamp. (Milieu) position des neurones enregistrés en patch-clamp. (Droite) la nicotine n'évoque pas de courant chez les neurones de l'IPN qui projettent vers le LDTg, comparés aux neurones de l'IPR.

Afin de vérifier que l'existence de ce frein exercé par l'IPN sur la VTA ne se cantonne pas à l'animal anesthésié, les *reviewers* ont demandé d'effectuer des expériences de physiologie chez l'animal vigile. Nous avons donc réalisé des enregistrements de la réponse de la VTA à une injection IP de nicotine par photométrie fibrée (GCaMP) chez la souris β 4E61C, en présence ou non de MPEG₄Ch dans l'IPN. Étant donné que l'effet antagoniste de MPEG₄Ch persiste plus de 10 jours, nous avons effectué l'infusion de MPEG₄Ch juste avant le positionnement de la fibre optique dans l'IPN. Puis les enregistrements de photométrie fibrée ont commencé 5 jours après infusion de MPEG₄Ch. Nous avons réalisé cette expérience en utilisant plusieurs doses de nicotine (0,2, 0,5 et 1 mg/kg), et avons pu observer des réponses à la nicotine plus importantes chez les animaux ayant reçu une injection de MPEG₄Ch dans l'IPN que chez les animaux contrôles ayant reçu une injection de liquide céphalo rachidien artificiel (ACSF) (voir **Figure 6.1D**). Ces résultats confirment donc l'existence de ce frein chez l'animal vigile, et donc son implication dans la modulation des propriétés renforçantes de la nicotine.

Enfin, les *reviewers* nous ont interrogés sur les mécanismes sous-tendant le contrôle de la réponse à la nicotine de la VTA par l'IPN. Comme discutés dans l'introduction, les liens entre IPN et VTA ne sont, en effet, pas clairement établis. Ces expériences de révision sont donc les plus exploratoires. L'interaction IPN-VTA pourrait se faire de manière directe, ou par une structure intermédiaire. En effet, une récente étude utilisant une nouvelle méthode de cartographie a permis de mettre en évidence l'existence de projections des neurones de l'IPN vers la VTA. Ces projections GABAergiques correspondraient à environ 3 % de la totalité des afférences reçues par la VTA (Beier 2022). Il est également possible que l'IPN module l'activité de la VTA de manière indirecte en agissant sur une structure intermédiaire projetant à son tour sur la VTA. Nous avons commencé à investiguer dans cette direction en nous penchant sur deux structures candidates, le LDTg et le Raphé, toutes deux recevant des projections de l'IPN et projetant à leur tour vers la VTA. Une étude ayant déjà impliqué les projections de l'IPN sur le LDTg dans l'aversion à la nicotine (Wolfman et al. 2018), nous avons tout d'abord décidé de nous pencher sur le LDTg comme structure candidate au rôle d'intermédiaire. Nous avons donc réalisé des injections d'un AAVretro-hSyn-mCherry au niveau du LDTg de souris β 4E61C, afin de cartographier les sous-régions de l'IPN projetant vers le LDTg, et de vérifier si ces neurones de l'IPN expriment la sous-unité β 4 (voir **Figure**

6.1E). En effet, les souris $\beta 4E61C$ pourraient nous permettre de bloquer les réponses à la nicotine et donc de vérifier l'expression de la sous-unité $\beta 4$ dans cette population de neurones. Puis, 3 semaines après l'injection, nous avons réalisé des tranches d'IPN et enregistré les courants induits par un puff de $30 \mu M$ de nicotine. De manière intéressante, nous avons observé que les neurones marqués par la mCherry étaient principalement localisés dans les régions dorsolatérales de l'IPN (IPDL et IPDM) et que ces neurones ne présentaient pas de courant nicotinique (voir **Figure 6.1E**). Nous n'avons donc pas réalisé d'expériences avec $MPEG_4Ch$, étant donné l'absence de courant nicotinique. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude ayant démontré que les parties latérales de l'IPN ne reçoivent que très peu d'afférences cholinergiques de la MHB, et expriment peu de nAChR (voir **Chapitre 3.2**, Quina et al. 2017; Molas et al. 2024). D'après l'étude de Wolfman et al., l'activation de la voie IPN-LDTg serait responsable de l'aversion à la nicotine (Wolfman et al. 2018), ce qui nous semble maintenant étonnant, vu que les neurones de cette voie ne semblent pas répondre à la nicotine. Il est à noter que cette étude ne démontre pas l'activation de cette voie *in vivo* en réponse à la nicotine. De plus chez des souris $\beta 4^{-/-}$, nous observons une absence d'aversion à la nicotine (Mondoloni et al. 2023) malgré une expression intacte des nAChR $\beta 2^*$ au niveau des terminaisons de l'IPN dans le LDTg. Cette aversion est restaurée suite à la réexpression de la sous-unité $\beta 4$ au niveau de l'IPN. Ainsi, bien que la nicotine puisse agir sur des nAChR exprimés au niveau des terminaisons des neurones de l'IPN qui projettent vers le LDTg, il est peu probable que le frein sur la VTA que nous observons dans le renforcement à la nicotine passe par le LDTg. En effet, l'application de $MPEG_4Ch$ se faisant au niveau des corps cellulaires, l'effet que nous observons doit être assuré par une population de neurones exprimant des nAChR $\beta 4^*$ de manière somatique. Contrairement à notre idée initiale, nous ne pensons pas que le LDTg puisse véhiculer ce frein venant de l'IPN vers la VTA.

L'IPN projette également massivement vers le raphé, et la VTA reçoit des afférences conséquentes de cette structure (environ 7-8 % du nombre total d'afférences reçues (Chang et al. 2021; Beier 2022)). Les neurones de l'IPN projetant vers le raphé sont localisés de manière plus centrale que ceux projetant vers le LDTg (IPR principalement) (Quina et al. 2017), et nos travaux ont montré que les neurones de l'IPR répondent fortement à la nicotine et expriment de fortes densités de sous-unité $\beta 4$ (Mondoloni et al. 2023). De plus, l'activation optogénétique des neurones du DRN projetant vers la VTA induit une augmentation de l'activité des neurones DAergiques de la VTA, un relargage de DA dans le NAc et un renforcement (Qi 2014; Wang 2019). Le raphé dorsal nous apparaît donc comme un candidat potentiel pour lier fonctionnellement l'IPN à la VTA. Dans un premier temps, nous allons

vérifier la connectivité entre raphé dorsal et IPN. Pour cela, nous injecterons au niveau de l'IPN un virus de l'Herpès qui voyage de manière antérograde et trans-synaptique (HSV- Δ TK-tdTomato), codant pour une protéine fluorescente rapportrice, et déficient en thymidine nucléotidase (TK), l'empêchant de se répliquer. Nous exprimerons au préalable dans l'IPN un AAV exprimant la TK sous contrôle de la Cre (AAV-Ef1a-DIO-eGFP-2a-Tk), permettant au HSV de se répliquer au niveau de l'IPN, ainsi qu'un AAV rétrograde exprimant la Cre au niveau du raphé (rAAV-Cre). De la même manière que pour le LDTg, nous irons enregistrer les courants nicotiques de la sous-population de l'IPN qui projette au niveau du raphé (marquées rétrogradement avec la GFP), en utilisant des tranches de souris KI β 4E61C traitées ou non avec MPEG₄Ch, pour déterminer si cette sous-population exprime ou non les nAChR β 4*. Enfin, pour vérifier la fonctionnalité de cette voie *in vivo*, nous réaliserons des enregistrements de l'activité des neurones du Raphé projetant vers la VTA en présence ou non de MPEG₄Ch dans l'IPN. Alternativement, nous pensons ré-exprimer β 4 uniquement dans cette population de neurones chez la souris β 4^{-/-}, à l'aide de transductions virales d'un AAV rétrograde exprimant la Cre dans le raphé, et un AAV-Cre dépendant exprimant la sous-unité β 4 dans l'IPN. Ces expériences seront réalisées dans les prochains mois.

Chapitre 7 : Seconde publication scientifique

Chronic nicotine alters social novelty through dopamine release in the claustrum

Éléonore Vicq, Tinaïg Le Borgne, Aylin Gulmez, Alexandre Mourot, Philippe Faure, Clément Solié. **En préparation.**

La nicotine, principal composé actif du tabac, induit des perturbations à des échelles à la fois moléculaires cellulaires et comportementales. Elle agit au niveau de nombreuses structures cérébrales dont la VTA jouant un rôle crucial dans l'encodage des récompenses, et la prise de décision. Plus récemment, la VTA s'est également révélée particulièrement importante dans l'encodage des interactions sociales. La VTA projette au niveau de différentes structures comme le NAc et le PFC, mais également au niveau d'une structure peu étudiée, le CLA. Celui-ci a récemment gagné en intérêt de par la diversité des afférences neuromodulatrices qu'il reçoit ainsi que par ses connexions extensives et réciproques avec les cortex. Il a d'ores et déjà été mis en évidence que le CLA jouerait un rôle important dans différentes fonctions cognitives comme la conscience, l'attention, le sommeil, mais également la saillance. Sa remarquable connectivité avec l'ensemble du cerveau et son implication dans les processus motivationnels font de la voie VTA-CLA une candidate idéale pour médier l'encodage des interactions sociales. L'objectif de ces travaux a donc été d'étudier à la fois l'implication de cette voie dans l'encodage des interactions sociales, mais également sa perturbation par la nicotine.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une altération des interactions sociales suite à une exposition chronique à la nicotine chez la souris. Ces perturbations se manifestent au niveau comportemental par un temps d'interaction élevé avec le nouveau stimulus social qui se maintient tout au long d'une tâche de nouveauté sociale. Nous retrouvons également un maintien de la libération de DA au niveau du CLA au cours des interactions avec un nouveau stimulus social, et ce tout au long de la tâche. Par ailleurs, l'activation optogénétique de la voie VTA-CLA pendant la tâche induit une perte de la préférence pour le stimulus social nouveau, tandis que la stimulation optogénétique non contingente, en amont de la tâche, permet de mimer les effets de la nicotine sur les interactions sociales. Ainsi, nos résultats mettent en évidence l'encodage de la saillance sociale par la voie VTA-CLA, dont l'activité est perturbée par une exposition chronique à la nicotine.

Chronic nicotine affects social novelty through dopamine release in the claustrum.

Éléonore Vicq^{1,2}, Tinaïg Le Borgne¹, Aylin Gulmez¹, Alexandre Mouro¹, Philippe Faure¹,

Clément Solié¹✉

1. Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 75005 Paris, France

2. Sorbonne Université, 75005 Paris, France

† Equal contribution

✉ Corresponding author

Abstract

Nicotine, when administered chronically, disrupts the activity of numerous neuronal structures, including the dopamine (DA) reward circuit that originates in the ventral tegmental area (VTA). VTA DA neurons are crucial for the rewarding and motivational aspects of social interactions, but whether chronic nicotine impacts these fundamental adaptive behaviors in mice remains uncertain. Here we found that chronic nicotine exposure produces an increase in the interaction time with novel social stimuli but not with familiar ones in a three-chamber task. We reasoned that claustrum (CLA), an overlooked structure which receives DA from VTA neurons and has recently been associated with context reinforcement and decision-making, might be involved in these processes. We found that DA is indeed released in the CLA upon social novelty interactions, and that chronic nicotine increases the duration of this DA signal, resulting in prolonged social saliency. Optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway led to a loss of preference for the novel social stimulus, while noncontingent stimulation of the pathway prior to the task mimicked the behavioral effects of chronic nicotine. Together, our results demonstrate the implication of the VTA – CLA DAergic pathway in the encoding of saliency for novel social stimuli, and reveal the behavioral impact of chronic nicotine on social novelty preference.

Introduction

Cigarette smoking has historically been a social activity, and individuals often engage in social interactions while smoking (Piña et al., 2018). The act of smoking itself can serve as a social cue and may facilitate social bonding among individuals who share similar smoking behaviors. Analogously, research in rodents has shown that social interactions can facilitate the acquisition of nicotine self-administration (Chen et al., 2011). However, the reciprocal influence of nicotine on social interactions are less well studied.

Nicotine, the psychoactive compound found in tobacco, activates nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), ligand-gated cationic channels expressed throughout the brain. Its chronic use produces molecular and cellular adaptations in multiple brain pathways, leading to addictive behaviors. From initial exposure to chronic usage and addiction, nicotine disrupts the activity of numerous neural circuits (Fowler et al., 2011; Fowler & Kenny, 2014; Mondoloni et al., 2023; Wills et al., 2022) and produces diverse molecular (Benwell, 1988; Corringer et al., 2006; Gentry et al., 2003; Pidoplichko et al., 1997), cellular (Mansvelter et al., 2002; Pidoplichko et al., 1997; Tolu et al., 2013) and behavioral long-term adaptations (Dongelmans et al., 2021; Keiflin & Janak, 2015; Redish, 2004).

The midbrain dopamine (DA) reward system, which is at the core of drug abuse, is particularly impacted by chronic nicotine exposure (Dongelmans et al., 2021; Keiflin & Janak, 2015). Indeed, chronic nicotine leads to an upregulation of nAChRs (Nashmi et al., 2007; Ngolab et al., 2015) and increases the basal activity of ventral tegmental area (VTA) dopamine (DA) neurons (Caillé et al., 2009; Dongelmans et al., 2021). VTA DA neurons have been extensively studied for their role in reinforcement and motivation (Olds, 1956; Schultz, 1998; Tsai et al., 2009; Wise, 2005). These neurons compute a reward prediction error (RPE) used by animals to evaluate rewarding stimuli and guide learning (Schultz, 1998). Moreover, VTA DA neurons play a role in driving social behaviors, evidenced by their increased activity during social interactions in mice (Gunaydin et al., 2014; Solié et al., 2022), computing a social RPE that serves as a neural substrate for social learning (Solié et al., 2022). VTA DA neurons can also encode the saliency of stimuli, whether rewarding or aversive (Bromberg-Martin et al.,

2010; Kutlu, 2021). Midbrain DA circuits are thus essential for learning which actions lead to a reward, and chronic nicotine, by disrupting DA encoding, can bias motivational processes toward more exploitative strategies (Dongelmans et al., 2021). In this article, we investigated the effects of chronic nicotine exposure on social preference in mice, and the underlying neural mechanisms.

In addition to their projections to the nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (Lammel et al., 2012), VTA DA neurons also project to an overlooked region known as the claustrum (CLA; Terem et al., 2020; Zingg et al., 2018). The CLA, an elongated and irregular structure found bilaterally in the brain, is highly conserved in the animal kingdom (Gabor & Peele, 1964; Torgerson et al., 2014; Wang et al., 2017; Zingg et al., 2018). It receives afferents from a broad range of neuromodulatory structures from the cholinergic basal forebrain, serotonergic raphe nuclei and dopaminergic VTA, and exhibits extensive and reciprocal connections with many cortical regions (Fodoulian et al., 2020; Zingg et al., 2018). The CLA is believed to play a role in numerous higher cognitive functions such as attention (Fodoulian et al., 2020), consciousness (Crick & Koch, 2005; Gabor & Peele, 1964; Pavel et al., 2019), sleep (Narikiyo et al., 2020; Norimoto et al., 2020) and saliency (Terem et al., 2020). Notably, a study highlighted the involvement of D1 receptor-expressing claustrum neurons projecting to the frontal cortex in motivational processes and drug reinforcement (Terem et al., 2020). However, even though DA release in the CLA is thought to play a role in incentive salience, rewarding and goal-directed behaviors (Wong et al., 2021), how specifically DA modulates the CLA remains unclear. Given that the CLA is strongly connected with all cortical structures and is involved in motivational processes, its modulation by DA is likely to be involved in the effects of nicotine on social interactions. Therefore, this study investigates the impact of chronic nicotine exposure on social novelty responses under choice conditions, and examines how DA release in the CLA influences social novelty preference.

Results

Chronic nicotine exposure increases social novelty exploration in a three-chamber task

Even though smoking is a social activity in humans, how the drug impacts social behaviors in animals, particularly rodents, has been largely overlooked. We wondered whether chronic nicotine exposure could alter social interactions in mice. To investigate this, we exposed mice to nicotine chronically, by replacing their drinking water with either a nicotine solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mixed with saccharin (2%), or a solution containing saccharin (2%) alone for the control group. First, we assessed the impact of chronic nicotine exposure on free social interactions during a brief habituation period to a novel conspecific (Supp. Fig. 1A). Mice were repeatedly exposed to the same novel social stimulus four times, each interaction lasting 2 minutes, allowing the stimulus to become familiar over the trials. We found no difference in the time spent interacting between the saccharin- and the nicotine-treated groups, both of which habituated similarly to the conspecific (Supp. Fig. 1B), indicating that nicotine exposure did not affect free interaction.

Since nicotine is known to change decision-making behaviors in mice (Dongelmans et al., 2021), we wondered whether nicotine could influence social novelty exploration in a three-chamber like task. Three weeks prior the behavioral experiment, mice were treated chronically with either nicotine or saccharin (Fig. 1A). During the social preference phase, mice were given the choice to interact with an object (empty enclosure) or a social stimulus (sex-matched juvenile conspecific). Then, during the social novelty phase, mice could choose between the same social stimulus, which now became familiar, and a novel conspecific. When given the choice between an inanimate object and a social stimulus, both nicotine- and saccharin-treated animals consistently preferred interacting with their conspecific (Fig. 1B). In the social novelty phase, both groups exhibited a preference for the novel stimulus over the familiar one. However, nicotine-treated mice spent significantly more time engaging with the novel mouse compared to saccharin-treated animals (Fig. 1C). Specifically, while both groups favored interaction with the novel stimulus during the initial five minutes, only nicotine-treated mice

continued to prefer the novel conspecific in the latter five minutes of the social novelty phase (Fig. 1D, E). No difference in the locomotor activity was found during the habituation phase, in which mice freely explored the environment (Supp. Fig. 1C, D), suggesting that the prolonged time spent interacting with the novel conspecific was not due to an increase in motor activity. These results indicate a habituation to the novel conspecific in the control group that nicotine-treated mice did not display.

Altogether, our results support an action of chronic nicotine on social novelty exposure, during a choice, by maintaining a heightened saliency for the novel conspecific.

Anatomical characterization of the VTA – CLA pathway

We wondered which specific brain pathways nicotine could act on to induce such changes in social novelty interactions. Since VTA DA neurons are at the core of both social (Gunaydin et al., 2014; Solié et al., 2022) and nicotine-related behaviors (Corrigall et al., 1994; Exley et al., 2011; Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013), we explored how specific DAergic projections from the VTA could explain the effect of nicotine on social novelty behaviors. Since nicotine increased saliency for the novel conspecific, we then focused our attention on a poorly studied structure, the claustrum (CLA), hypothesized to be involved in incentive salience through DA modulation. Indeed, the CLA receives many neuromodulatory signals, including DA from the VTA, and is reciprocally connected with virtually all cortical areas, positioning it as key structure involved in directing attention toward salient stimuli (Aransay et al., 2015; Atlan et al., 2018; Narikiyo et al., 2020; Zingg et al., 2018).

Handful of studies have shown the existence of VTA DA projections to the CLA, together with the expression of D1 and D2 DA receptors in the CLA (Camps et al., 1990; Lindvall et al., 1978; Savasta et al., 1986; Terem et al., 2020; Wamsley et al., 1989; Weiner & Brann, 1989; Zingg et al., 2018). Thus, we first decided to better characterize this pathway by performing anatomical tracing experiments. We injected an AAV-hSyn-DIO-GFP virus in the VTA of DAT-Cre mice, to specifically label VTA DAergic projections, together with a cholera toxin (CTB555) in the CLA to retrogradely label VTA cells projecting to the CLA (Fig. 2A). We

found both GFP-labeled DAergic fibers in the CLA, and CTB positive cells in the VTA (Fig. 2B, C), further supporting the existence of a VTA – CLA DAergic pathway (Terem et al., 2020; Zingg et al., 2018). To confirm these findings, we then performed, in WT mice, a retrograde labelling using an AAVrg-mCherry injected in the CLA coupled with Tyrosine Hydroxylase (TH) immunostaining in horizontal slices (Fig. 2D). We could detect TH-positive DAergic fibers in the CLA, as well as mCherry-positive cells in the VTA (Fig. 2E, E'). Altogether, our data confirm the existence of a VTA DA – CLA pathway.

Social interactions and nicotine injections induce DA release in the CLA

To determine the functionality of this pathway and to characterize its involvement in social interactions and in the response to nicotine, we expressed a genetically-encoded fluorescent DA sensor (GRAB-DA (Sun et al., 2018, 2020)) in the CLA. We used fiber photometry to monitor DA level variations in the CLA (Fig. 3A). We first aimed to see whether this pathway would respond to an acute intraperitoneal (IP) injection of nicotine (0.2 mg/kg; Fig. 3B). We observed an important increase in extracellular DA levels in the CLA following nicotine injection, which was absent after a saline injection (Fig. 3C). These results are consistent with previous studies showing that nicotine increases the firing rate of VTA DA neurons (Mameli-Engvall et al., 2006; Marti et al., 2011; Tolu et al., 2013) and induces phasic DA release in target structures such as the NAc (Di Chiara & Imperato, 1988). Then, we looked at DA level variations during free social interactions. After five minutes of baseline activity, a social stimulus was introduced allowing free interactions between the two mice (Fig. 3B). The introduction of the conspecific produced a rapid increase in the release of DA in the CLA, suggesting that the VTA – CLA pathway is activated during social interactions (Fig. 3D).

Due to the challenging nature of targeting a small and intricate structure such as the CLA, we opted for the dorsolateral striatum (DLS) as a control. This decision was based on its anatomical proximity to the CLA and its capacity to receive midbrain DA signals (Eshel et al., 2024). We investigated the specificity of the DA release in the CLA during social interaction by performing the same fiber photometry experiments in the DLS (Supp. Fig. 2). We observed

that an acute nicotine IP injection increased DA release in the DLS, as it did in the CLA (Supp. Fig. 3C). However, the introduction of a conspecific in the cage did not produce any variations in DLS DA levels (Supp. Fig. 2). Therefore, our data strongly suggest the existence of a functional VTA – CLA DAergic pathway that is responsive to both nicotine injections and social interactions.

Chronic nicotine exposure maintains high DA release in the CLA during social novelty

First, we wondered whether nicotine could change DA release in the CLA during free social interactions, and performed fiber photometry recordings in nicotine- and saccharin-treated mice (Fig. 3E, F). After exploring the environment for five minutes, a novel conspecific was introduced, as performed earlier. The social stimulus elicited comparable increases in DA release in the CLA of both nicotine- and saccharin-treated animals (Fig. 3G, H), mirroring previous observations in non-treated animals (Fig. 3D). Moreover, presenting a novel object to the nicotine- and saccharin-treated mice also induced an increase in DA release in the CLA in both groups (Supp. Fig. 3). These data suggest that chronic nicotine did not change DA release during free interaction with a stimulus, and that DA in the CLA signals saliency of novel stimuli.

Since chronic nicotine exposure affected social novelty approaches in the three-chamber task, we wondered whether the drug treatment could also alter the dynamics of DA release in the CLA. To this end, we expressed GRAB-DA in the CLA of nicotine- and saccharin-treated mice and monitored DA levels in the three-chamber task (Fig. 4A, B). In the social preference phase, we noticed an increase in DA release specifically in nicotine treated animals for both social and object stimuli while saccharin treated mice did not express any changes in CLA DA release (Supp. Fig. 4A-D). We then looked at the first interaction for each stimulus and revealed an increase of CLA DA release during social interaction for nicotine and saccharin treated groups (Supp. Fig. 4E-H). These results indicate that nicotine is able to change DA release dynamics in the CLA depending on stimuli interactions.

In the social novelty phase, we observed an increase in DA release during interactions with the novel stimulus exclusively in nicotine-treated mice, with no changes observed in the control group (Fig. 4C, E). We did not notice any changes in DA levels during interaction with the familiar stimulus for both nicotine and saccharin groups (Fig. 4D, F).

The absence of DA release with the novel social stimulus in the saccharin group somewhat contradicts the DA released observed during free social interactions in naïve mice (Fig. 3G). We hypothesized that this may be due to a gradual decrease in DA release along the course of the social novelty test, when the conspecific becomes familiar. Therefore, we further analyzed the signal, as in the social preference phase, and looked at DA release during the very first interaction with the novel social stimulus. We found that the very first interaction with the novel stimulus elicited an increase in CLA DA release in both nicotine- and saccharin-treated animals (Fig. 4G, I). In contrast, the first interaction with the familiar stimulus did not elicit any increase in CLA DA for both groups (Fig. 4H, J). These results indicate that the initial encounter with a novel social stimulus triggers an increase in DA release in the CLA. In control conditions, this DA signal declined as the conspecific becomes familiar, but in nicotine-treated animals it persisted throughout the task. This prolonged DA signal could maintain a high saliency for the novel social stimulus, which is consistent with the prolonged interest for the novel social stimulus observed in nicotine treated animals (Fig. 1D).

Non-contingent optogenetic stimulation of the VTA-CLA pathway mimics the effect of chronic nicotine on social novelty

To causally link VTA – CLA pathway activity to social novelty behavior, we expressed either AAV-hSyn-ChR2-YFP (VTA-CLA^{ChR2}), AAV-hSyn-Jaws-GFP (VTA-CLA^{Jaws}) or AAV-hSyn-YFP (VTA-CLA^{YFP}) in the VTA of WT mice and bilaterally implanted optic fibers above the CLA (Fig. 5A).

In a first paradigm, we employed an optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway throughout the entire the three-chamber task, using 20 Hz burst stimulations (Fig. 5B, C; Supp. Fig. 5A). Such optogenetic stimulation yielded a slight effect during the social preference

phase, with a lost preference for the conspecific over the object during the late phase (Supp. Fig. 5B, C). VTA-CLA^{YFP} control mice expressed a preference for the social stimulus over the object all along this phase, as expected (Supp. Fig. 5B, C). Remarkably, during the social novelty phase, VTA-CLA^{ChR2} mice, unlike control mice, showed a loss of interest in the novel conspecific, spending comparable amounts of time interacting with both familiar and novel stimuli (Fig. 5D, E). While continuous photo-inhibition of this pathway had no effect during the social novelty phase (Fig. 5F-H), it increased preference for the social stimulus over the object in VTA-CLA^{Jaws} mice, but not in VTA-CLA^{GFP} control mice, during the social preference phase (Supp. Fig. 5D-F). These results suggest that disturbing the activity of the VTA – CLA pathway specifically during the task, by either adding behavior-unrelated phasic DA releases or removing behaviorally-important DA signals, led to a disruption in the attribution of saliency to novel social stimuli.

To mimic the effects of chronic nicotine on social novelty behaviors, we turned to non-contingent optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway, prior to the task. Our aim was to increase the basal activity of this pathway without disturbing its function during the three-chamber task (Fig. 6A, B). For this purpose, VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice underwent photostimulation twice before performing the three-chamber task, 24 hours and 10 minutes prior to task initiation, at 20 Hz for 15 minutes each (Fig. 6C). Such photostimulation protocol was shown to induce plasticity and increase basal firing rates in VTA DA neurons (Bariselli et al., 2018). We found that photostimulation did not affect the preference for the conspecific over the object in either group (Supp. Fig. 5G-I). However, during the social novelty test, it resulted in an increased time spent interacting with the novel stimulus throughout the task, exclusively for VTA-CLA^{ChR2} mice. In comparison, VTA-CLA^{YFP} control animals decreased their time spent interacting with the novel stimulus during the last five minutes of the test, consistent with observations made in all other control groups (Fig. 6D, E). Therefore, the non-contingent optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway could replicate the behavior observed in nicotine-treated animals during the social novelty phase. As a control, we performed optogenetic stimulation of the VTA – DLS pathway (Supp. Fig. 6A, B), and found no effect of

the photostimulation on the time spent interacting with either familiar or novel stimuli (Supp. Fig. 6).

Together, these results show the importance of dopamine signaling in the VTA – CLA pathway in assigning the saliency of novel social stimuli, and thereby its importance in social decision-making. Additionally, our results suggest that chronic nicotine, possibly by increasing the basal activity of the VTA – CLA pathway, could disrupt the assignment of social saliency, leading to altered social decision-making.

Activation of the VTA – CLA pathway is not reinforcing

Activation of the D1R-containing neurons of the CLA was previously shown to be reinforcing (Terem et al., 2020). We thus wondered whether optogenetic activation of the VTA – CLA pathway could be rewarding *per se*, which may explain the observed change in social novelty exploration. Therefore, we performed a real-time place preference paradigm while optogenetically activating this pathway. We injected an AAV-hSyn-ChR2 or an AAV-hSyn-YFP in the VTA of WT mice, and bilaterally implanted optic fibers in either the CLA or DLS (Supp. Fig. 7A). Mice were placed in the apparatus and could explore freely the two chambers, only one of which was paired with optical stimulation (Supp. Fig. 7B). All of the mice spent a comparable amount of time in the two chambers, showing that neither VTA – CLA nor VTA – DLS stimulation elicited preference for the stimulated chamber (Supp. Fig. 8C-D). Our experiment suggests that the activation of the VTA – CLA pathway does not induce place preference, contrarily to what was reported when only CLA D1R-containing neurons were photostimulated (Terem et al., 2020), that the activation of the VTA – CLA pathway does not induce place preference. Therefore, the increased time spent with the novel stimulus in the three-chamber task after optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway is likely not elicited by an increased rewarding property, but rather by an increased saliency of the novel social stimulus.

Discussion

In this study, we showed that chronic exposition to nicotine alter some aspect of social behavior like novel social stimulus exploration in a three-chamber task, specifically in choice condition. Our results suggest that chronic nicotine exposure modify social decision-making by changing saliency attribution to the novel conspecific. To explain nicotine effect, we focused on the VTA – CLA pathway and investigate how chronic nicotine could impact its functioning. As described before, we were able to observe DA projections onto the CLA (Lindvall et al., 1978; Terem et al., 2020; Zingg et al., 2018), that respond to acute nicotine injection and social interaction by an increased DA release in the CLA. In the three-chamber task, after chronic nicotine exposure, we were able to highlight a maintained increased DA release during novel social interactions throughout the task, mirroring our behavioral results. Furthermore, differential optogenetic stimulation of the VTA – CLA pathway was able to modify social approaches in different ways. While optogenetic stimulation of the pathway during the task promotes a similar exploration of both familiar and novel stimuli, non-contingent stimulation mimicked the effect of chronic nicotine exposure. In our study, we lacked DA specificity when optogenetically stimulating the VTA – CLA pathway. While GABAergic or glutamatergic projections from VTA to CLA have not been described before, we cannot exclude the possibility to perturb other non-DA projections from the VTA. Thereby, it could be interesting to do this experiment in DAT-Cre mice, and to perform anatomical tracing of VTA non-DA projections to the CLA. However, our results strongly suggest the sufficient role of the DA release in the CLA to modify the saliency attributed to a novel conspecific, and could explain how the nicotine acts to change social novelty behaviors through VTA DA neurons projecting to the CLA.

VTA DA activity has been implicated in reward encoding in general (Schultz, 1998; Tsai et al., 2009; Wise, 2005) but also more specifically in social interaction (Gunaydin et al., 2014; Solié et al., 2022). In accordance to the evolution of DA release that we observed in the CLA, VTA DA neurons activates during social interactions and decreases their activity as social

stimulus becomes familiar (Solié et al., 2022). While a study has already shown that activation of the VTA – NAc pathway favor social behavior (Gunaydin et al., 2014), our results demonstrate the implication of a new pathway in the encoding of social behaviors.

Our study focused on the DA input of the CLA, but another study looked at the CLA neurons expressing D1 receptor and projecting to frontal cortices (Terem et al., 2020). They implicate these neurons in motivational and saliency detection processes. Contrary to them we did not observe any preference for the stimulated compartment during rtPP. This difference may be explained by the fact that we were stimulating VTA output onto CLA. Thus, DA can act on both D1 and D2 receptors (Camps et al., 1990; Terem et al., 2020; Wamsley et al., 1989), leading to the absence of preference for the stimulated compartment. As highlighted before, another option could be that VTA projections to CLA are not only DA and that our stimulation produced a release of different neurotransmitters such as GABA or Glutamate. Our results thus point at a role of the VTA – CLA pathway in saliency detection, modifying afterwards decision-making.

Besides DA neuromodulation, the CLA receives a lot of cholinergic afferents from the basal forebrain (Atlan et al., 2018; Wong et al., 2021; Zingg et al., 2018) that has been involved in attention (Atlan et al., 2018; Fodouliau et al., 2020). Indeed, animals whose CLA has been inactivated are more susceptible to environment distractors (Atlan et al., 2018). Acetylcholine (ACh) would act as a gain in the CLA promoting the activity of different claustral projections (Nair et al., 2023; Wong et al., 2021). According to Nair et al., higher level of ACh would favor the activation of claustral projections to cortical areas while lower level would promote the activity of claustral projections to subcortical regions (Nair et al., 2023). Chronic nicotine exposure could sustainably promote the activity of the CLA to cortex pathway leading to higher attention levels. Moreover, nicotine has also been shown to induce a desensitization and up-regulation of nAChR (Corringer et al., 2006; Gentry et al., 2003; Perry et al., 1999; Pidoplichko et al., 1997; Srinivasan et al., 2011). As CLA expresses a large diversity of nAChR (Gong et

al., 2003; Han et al., 2003; Wong et al., 2021), its nicotinic transmission might be disturbed by a chronic nicotine exposure. Thus, it would be of interest to further explore CLA implication in nicotine addiction. nAChR being expressed throughout the brain (Zoli, 2000; Zoli et al., 2015), it is possible that nicotine act on both nicotinic and DA transmission, leading to disturbed attention level and saliency detection, manifesting in our study by increased choice to interact with novel social stimuli. Indeed, chronic nicotine exposure has been shown to produce increased activity of DA neurons and changes strategies in decision-making task (Dongelmans et al., 2021; Mameli-Engvall et al., 2006; Marti et al., 2011). Mice optimize their reward obtention favoring an exploitive strategy over an exploration strategy. Here we show that chronic nicotine exposure maintains the saliency of a novel social stimulus throughout time. Thus, it could be interesting to chronically inhibit the VTA – CLA pathway using inhibitory DREADDs while mice are still under chronic nicotine to see if decreasing the excitability of this pathway could prevent chronic nicotine effect, and if the VTA – CLA pathway could be a potential treatment target for addiction.

Altogether, our results show the importance of DA release in the CLA in the encoding of social interactions, and its modulation by chronic nicotine exposure. CLA is a structure that has recently been gaining interest, but that still needs to be further characterized, notably concerning its role in nicotine addiction.

Author contributions

C.S. and E.V. conceived the project. C.S. and E.V wrote the manuscript with the help of A.M. and P.F. C.S. and E.V. performed the behavioral experiments with the help of T.L.B and A.G. C.S. performed all the analyses and statistics with the help of E.V.

Acknowledgements: We would like to thank the Vision Institute (Paris, France) for providing viruses. We would also like to thank Otilia de Oliveira and Emilie Tubeuf for the animal's caretaking support. Clément Solié would like to thank "La Fondation des Treilles" for their support of this work. **Funding:** This work is supported by Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS UMR8249), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U1130), Agence Nationale de la Recherche (ANR-19 Vampire to TLB), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM SPF202005011922 to CS) and the Fourth-year PhD fellowship from Labex MemoLife to EV.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

References

- Aransay, A., Rodríguez-López, C., García-Amado, M., Clascá, F., & Prensa, L. (2015). Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: A single-cell axon tracing analysis. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 59. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00059>
- Atlan, G., Terem, A., Peretz-Rivlin, N., Sehwat, K., Gonzales, B. J., Pozner, G., Tasaka, G., Goll, Y., Refaeli, R., Zviran, O., Lim, B. K., Groysman, M., Goshen, I., Mizrahi, A., Nelken, I., & Citri, A. (2018). The claustrum supports resilience to distraction. *Current Biology: CB*, 28(17), 2752-2762.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.068>
- Bariselli, S., Hörnberg, H., Prévost-Solié, C., Musardo, S., Hatstatt-Burklé, L., Scheiffele, P., & Bellone, C. (2018). Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nature Communications*, 9(1), 3173. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05382-3>
- Bariselli, S., Tzanoulinou, S., Glangetas, C., Prévost-Solié, C., Pucci, L., Viguié, J., Bezzi, P., O'Connor, E. C., Georges, F., Lüscher, C., & Bellone, C. (2016). SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA. *Nature Neuroscience*, 19(7), 926–934. <https://doi.org/10.1038/nn.4319>
- Benwell. (1988). Evidence that Tobacco Smoking Increases the Density of (-)-[3H]Nicotine Binding Sites in Human Brain—Benwell—1988—*Journal of Neurochemistry*—Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1988.tb10600.x>
- 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>
- 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>
- Camps, M., Kelly, P. H., & Palacios, J. M. (1990). Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 80(2), 105–127. <https://doi.org/10.1007/BF01257077>
- Chen, H., Sharp, B. M., Matta, S. G., & Wu, Q. (2011). Social interaction promotes nicotine self-administration with olfactogustatory cues in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2629–2638. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.149>
- Corrigall, W. A., Coen, K. M., & Adamson, K. L. (1994). Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Research*, 653(1–2), 278–284. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90401-4)
- 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), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2005.12.012>

Crick, F. C., & Koch, C. (2005). What is the function of the claustrum? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1458), 1271–1279. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1661>

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*, 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., Didiene, S., Bousseylol, 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), 6945. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27268-7>

Eshel, N., Touponse, G. C., Wang, A. R., Osterman, A. K., Shank, A. N., Groome, A. M., Taniguchi, L., Pinto, D. F. C., Tucciarone, J., Bentzley, B. S., & Malenka, R. C. (2024). Striatal dopamine integrates cost, benefit, and motivation. *Neuron*, 112(3), 500–514.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.10.038>

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>

Fodoulian, L., Gschwend, O., Huber, C., Mutel, S., Salazar, R. F., Leone, R., Renfer, J.-R., Ekundayo, K., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2020). The claustrum-medial prefrontal cortex network controls attentional set-shifting (p. 2020.10.14.339259). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.14.339259>

Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*, 76 Pt B(0 0), 533–544. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.008>

Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J., & Kenny, P. J. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*, 471(7340), 597–601. <https://doi.org/10.1038/nature09797>

Gabor, A. J., & Peele, T. L. (1964). ALTERATIONS OF BEHAVIOR FOLLOWING STIMULATION OF THE CLAUSTRUM OF THE CAT. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 17, 513–519. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(64\)90181-6](https://doi.org/10.1016/0013-4694(64)90181-6)

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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 206–216. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041756>

- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M. L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U. B., Nowak, N. J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M. E., & Heintz, N. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*, 425(6961), 917–925. <https://doi.org/10.1038/nature02033>
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., & Deisseroth, K. (2014). Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell*, 157(7), 1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>
- Han, Z.-Y., Zoli, M., Cardona, A., Bourgeois, J.-P., Changeux, J.-P., & Le Novère, N. (2003). Localization of [3H]nicotine, [3H]cytisine, [3H]epibatidine, and [125I]alpha-bungarotoxin binding sites in the brain of *Macaca mulatta*. *The Journal of Comparative Neurology*, 461(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/cne.10659>
- 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>
- Kutlu, M. G. (2021). Dopamine release in the nucleus accumbens core signals perceived saliency.
- 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>
- Lindvall, O., Björklund, A., & Divac, I. (1978). Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Research*, 142(1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90173-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90173-7)
- 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)
- 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>

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*, 12, e80767. <https://doi.org/10.7554/eLife.80767>

Nair, A., Teo, Y. Y., Augustine, G. J., & Graf, M. (2023). A functional logic for neurotransmitter corelease in the cholinergic forebrain pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(28), e2218830120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2218830120>

Narikiyo, K., Mizuguchi, R., Ajima, A., Shiozaki, M., Hamanaka, H., Johansen, J. P., Mori, K., & Yoshihara, Y. (2020). The claustrum coordinates cortical slow-wave activity. *Nature Neuroscience*, 23(6), 741–753. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0625-7>

Nashmi, R., Xiao, C., Deshpande, P., McKinney, S., Grady, S. R., Whiteaker, P., Huang, Q., McClure-Begley, T., Lindstrom, J. M., Labarca, C., Collins, A. C., Marks, M. J., & Lester, H. A. (2007). Chronic Nicotine Cell Specifically Upregulates Functional α^4 Nicotinic Receptors: Basis for Both Tolerance in Midbrain and Enhanced Long-Term Potentiation in Perforant Path. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8202–8218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-07.2007>

Ngolab, J., Liu, L., Zhao-Shea, R., Gao, G., Gardner, P. D., & Tapper, A. R. (2015). Functional Upregulation of α^4 Nicotinic Acetylcholine Receptors in VTA GABAergic Neurons Increases Sensitivity to Nicotine Reward. *Journal of Neuroscience*, 35(22), 8570–8578. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4453-14.2015>

Norimoto, H., Fenk, L. A., Li, H.-H., Tosches, M. A., Gallego-Flores, T., Hain, D., Reiter, S., Kobayashi, R., Macias, A., Arends, A., Klinkmann, M., & Laurent, G. (2020). A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep. *Nature*, 578(7795), Article 7795. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1993-6>

Olds, J. (1956). Pleasure Centers in the Brain. *Scientific American*, 195(4), 105–117.

Pavel, B., Menardy, F., Rotaru, D., Paslaru, A. C., Acatrinei, C., Zagrean, L., Popa, D., & Zagrean, A.-M. (2019). Electrical Stimulation in the Claustrum Area Induces a Deepening of Isoflurane Anesthesia in Rat. *Brain Sciences*, 9(11), 304. <https://doi.org/10.3390/brainsci9110304>

Pennington, Z. T., Dong, Z., Feng, Y., Vetere, L. M., Page-Harley, L., Shuman, T., & Cai, D. J. (2019). ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. *Scientific Reports*, 9(1), 19979. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56408-9>

Perry, D. C., Dávila-García, M. I., Stockmeier, C. A., & Kellar, K. J. (1999). Increased nicotinic receptors in brains from smokers: Membrane binding and autoradiography studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1545–1552.

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>

Piña, J. A., Namba, M. D., Leyrer-Jackson, J. M., Cabrera-Brown, G., & Gipson, C. D. (2018). Social Influences on Nicotine-Related Behaviors. *International Review of Neurobiology*, 140, 1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.07.001>

Redish, A. D. (2004). Addiction as a computational process gone awry. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5703), 1944–1947. <https://doi.org/10.1126/science.1102384>

Savasta, M., Dubois, A., & Scatton, B. (1986). Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Research*, 375(2), 291–301. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90749-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90749-3)

Schultz, W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80(1), 1–27. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.1>

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), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00972-9>

Srinivasan, R., Pantoja, R., Moss, F. J., Mackey, E. D. W., Son, C. D., Miwa, J., & Lester, H. A. (2011). Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *The Journal of General Physiology*, 137(1), 59–79. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010532>

Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S. F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., Yong, Z., Gao, Y., Peng, W., Wang, L., Zhang, S., Du, J., Lin, D., Xu, M., Kreitzer, A. C., ... Li, Y. (2018). A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell*, 174(2), 481-496.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.042>

Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Qian, C., Tan, K., Feng, J., Dong, H., Lin, D., Cui, G., & Li, Y. (2020). Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature Methods*, 17(11), 1156–1166. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00981-9>

Terem, A., Gonzales, B. J., Peretz-Rivlin, N., Ashwal-Fluss, R., Bleistein, N., Reus-Garcia, M. del M., Mukherjee, D., Groyzman, M., & Citri, A. (2020). Claustral Neurons Projecting to Frontal Cortex Mediate Contextual Association of Reward. *Current Biology*, 30(18), 3522-3532.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.064>

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>

Torgerson, C. M., Irimia, A., Goh, S. Y. M., & Van Horn, J. D. (2014). The DTI connectivity of

the human claustrum. *Human Brain Mapping*, 36(3), 827–838.
<https://doi.org/10.1002/hbm.22667>

Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science*, 324(5930), 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>

Wamsley, J. K., Gehlert, D. R., Filloux, F. M., & Dawson, T. M. (1989). Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2(3), 119–137.

Wang, Q., Ng, L., Harris, J. A., Feng, D., Li, Y., Royall, J. J., Oh, S. W., Bernard, A., Sunkin, S. M., Koch, C., & Zeng, H. (2017). Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(6), 1317–1346. <https://doi.org/10.1002/cne.24047>

Weiner, D. M., & Brann, M. R. (1989). The distribution of a dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *FEBS Letters*, 253(1–2), 207–213. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80960-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80960-3)

Wills, L., Ables, J. L., Braunscheidel, K. M., Caligiuri, S. P. B., Elayouby, K. S., Fillinger, C., Ishikawa, M., Moen, J. K., & Kenny, P. J. (2022). Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. *Pharmacological Reviews*, 74(1), 271–310. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299>

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>

Wong, K. L. L., Nair, A., & Augustine, G. J. (2021). Changing the Cortical Conductor's Tempo: Neuromodulation of the Claustrum. *Frontiers in Neural Circuits*, 15. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2021.658228>

Zingg, B., Dong, H.-W., Tao, H. W., & Zhang, L. I. (2018). Input–output organization of the mouse claustrum. *Journal of Comparative Neurology*, 526(15), 2428–2443. <https://doi.org/10.1002/cne.24502>

Zoli, M. (2000). Distribution of Cholinergic Neurons in the Mammalian Brain with Special Reference to their Relationship with Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. In F. Clementi, D. Fornasari, & C. Gotti (Eds.), *Neuronal Nicotinic Receptors* (pp. 13–30). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57079-7_2

Zoli, M., Pistillo, F., & Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, 96, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>

Material and methods

Animals

The study was conducted using wild type (WT) C57BL/6J mice (N = 269, 4 – 12-week-old, Janvier-Labs) as well as transgenic DAT-iCre mice with C57BL/6J background (BAC-DAT-iCre, N = 10, 8 – 12-week-old). DAT-iCre mice were bred in our institute and were employed for dopamine neuron-specific tracing. Only male mice were used for all the experiments conducted. Mice were housed in groups (weaning at P21 – P23) in an animal facility where temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity were automatically monitored, under 12-hour light/dark cycle (8:00 a.m.–8:00 p.m.). All behavioral experiments were conducted during the light cycle. Multiple behavioral tests were performed with the same group of animals, and these animals were assigned randomly to the different behavioral assays and groups. For nicotine and optogenetic manipulation experiments, the experimenters were blind to which group the animals belong. A minimum of two independent cohorts were used for the behavioral experiments. All the procedures performed complied and were approved by the French National Institutional Guidelines on Animal Experimentation.

Stereotaxic surgeries

For fiber photometry experiments, injection of AAV-hSyn-GRAB-DA2m (Titer $\geq 1.2 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Vision Institute, Paris, France) was performed in 7-10 week-old WT mice. Mice were anesthetized with a mixture of oxygen (1L/min) and isoflurane 2% (Tem SEGA, Pessac, France). After shaving the skin, mice were placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, USA), the skin was disinfected and locally anesthetized with 70 μL of lurocaine (0.5 %). Craniotomies were then performed over the CLA at AP: +1.10 mm ML: ± 3.10 mm from the bregma and DV: -2.30 mm from the brain surface, or over the DLS at AP: +1.10 mm ML: ± 2.50 mm from the bregma and DV: -2.50 mm from the brain surface. Injections were carried out using glass micropipette (Drummond Scientific Company, Broomall, PA), at a 100 nL/min rate for a total volume of 50 nL in the CLA and 100 nL in the DLS. At the end of the surgery, 100

μL of buprenorphine (0.1mg./kg) was injected subcutaneously. Unilateral optic fiber implantations were performed 2 – 3 weeks later above CLA or DLS with the same coordinates, and dental acrylic (SuperBond, Sun medical) was used for fixing the ferrule to the skull.

For optogenetic experiments: rAAV5-hSyn-ChR2(H134R)-EYFP (Titer $\geq 1.8 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Addgene, Watertown, MA, USA), rAAV5-hSyn1-Jaws-KGC-EGFP-ER2 (Titer $\geq 5.9 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland) or rAAV5-hSyn1-EGFP (Titer $\geq 5.7 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland) were injected in 7-10 week-old WT mice. Mice were anesthetized and disinfected as previously described. The animals were placed in a stereotactic frame and bilateral injections were performed in the VTA (AP: -3.20 mm, ML: ± 0.50 mm, DV: -4.20 ± 0.05 mm from Bregma, 300 nL per side) using a glass micropipette. After at least 3 weeks, two optic fibers were implanted bilaterally above the CLA or the DLS, at the same coordinates, and fixed to the skull using dental acrylic.

For anatomical tracing, WT and DAT-Cre mice were used. rAAV5-EF1a-DIO-YFP (Titer $\geq 9.1 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Vision Institute, Paris, France) was injected in the VTA of DAT-Cre mice as described above, while CTB555 (ThermoFisher, Scientific, Waltham, MA USA) was injected in the CLA.

AAVrg-hSyn1-chl-mCherry (Titer $\geq 8.4 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland) was injected in the CLA of WT mice.

For anterograde monosynaptic tracing, rAAV9-EF1a-DIO-EGFP-T2A-TK (Titer $\geq 2.0 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, BrainVTA, Wuhan, China; 500nL) was injected in the VTA of DAT-Cre mice. 3 weeks later, HSV- Δ TK-LSL-tdTomato(H361) (Titer $\geq 1.1 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹, BrainVTA, Wuhan, China; 100nL) was also injected in the VTA. 3 days later, the animals were perfused with PFA to fix the brain.

After all the surgeries, mice were placed alone in a heated cage for 1h for recovery, and were subsequently checked every day. The behavioral experiments started at least 1 week after the surgery. Injections and implantations were all confirmed with post-hoc immunohistochemistry.

Three-chamber task under chronic nicotine

Three weeks prior to the behavioral experiment, mice were given either nicotine (100 µg/mL) combined with saccharin (2%), or saccharin alone (2%) for the control group, in their drinking bottle. Then, the three-chamber task was conducted within a rectangular open-field built in Plexiglas (50 × 50 × 50 cm). The task was composed of three phases, habituation, social preference and social novelty, each lasting 10 minutes. During habituation, the mice were placed in the empty arena for 10 minutes to freely explore the environment. For the social preference phase, two enclosures were positioned in opposite corners of the arena. One enclosure remained empty, serving as an inanimate object, while the other housed a non-familiar social stimulus (novel juvenile mice of the C57BL/6J strain, aged 3-4 weeks). The experimental mouse was allowed to freely explore the arena and the two stimuli for 10 minutes. The enclosure walls, made of vertical metal bars, enabled visual, auditory, olfactory, and tactile interactions between the experimental mouse and the stimulus mouse. The placement of the stimuli within the enclosures was randomized and counterbalanced across trials. Finally, for the social novelty phase, the enclosures were maintained in their positions, and a novel conspecific mouse was introduced into the previously empty enclosure. During this phase, the prior non-familiar conspecific mouse was now considered familiar. The experimental mouse was able to explore the arena for 10 minutes, with the two enclosures now containing both familiar and non-familiar social stimuli. Upon completion of the 10-minute exploration period, both the experimental mouse and the stimuli mice were placed back in their home cages. At the end of each session the cage was cleaned using Aniospray disinfectant. The mice were automatically tracked post-hoc using eZTrack. The videos were downloaded onto eZTrack platform (Pennington et al., 2019), where regions were manually drawn for each stimulus. Results of the tracking included data on the time spent within each stimulus zone (5cm around the enclosure) and the total distance traveled by the mouse during the task.

Short term social habituation

Three weeks prior to the behavioral experiment, the water bottle in the home cage was substituted with a bottle containing either nicotine (100 μ g/mL) combined with saccharin (2%), or saccharin alone (2%). The treated mice were then placed in a cage-like homecage (20 x 40 x 10 cm) with bedding, for a duration of 5 minutes, during which they were free to explore the new cage. Following this exploration period, a novel social stimulus (juvenile C57BL/6J strain, aged 3-4 weeks) was then introduced in the cage for 2 minutes. After each trial, the stimulus mouse was removed and then reintroduced at subsequent trials. Ultimately, the same social stimulus was presented to the experimental mouse four times, each trial lasting 2 minutes, with intervals of 5 minutes during which the mouse remained alone in the cage. At the end of each session, the cage was cleaned using Aniospray disinfectant. The time spent interacting with the conspecific was scored manually using a homemade software (Clicker, EPFL, Switzerland).

Fiber photometry

Mice were injected with AAV-hSyn-GRAB-DA2m in the CLA or DLS, and implanted with an optical fiber (200 μ m core, NA = 0.39, ThorLabs) coupled with a stainless-steel ferrule. During the three weeks prior to the behavioral experiment, drinking water was replaced by a solution containing either nicotine (100 μ g/mL) supplemented with saccharin (2%), or saccharin alone (2%).

A Doric Lenses fiber photometry system was employed to record fluorescence signals reflecting dopamine (DA) levels in the CLA or DLS. The system utilized a fiber photometry console linked to an LED driver, controlling a connectorized blue light-emitting LED (465 nm) in Lock-in mode at 220.537 Hz. This signal was then transmitted through an optic patch cord to the Mini Cube (FMC4_AE(405)_E(460-490)_F(500-550)_S). An optical fiber, connected to the Mini Cube's sample port and the animal's implanted fiber via a zirconia sleeve, served as the conduit for both light stimulation and recorded fluorescence. The received light signal was converted to electrical signals by a photoreceiver using the AC Low setting, before being

transmitted through another optic patch cord to the Mini Cube via a dedicated fiber optic adaptor. Finally, the Doric Neuroscience Studio software acquired the signal at a sampling rate of 12.0 kHz and applied a low-pass filter with a 12.0 Hz cutoff frequency.

Fiber photometry recordings were performed to monitor DA release in the CLA (or DLS for controls) following an IP injection of nicotine, during free social interactions, or during the three-chamber task. Injection and implantation sites were systematically verified in post hoc analysis.

Fiber photometry during the free interaction task

WT mice transduced with the GRAB-DA sensor and implanted with an optic fiber in the CLA or DLS performed a free interaction task. The mice were placed in a cage-like home cage (20 x 40 x 10 cm) with bedding, and DA release in the CLA or DLS was recorded using fiber photometry. For the habituation period, mice were free to explore the cage for 5 minutes. A novel social stimulus (juvenile C57BL/6J strain, aged 3-4 weeks) was then introduced into the cage. Both animals were allowed to interact freely for 5 minutes. The social stimulus was then removed and the experimental mice remained alone in the cage for 2 minutes. A novel object was then introduced, and mice were free to explore it for 3 minutes. At the end of each session, the cage was cleaned using Aniospray disinfectant.

Fiber photometry during intraperitoneal nicotine injection

WT mice transduced with GRAB-DA sensor and implanted with an optic fiber in the CLA or DLS received an intraperitoneal (IP) injection of saline or nicotine (0.2 mg/kg). The mice were placed in a cage-like home cage (20 x 40 x 10 cm) with bedding, and DA release in the CLA or DLS was recorded using fiber photometry. The mice were first able to freely explore the cage. After 5 minutes, an IP injection of saline was performed and the fluorescent signal was recorded for 10 minutes. Then, nicotine was injected IP and the signal was recorded for another 30 minutes. At the end of the session, mice were placed back in their home cage. The cage was then cleaned using Aniospray disinfectant.

Analysis of fiber photometry recordings

We first subtracted a biexponential detrend to our fluorescence signal in order to eliminate the slow decay of the signal due to sensor photobleaching, and then added on offset equal to the signal mean before detrending. The $\Delta F/F$ ratio was calculated as follow:

$$\frac{\text{fluo signal} - \text{baseline fluo signal}}{\text{baseline fluo signal}}$$

The analysis of DA variations in the CLA or DLS and its correlation with behavior relied on the construction of peri-event time histograms (PETHs). These PETHs were generated by aligning and centering specific behavioral events. The identification of these events was done manually by the experimenter. The temporal resolution of the recordings was determined by the bin size chosen for analysis. We used a bin size of 100 ms to achieve a more precise representation of the DA variations across time. Subsequent analyses were conducted on normalized activity data. To obtain normalized DA fluorescence variations, a specific formula was applied:

$Z\text{score } \Delta F/F = \frac{(m\Delta F/F - \mu\Delta F/F)}{\sigma\Delta F/F}$, where Zscore $\Delta F/F$ represents the normalized DA activity for a specific time bin, $m\Delta F/F$ represents the average DA signal variations within that specific time bin, $\mu\Delta F/F$ represents the mean DA signal variations across the baseline activity a few seconds before each events (5 to 30 seconds depending on the experiments) and $\sigma\Delta F/F$ represents the standard deviation of the DA signal variations across the baseline activity a few seconds before each events.

Following normalization, a smoothing technique was employed on the data. This involved convolution with a Gaussian kernel using a sliding window encompassing 300 bins. The "gausswin" function within the MATLAB software was utilized to achieve this smoothing process.

Optogenetic experiments

Bilateral injections of AAV-hSyn-ChR2-YFP or AAV-hSyn-GFP control viruses were performed in the VTA of WT mice. Mice were bilaterally implanted in the CLA or DLS with 200 μm diameter optic fibers (Thor Labs) coupled to a zirconia ferrule. Optical stimulations were performed using

an ultra-high-power LED (470 nm for ChR2 and 640 nm for Jaws, Prizmatix) coupled to a patchcord (500 μm core, NA = 0.5, Prizmatix) with an output intensity of 5 – 10 mW. We used a 20 Hz burst stimulation protocol with 10 pulses of 5 ms followed by a 1 s pause for ChR2 (Bariselli et al., 2016), or a continuous light stimulation at 640 nm for Jaws.

For the contingent optogenetics experiment in the three-chamber task, light stimulation was performed during the habituation, social preference and social novelty phases.

For the non-contingent optogenetic experiment, the optical stimulation at 20 Hz was conducted for 15 minutes 24 hours and 10 minutes prior to the task.

At the end of each session, the cage was cleaned using Aniospray disinfectant.

Injection and implantation sites were systematically verified in post hoc analysis.

Real-time place preference

Bilateral injections of AAV-hSyn-ChR2-YFP or AAV-hSyn-YFP control viruses were performed in the VTA of WT mice. Mice were bilaterally implanted in the CLA or DLS with 200 μm diameter optic fibers (Thor Labs) coupled to a zirconia ferrule. Three weeks later, the real-time place preference (RtPP) protocols were conducted within a rectangular homemade Plexiglass arena (50 x 30 x 40 cm) divided into two chambers communicating with a central door. One chamber featured black and white stripes, while the other exhibited black dots on a white background. The choice of the compartment for photo-stimulation was counterbalanced across both groups of animals (ChR2 and the YFP-control groups) within the same test.

The RtPP test consisted of a 15-minute session allowing animals to freely navigate between the compartments. However, photo-stimulation only occurred within one of the two compartments. Implanted animals were connected via a bilateral fiber (200 μm diameter, NA = 0.5, Thorlabs) attached to a rotor. This rotor connected a 470 nm LED (Prizmatix) to a 500 μm diameter fiber with an NA of 0.5 (Thorlabs). LED output was controlled by a pulser (PulserPlus, Prizmatix). This stimulator delivered 10 light flashes of 5-millisecond at 20 Hz frequency followed by a 1 s pause. Naive mice were connected and placed at the center of the

arena, i.e., between the two chambers. The results are presented as the proportion of time spent in each compartment.

At the end of each session, the cage was cleaned using Aniospray disinfectant.

Immunohistochemistry

Following euthanasia, brains were rapidly extracted and fixated in a solution of 4% paraformaldehyde for a minimum of three days at 4°C. Subsequently, serial sections of 60 micrometers in thickness were obtained from the midbrain or claustral regions using a vibratome.

For immunostaining experiments, free-floating brain sections were initially incubated for one hour at 4°C in a phosphate-buffered saline (PBS) blocking solution containing 3% bovine serum albumin (BSA) by volume/volume ratio (Sigma; A4503) and supplemented with 0.2% Triton X-100. This was followed by overnight incubation at 4°C with a primary antibody solution containing a mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase antibody (anti-TH, Sigma, T1299) diluted 1:500 in PBS supplemented with 1.5% BSA and 0.2% Triton X-100.

The following day, sections were thoroughly rinsed with PBS and then incubated for three hours at room temperature (22-25°C) with the secondary antibody Cy3-conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 715-165-150) diluted at 1:500 in a solution of 1.5% BSA in PBS. After undergoing three additional rinses with PBS, the slices were mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930). Microscopic analysis was performed using a Zeiss epi-fluorescent microscope, and image capture was performed by a camera with subsequent analysis using ImageJ software. Notably, all slices were imaged under identical configurations encompassing magnification, illumination parameters, and exposure settings. To preserve the raw data, images were captured in grayscale format using the Zeiss software (ZEN microscopy software). Following acquisition, false coloring was applied using ImageJ to enhance visualization of the immunofluorescence signal.

Drugs

The nicotine (Nic) employed throughout all experiments was sourced as a nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich, USA). For chronic nicotine exposure, drinking water was replaced by a 100 µg/mL nicotine solution supplemented with 2% saccharine to mask the bitter taste of nicotine and ensure normal hydration (Mondoloni et al., 2023). The control solution was a 2% saccharine solution. For intra-peritoneal (IP) injections, the dose of nicotine used was 0.2 mg/kg.

Viruses

AAV-hSyn-GRAB-DA4.4 (Titer $\geq 1.2 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Vision Institute, Paris, France), rAAV5-hSyn-ChR2(H134R)-EYFP (Titer $\geq 1.8 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Addgene), rAAV5-hSyn1-Jaws-KGC-EGFP-ER2-WPRE-hGHp(A) (Titer $\geq 5.9 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland), rAAV5-hSyn1-EGFP-WPRE-hGHp(A) (Titer $\geq 5.7 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland), rAAV5-EF1a-DIO-YFP (Titer $\geq 9.1 \times 10^{13}$ vg.mL⁻¹, Vision Institute, Paris, France), AAVrg-hSyn1-chl-mCherry_2A_iCre-WPRE-SV40p(A) (Titer $\geq 8.4 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, VVF Zürich, Switzerland), , rAAV9-EF1a-DIO-EGFP-T2A-TK (Titer $\geq 2.0 \times 10^{12}$ vg.mL⁻¹, BrainVTA, Wuhan, China), HSV-ΔTK-LSL-tdTomato(H361) (Titer $\geq 1.1 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹, BrainVTA, Wuhan, China), Cholera Toxin Subunit B (Recombinant), Alexa Fluor™ 555 Conjugate (ThermoFisher Scientific, C34776).

Statistical analysis

A priori power analyses were not conducted to predetermine the exact number of animals utilized in the experiments. Sample sizes were instead estimated based on the researchers' prior experience within the field and aligned with sample sizes typically employed in similar studies. Randomization was implemented at the point of viral infection or behavioral testing to assign animals to their respective groups.

Statistical analyses were performed using MATLAB. The normality of data distributions was assessed using the Shapiro–Wilk test. For data sets failing the normality test, non-parametric

statistical tests were employed. Normally distributed data were analyzed using independent or paired t-tests depending on the study design. In cases where data normality was violated, the Mann–Whitney test or the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test were implemented. For experiments involving multiple comparisons, repeated-measures (RM) ANOVA was utilized. RM two-way ANOVA was employed for analyses involving two factors, assuming data normality and applying the Bonferroni–Holm correction post-hoc. All statistical tests were two-tailed. Data are presented as mean \pm s.e.m., with statistical significance established at a p-value threshold of $P < 0.05$.

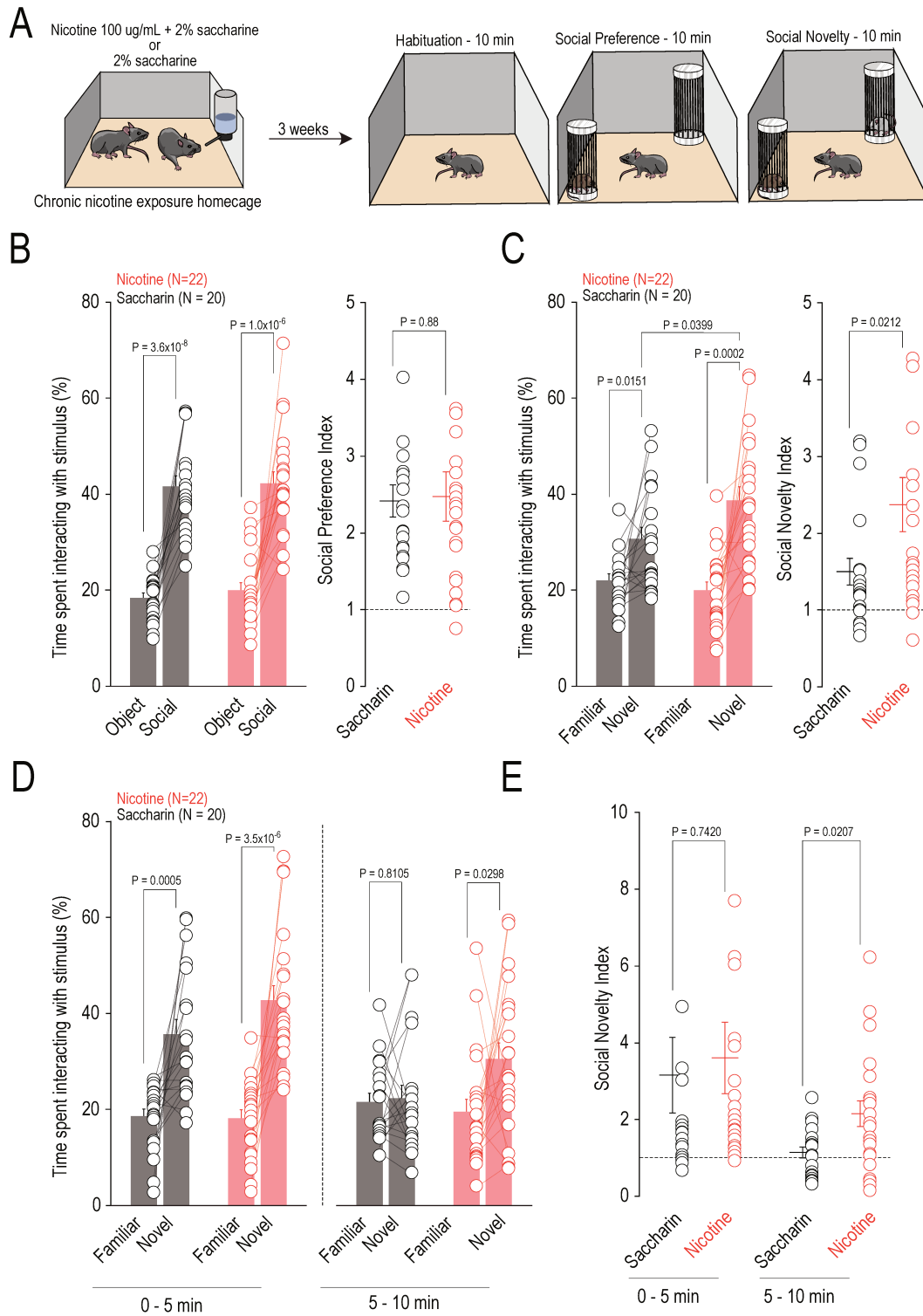


Figure 1

Figure 1: Chronic nicotine exposure changes social novelty exploration in a three-chamber task. **A.** Experimental protocol of the three-chamber task. Mice are chronically exposed to either nicotine (100 ug/mL + 2% saccharin) or saccharin during 3 weeks. Mice performed the three-chamber task with 10 min habituation to the arena, 10 min of social preference and 10 min of social novelty. **B.** Left: Comparison in the time spent interacting with object or social stimulus between saccharin and nicotine treated groups during social preference phase. Repeated Measure (RM) two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,40)} = 1.18$, $P = 1.75 \times 10^{-13}$; Treatment main effect: $F_{(1,40)} = 0.44$, $P = 0.5102$; Interaction: $F_{(1,40)} = 0.05$, $P = 0.8199$) followed by Bonferroni-Holm correction. Right: Social preference index comparison between saccharin and nicotine treated groups. Mann-Whitney U test two-sided ($U = 436$). **C.** Left: Comparison in the time spent interacting with familiar or novel social stimulus between saccharin and nicotine treated groups during social novelty phase. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,40)} = 33.92$, $P = 8.36 \times 10^{-7}$; Treatment main effect: $F_{(1,40)} = 2.32$, $P = 0.1358$; Interaction: $F_{(1,40)} = 4.52$, $P = 0.0397$) followed by Bonferroni-Holm correction. Right: Social novelty index comparison between saccharin and nicotine treated groups. Mann-Whitney U test two-sided ($U = 338$). **D.** Comparison in the time spent interacting with familiar or novel social stimulus between saccharin and nicotine treated groups during the first (T1) and last (T2) 5 mins of the social novelty phase. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,40)} = 54.47$, $P = 5.57 \times 10^{-9}$; Treatment main effect T1: $F_{(1,40)} = 2.97$, $P = 0.0927$; Interaction T1: $F_{(1,40)} = 1.69$, $P = 0.2006$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,40)} = 26.84$, $P = 6.64 \times 10^{-6}$; Treatment main effect T2: $F_{(1,40)} = 14.03$, $P = 5.68 \times 10^{-4}$; Interaction T2: $F_{(1,40)} = 21.66$, $P = 3.55 \times 10^{-5}$) followed by Bonferroni-Holm correction. **E.** Social novelty index comparison between saccharin and nicotine treated groups. RM two-way ANOVA (Time main effect: $F_{(1,40)} = 7.21$, $P = 0.0105$; Treatment main effect: $F_{(1,40)} = 0.92$, $P = 0.3430$; Interaction: $F_{(1,40)} = 0.19$, $P = 0.6649$) followed by Bonferroni-Holm correction. N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

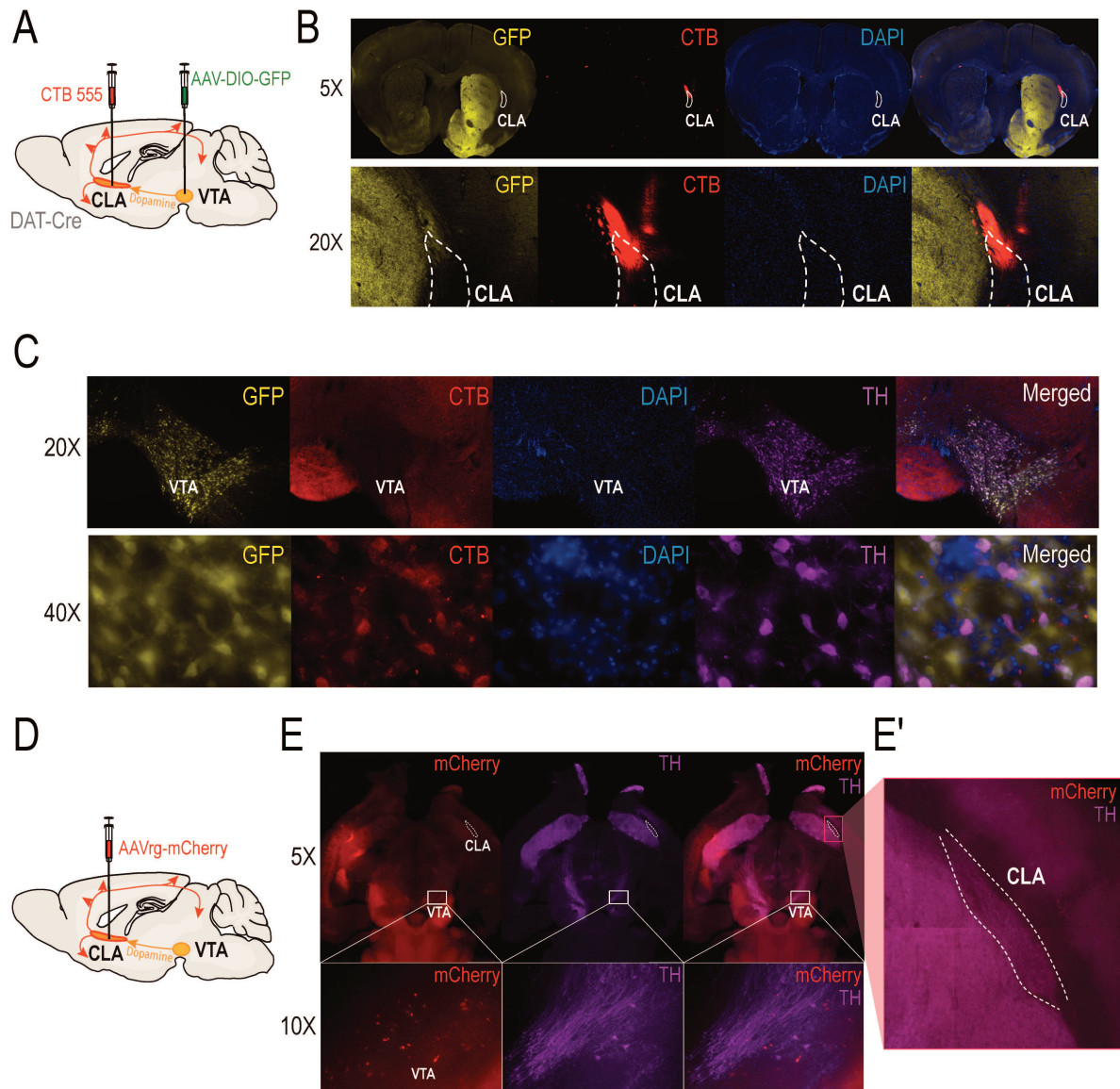


Figure 2

Figure 2: Anatomical characterization of the VTA-CLA pathway.

A. Schema of injections sites with AAV-hSyn-DIO-GFP in the VTA and CTB555 in the CLA in DAT-Cre mice. **B.** Viral expression of AAV-hSyn-DIO GFP (left) and CTB555 with injection site in the CLA (middle left). DAPI staining (middle right) and merging of all the viruses and staining at the level of the CLA (right). Higher magnification at the CLA level in the down row. **C.** Viral expression of AAV-hSyn-DIO-GFP and CTB555 at the level of the VTA in the DA neurons at low (up) and high (down) magnifications. DAPI and TH staining of the VTA (middle right and right). **D.** Schema of injection site with AAVrg-hSyn-mCherry in the CLA in WT mice. **E.** Horizontal slice of the VTA and the CLA with AAVrg-hSyn-mCherry expression and TH staining at low (up) and high (down) magnification of the VTA. **E'.** TH staining showing DA fibers from the midbrain in the CLA.

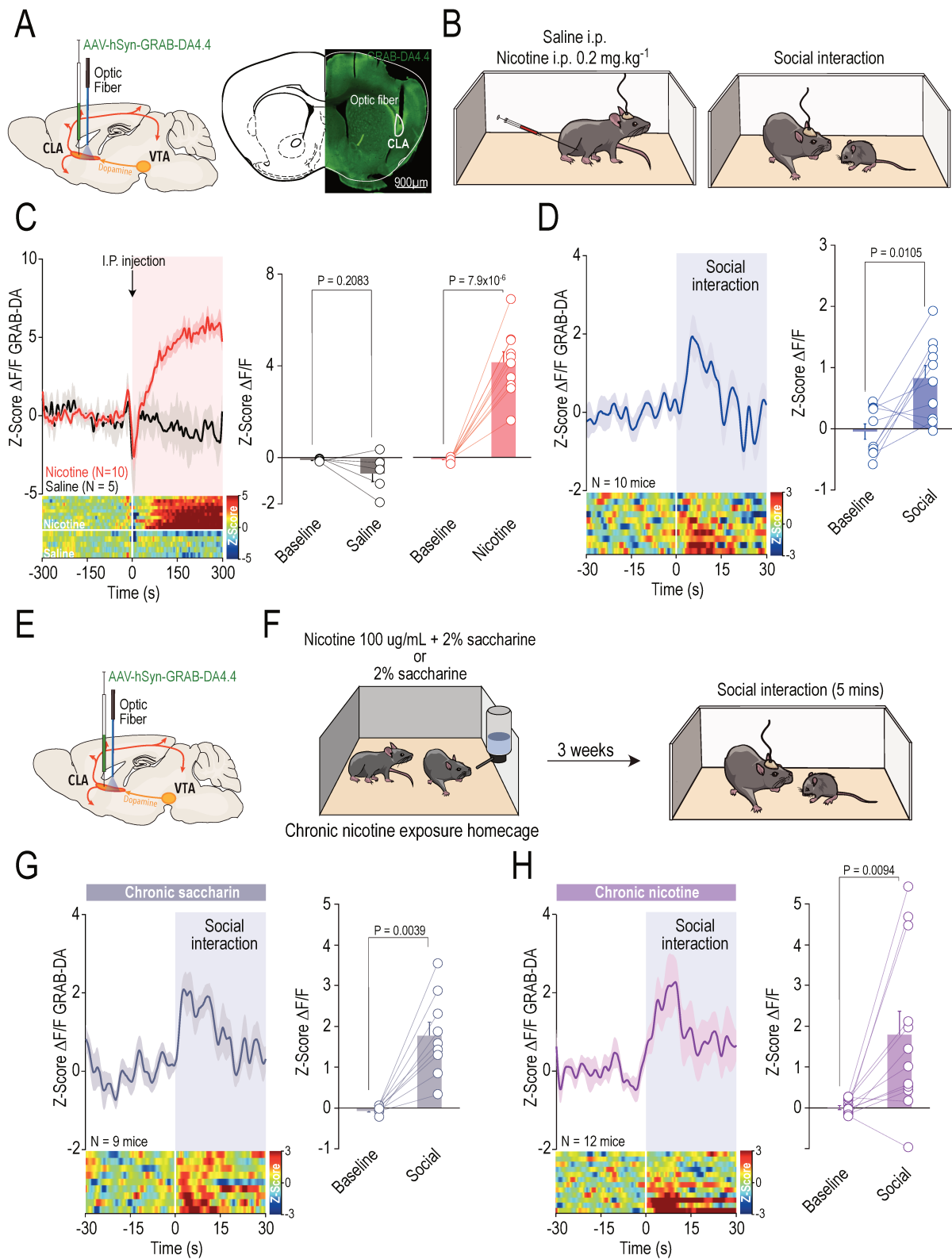


Figure 3

Figure 3: Social interactions and nicotine injections induce DA release in the CLA.

A. Left: Schema of injection site with AAV-hSyn-GRAB-DA and optic fiber implantation in the CLA. Right: Representative image of coronal brain slice of mice infected with AAV-hSyn-GRAB-DA (green) and optic fiber location in the CLA. Similar viral expression and optic fiber placement were observed in all the mice that performed this experiment. **B.** Schema of the IP nicotine or saccharin injections (left) and the free social interaction task (right) in mice. **C.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA before and after nicotine and saccharin IP injections (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and after IP injections of saccharin (left) and nicotine (right). Saline: Paired t-test two-sided ($t_{(4)} = 1.50$); Nicotine: Paired t-test two-sided ($t_{(9)} = -9.08$). **D.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA before and during 30s of social interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Paired t-test two-sided ($t_{(9)} = -1.49$). **E.** Schema of injection site with AAV-hSyn-GRAB-DA and optic fiber implantation in the CLA. **F.** Schema of chronic nicotine or saccharin treatment for 3 weeks (left) prior to free social interaction task (right) in mice. **G.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA of saccharin treated mice, before and during 30s of social interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Wilcoxon test two-sided ($W = 45$). **H.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA of nicotine treated mice before and during 30s of social interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Paired t-test two-sided ($t_{(11)} = -3.14$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

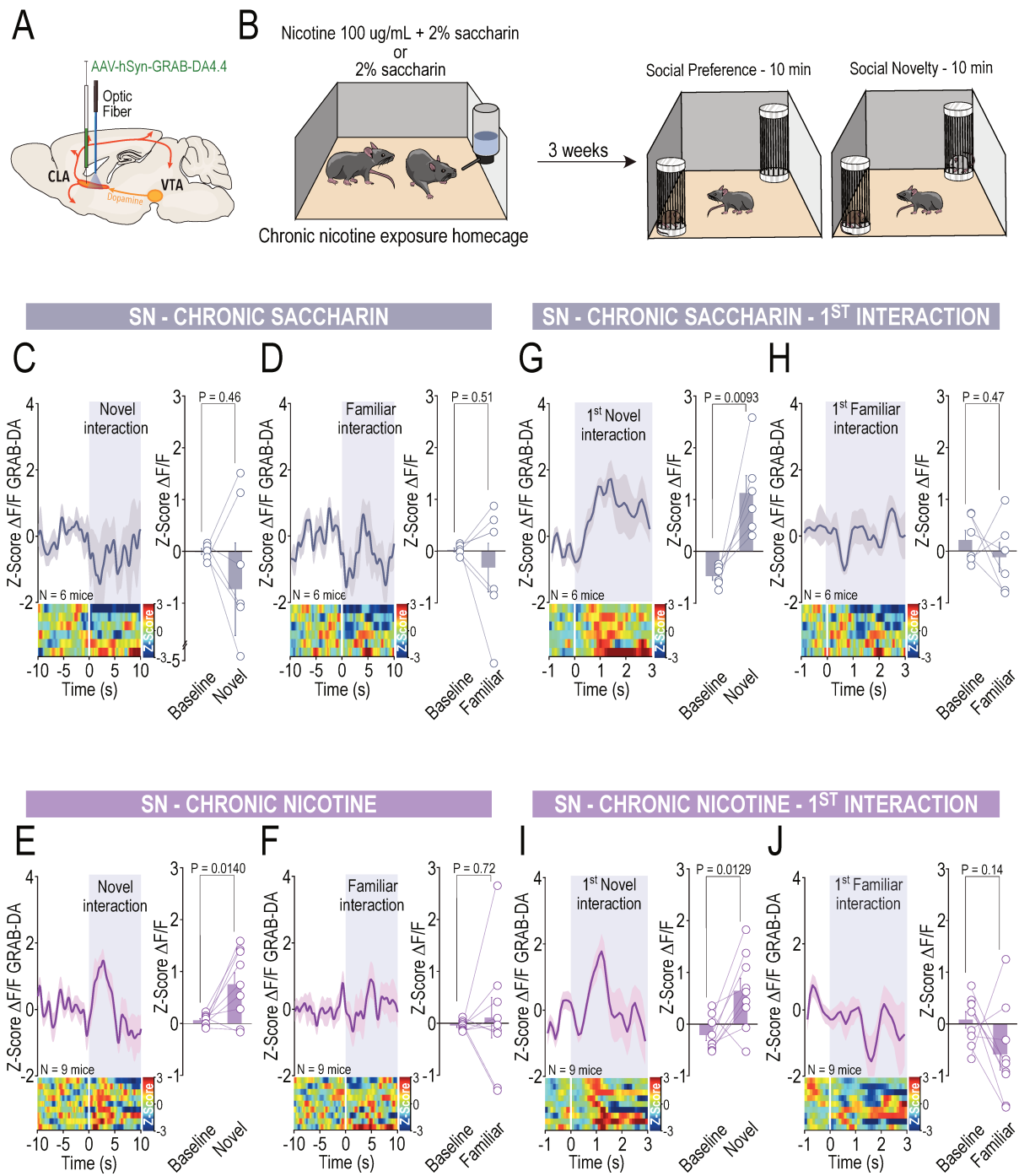


Figure 4

Figure 4: Chronic nicotine exposure maintains high DA release in the CLA during social novelty.

A. Schema of injection site with AAV-hSyn-GRAB-DA and optic fiber implantation in the CLA. **B.** Schema of chronic nicotine or saccharin treatment for 3 weeks (left) prior to the three-chamber task (right) in mice. **C.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on all interactions with the novel conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during novel social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = 0.79$). **D.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on all interactions with the familiar conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during familiar social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = 0.71$). **E.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on all interactions with the novel conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during novel social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -3.13$). **F.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on all interactions with the familiar conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during familiar social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -0.38$). **G.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on the 1st interaction with the novel conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st novel social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = -4.11$). **H.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on the 1st interaction with the familiar conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse

recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st familiar social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = 0.78$). **I.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on the 1st interaction with the novel conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st novel social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -3.18$). **J.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on the 1st interaction with the familiar conspecific (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st familiar social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = 1.63$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

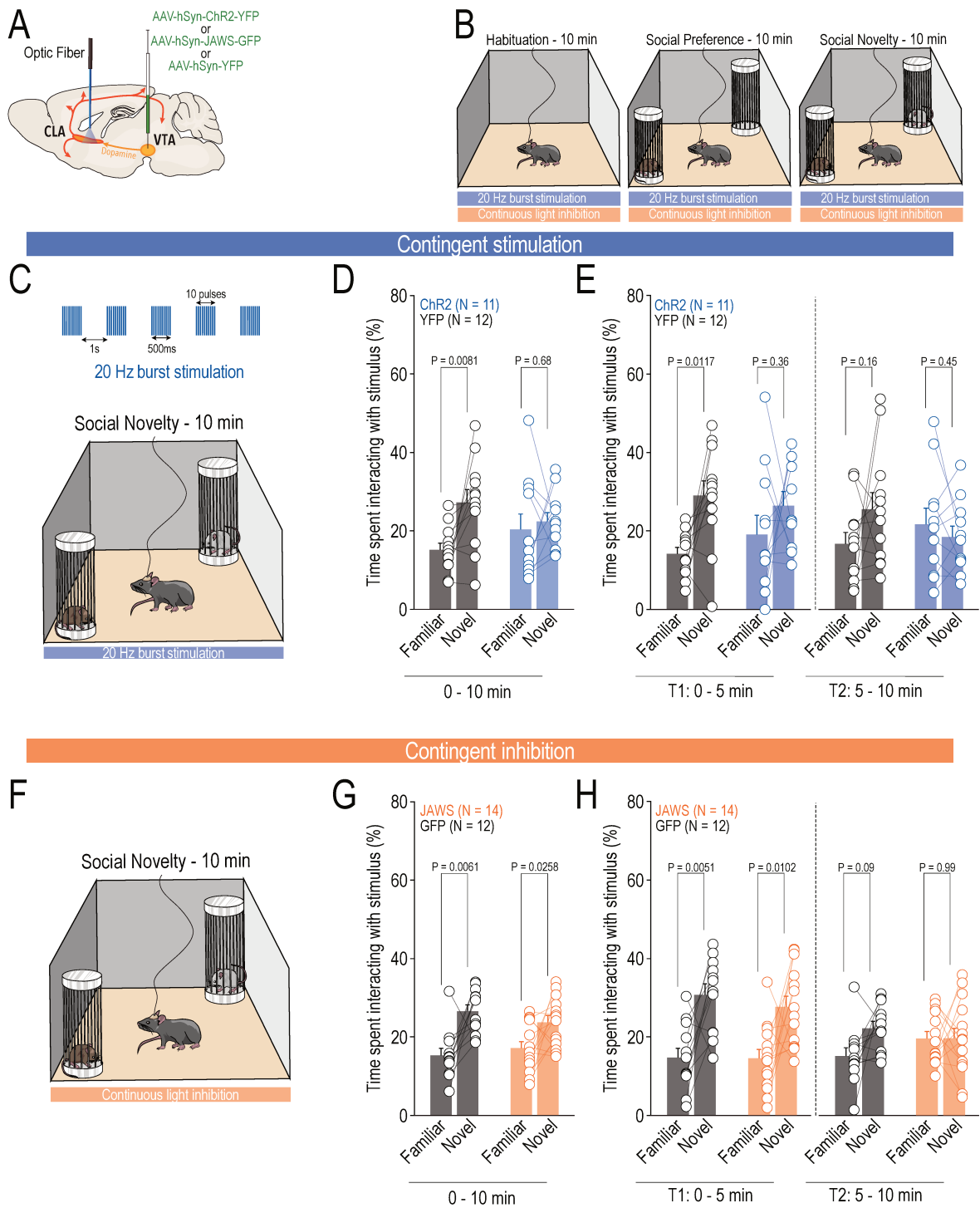


Figure 5

Figure 5: Optogenetic activation of the VTA-CLA pathway disrupts preference for novel social stimulus.

A. Left: Schema of injection site with AAV-hSyn-ChR2-YFP, AAV-hSyn-JAWS-GFP or AAV-hSyn-YFP in the VTA and optic fiber implantation above the CLA. Right: Representative image of coronal brain slice of mice infected with AAV-hSyn-ChR2-YFP in the VTA (green) and optic fiber location in the CLA. **B.** Schema of the three-chamber task with habituation, social preference and social novelty phases. **C.** Schema of the optical stimulation protocol applied to stimulate the VTA-CLA pathway (top) during the social novelty phase (down). **D.** Time spent interacting for VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,21)} = 5.95$, $P = 0.0236$; Virus main effect: $F_{(1,21)} = 0.002$, $P = 0.9595$; Interaction: $F_{(1,21)} = 0.86$, $P = 0.1073$) followed by Bonferroni-Holm correction. **E.** Time spent interacting for te VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,21)} = 7.53$, $P = 0.0122$; Virus main effect T1: $F_{(1,21)} = 0.23$, $P = 0.6333$; Interaction T1: $F_{(1,21)} = 0.92$, $P = 0.3478$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,21)} = 0.70$, $P = 0.4101$; Virus main effect T2: $F_{(1,21)} = 0.10$, $P = 0.7537$; Interaction T2: $F_{(1,21)} = 2.74$, $P = 0.1125$) followed by Bonferroni-Holm correction. **F.** Schema of the continuous optical inhibition protocol applied to inhibit the VTA-CLA pathway (top) during the social novelty phase (down). **G.** Time spent interacting for VTA-CLA^{JAWS} and VTA-CLA^{GFP} mice with the familiar and the novel social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,24)} = 19.70$, $P = 1.7 \times 10^{-4}$; Virus main effect: $F_{(1,24)} = 0.08$, $P = 0.7714$; Interaction: $F_{(1,24)} = 1.39$, $P = 0.2494$) followed by Bonferroni-Holm correction. **H.** Time spent interacting for VTA-CLA^{JAWS} and VTA-CLA^{GFP} mice with the familiar and the novel social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,24)} = 22.60$, $P = 7.8 \times 10^{-5}$; Virus main effect T1: $F_{(1,24)} = 0.87$, $P = 0.3605$; Interaction T1: $F_{(1,24)} = 0.15$, $P = 0.9644$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,24)} = 1.89$, $P = 0.1822$; Virus main effect T2: $F_{(1,24)} = 0.37$, $P = 0.5495$; Interaction T2: $F_{(1,24)} = 2.11$, $P = 0.1589$) followed by Bonferroni-Holm correction. N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

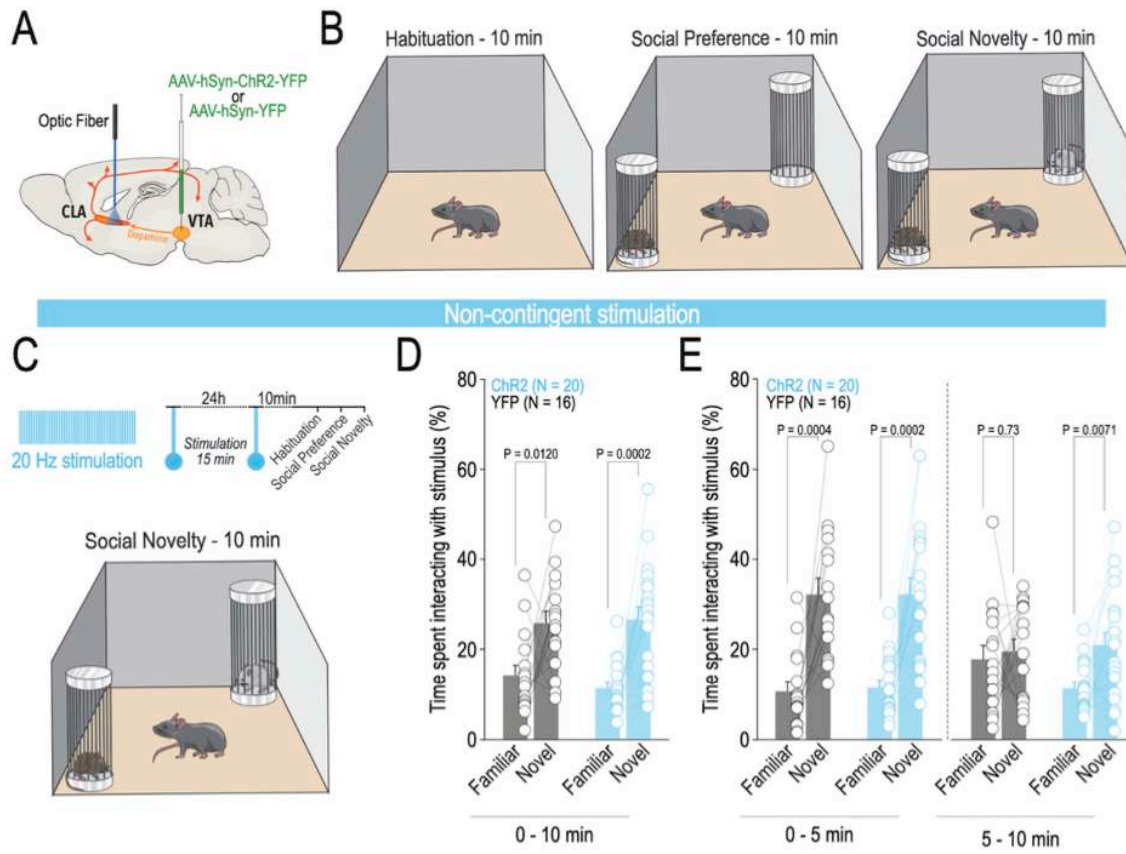
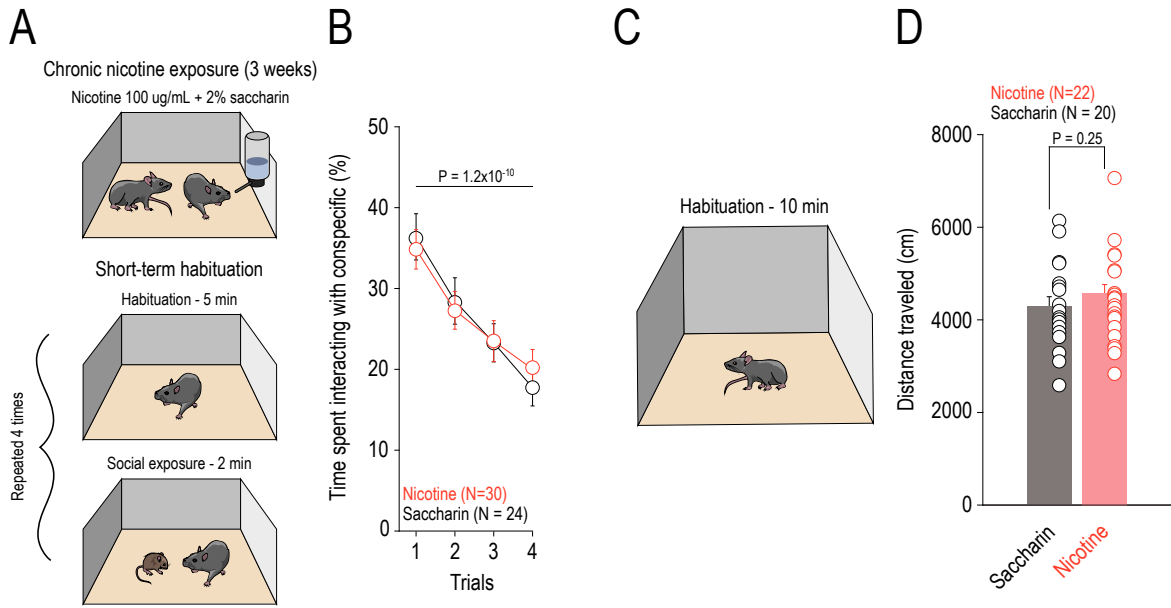


Figure 6

Figure 6: Non-contingent optogenetic stimulation of the VTA-CLA pathway mimics the effect of chronic nicotine on social novelty.

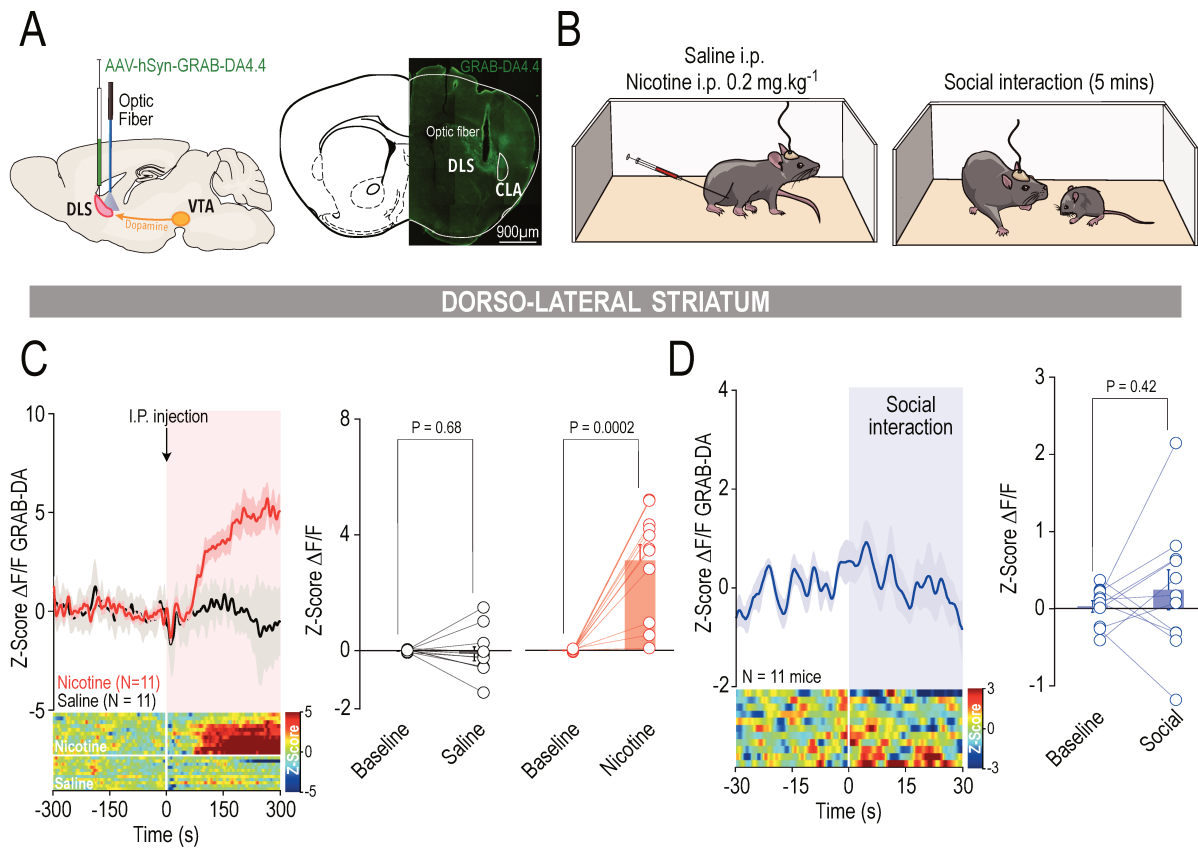
A. Left: Schema of injection site with AAV-hSyn-ChR2-YFP or AAV-hSyn-YFP in the VTA and optic fiber implantation above the CLA. Right: Representative image of coronal brain slice of mice infected with AAV-hSyn-ChR2-YFP in the VTA (green) and optic fiber location in the CLA. Similar viral expression and optic fiber placement were observed in all the mice that performed this experiment. **B.** Schema of the three-chamber task with habituation, social preference and social novelty phases. **C.** Schema of the non-contingent optical stimulation protocol applied to stimulate the VTA-CLA pathway (top) 24h and 10min before the three-chamber task (down). **D.** Time spent interacting for VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,34)} = 29.17$, $P = 5.2 \times 10^{-6}$; Virus main effect: $F_{(1,34)} = 0.24$, $P = 0.6272$; Interaction: $F_{(1,34)} = 0.48$, $P = 0.4920$) followed by Bonferroni-Holm correction. **E.** Time spent interacting for VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,34)} = 44.84$, $P = 1.1 \times 10^{-7}$; Virus main effect T1: $F_{(1,34)} = 0.03$, $P = 0.8629$; Interaction T1: $F_{(1,34)} = 0.02$, $P = 0.8976$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,34)} = 5.11$, $P = 0.0303$; Virus main effect T2: $F_{(1,34)} = 1.21$, $P = 0.2786$; Interaction T2: $F_{(1,34)} = 2.084$, $P = 0.1583$) followed by Bonferroni-Holm correction. N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.



Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1: Chronic nicotine exposure does not affect free social habituation nor locomotor activity.

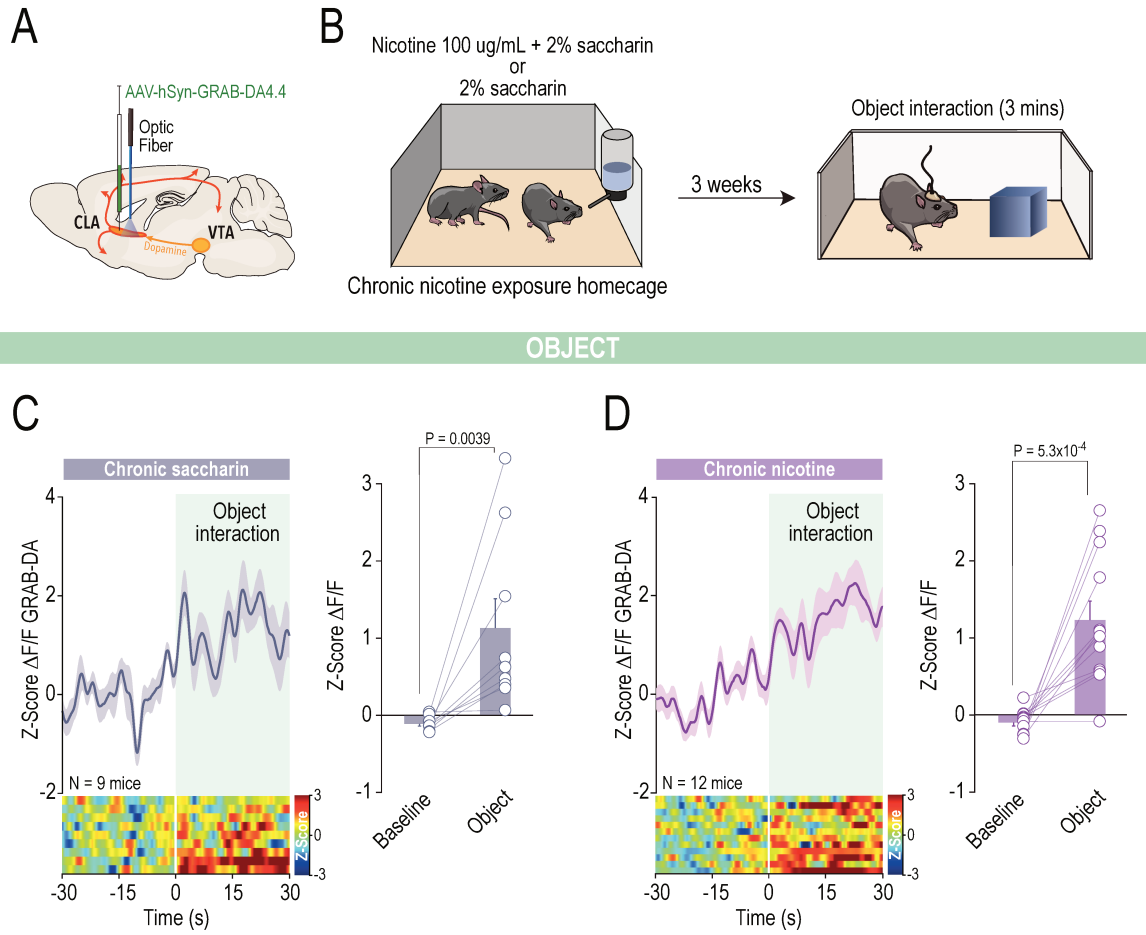
A. Schema of chronic nicotine or saccharin treatment for 3 weeks (up) prior to free social short-term habituation task (down) in mice. **B.** Time spent interacting with the conspecific that becomes familiar through the 4 trials for nicotine and saccharin treated groups. RM two-way ANOVA (Time main effect: $F_{(3,52)} = 19.21$, $P = 1.2 \times 10^{-10}$; Virus main effect: $F_{(1,52)} = 4.8 \times 10^{-4}$, $P = 0.9825$; Interaction: $F_{(3,52)} = 0.29$, $P = 0.8350$). **C.** Schema of the habituation phase of the three-chamber task. **D.** Distance traveled during the habituation phase for nicotine and saccharin treated groups. Unpaired t-test two-sided ($t_{(40)} = -1.18$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.



Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2: Social interaction does not increase in DA release in the DLS.

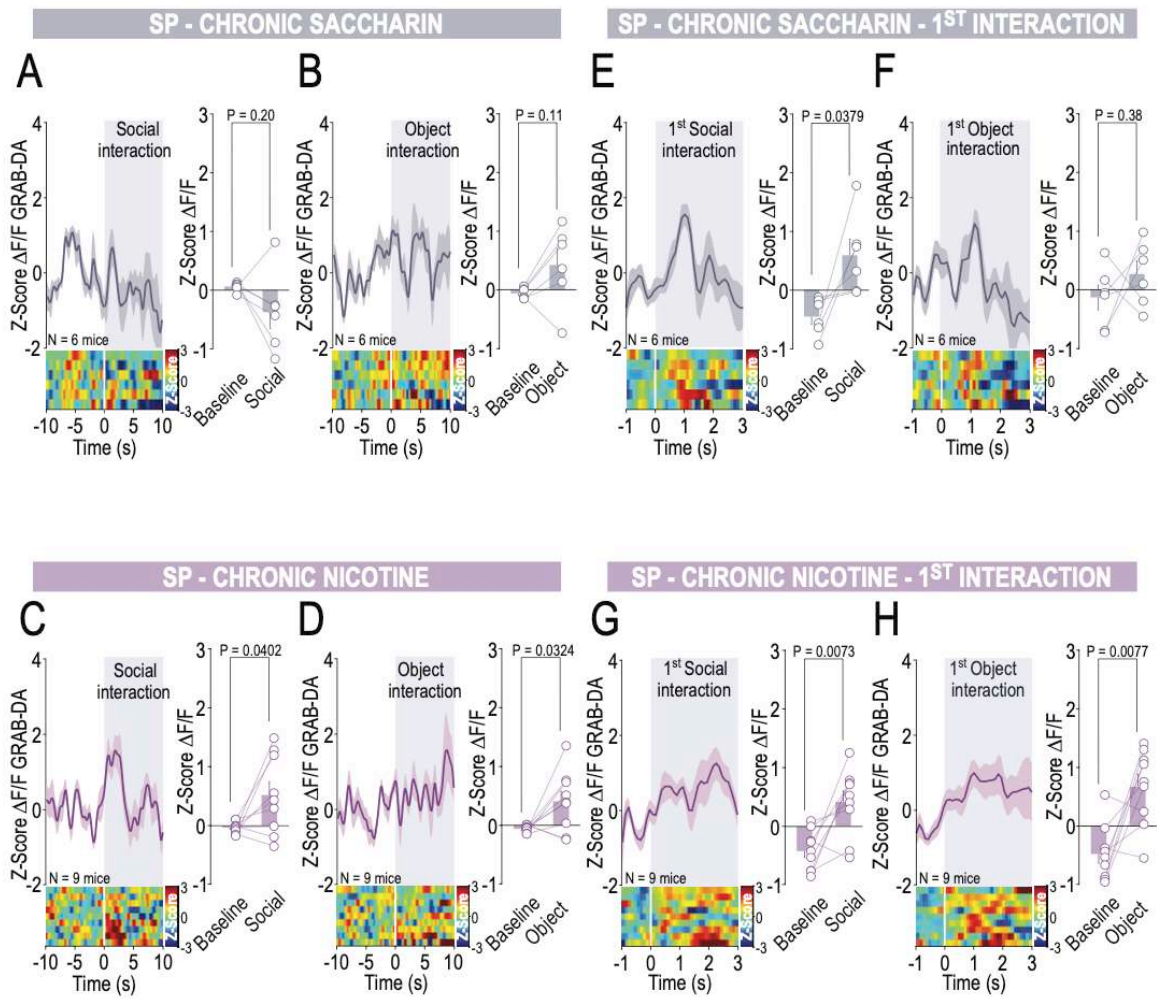
A. Left: Schema of injection site with AAV-hSyn-GRAB-DA and optic fiber implantation in the DLS. Right: Representative image of coronal brain slice of mice infected with AAV-hSyn-GRAB-DA (green) and optic fiber location in the DLS. Similar viral expression and optic fiber placement were observed in all the mice that performed this experiment. **B.** Schema of the IP nicotine or saccharin injections (left) and the free social interaction task (right) in mice. **C.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the DLS before and after nicotine and saccharin IP injections (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and after IP injections of saccharin (left) and nicotine (right). Saline: Paired t-test two-sided ($t_{(10)} = 0.42$); Nicotine: Paired t-test two-sided ($t_{(10)} = -5.65$). **D.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the DLS before and during 30s of social interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Paired t-test two-sided ($t_{(10)} = -0.84$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.



Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 3: Chronic nicotine exposure do not impact novel object exploration.

A. Schema of injection site with AAV-hSyn-GRAB-DA and optic fiber implantation in the CLA.
B. Schema of chronic nicotine or saccharin treatment for 3 weeks (left) prior to free object interaction (right) in mice. **C.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA of saccharin treated mice, before and during 30s of object interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Wilcoxon test two-sided ($W = 45$). **D.** Left: Time course of the normalized $\Delta F/F$ (Z-score) DA release in the CLA of nicotine treated mice before and during 30s of social interaction (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) before and during social interaction. Paired t-test two-sided ($t_{(11)} = -4.83$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

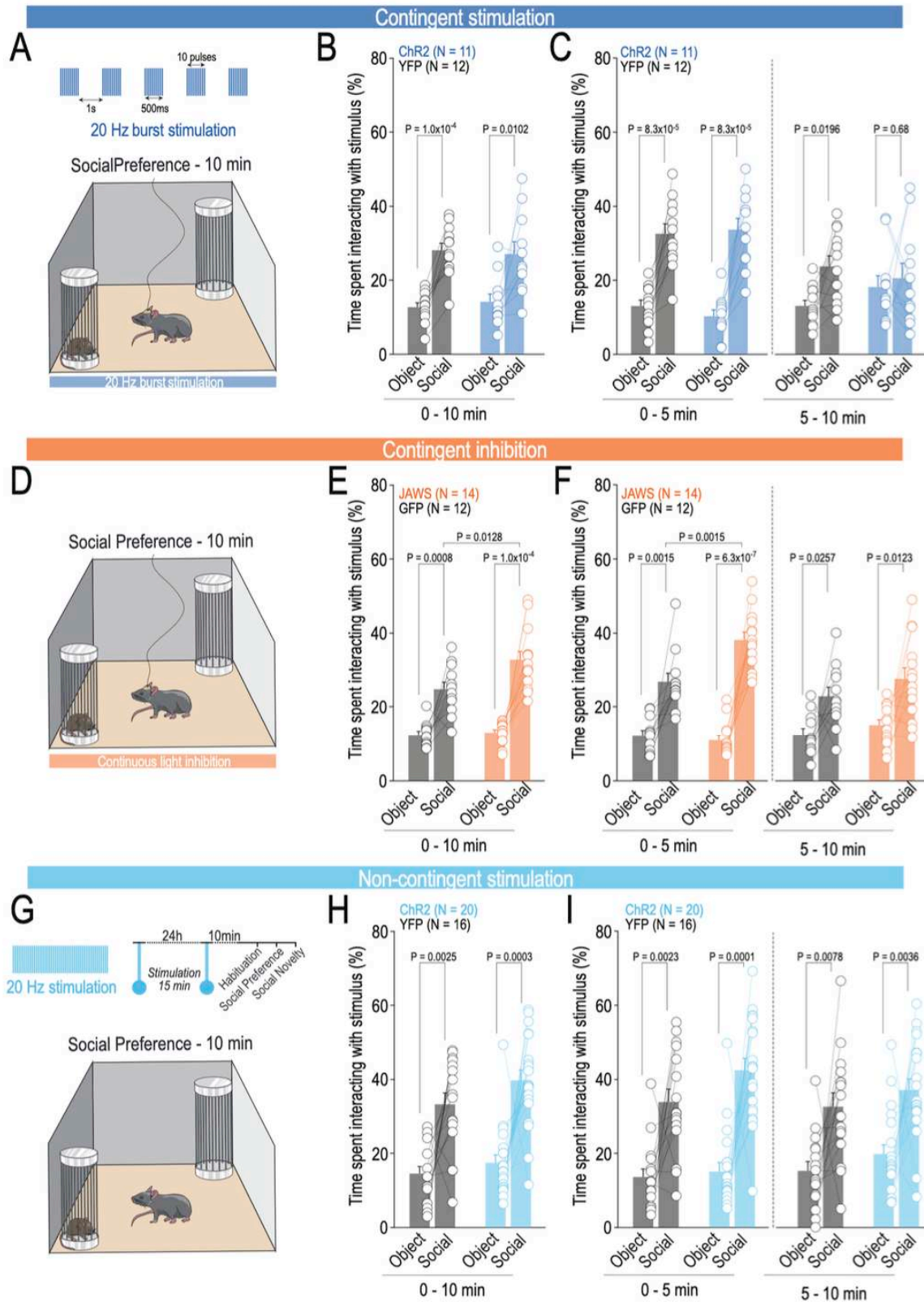


Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 4: Nicotine impact on DA release in the Social Preference task.

A. Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on all interactions with the social stimulus (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = 1.49$). **B.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on all interactions with the object (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during object interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = -1.93$). **C.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on all interactions with the social stimulus (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -2.45$). **D.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on all interactions with the object (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 10s before and 10s during object interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -2.58$). **E.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on the 1st interaction with the social stimulus (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = -2.80$). **F.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in saccharin treated mice centered on the 1st interaction with the object (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st object interaction. Paired t-test two sided ($t_{(5)} = -0.97$). **G.** Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on the 1st interaction with the social stimulus (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-

score) 1s before and 3s during 1st social interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -3.57$). **H.**
Left: Peri-Event Time histogram (PETH) of normalized $\Delta F/F$ (Z-score) CLA DA release in nicotine treated mice centered on the 1st interaction with the object (top) with the associated heatmap of each mouse recorded (down). Right: Mean $\Delta F/F$ (Z-score) 1s before and 3s during 1st object interaction. Paired t-test two sided ($t_{(8)} = -3.54$). N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.

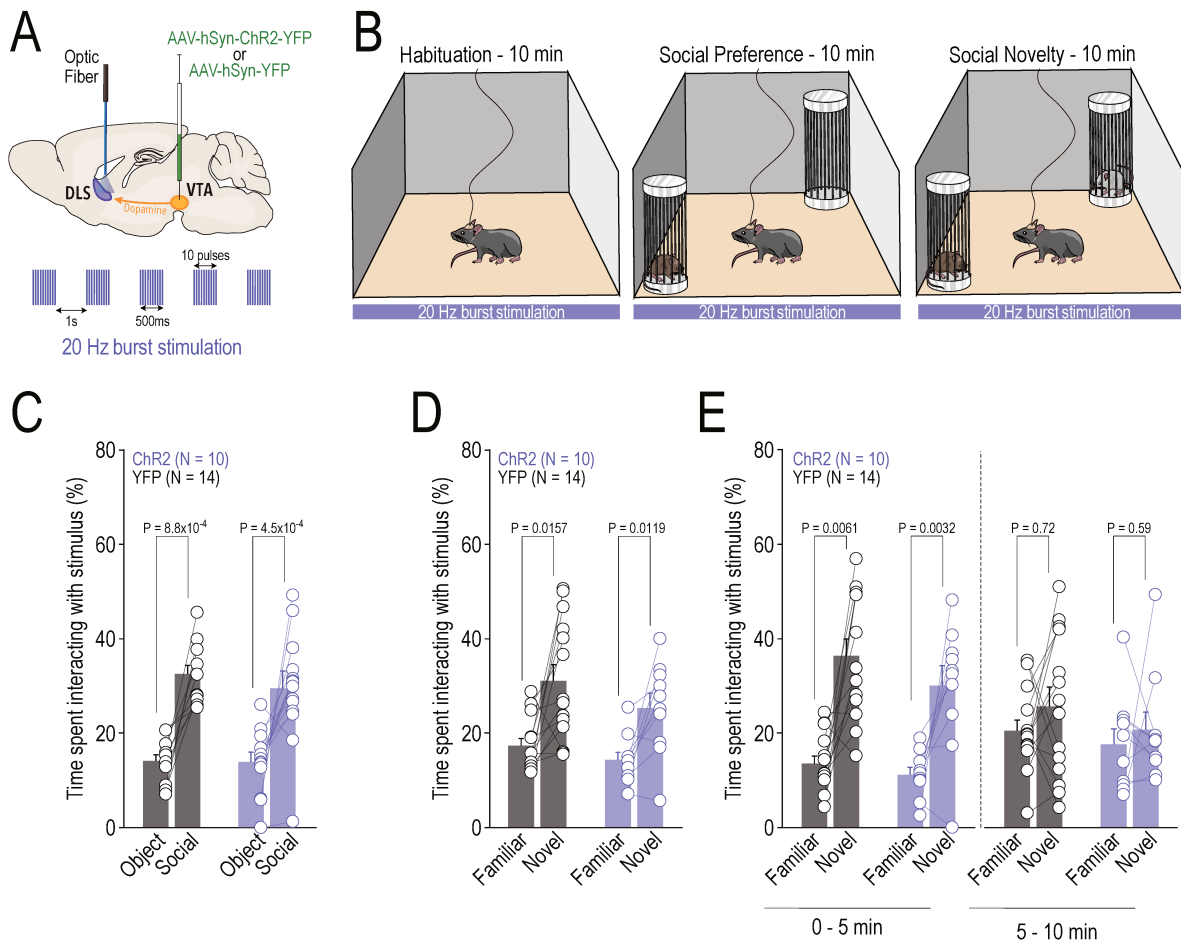


Supplementary Figure 5

Supplementary Figure 5: Optogenetic manipulation of the VTA-CLA pathway during Social Preference.

A. Schema of the optical stimulation protocol applied to stimulate the VTA-CLA pathway (top) during the social preference phase (down). **B.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{Chr2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the object and the social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,21)} = 41.43$, $P = 2.2 \times 10^{-6}$; Virus main effect: $F_{(1,21)} = 0.01$, $P = 0.9582$; Interaction: $F_{(1,21)} = 0.32$, $P = 0.5797$) followed by Bonferroni-Holm correction. **C.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{Chr2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the object and the social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,21)} = 84.27$, $P = 8.5 \times 10^{-9}$; Virus main effect T1: $F_{(1,21)} = 0.12$, $P = 0.73118$; Interaction T1: $F_{(1,21)} = 0.70$, $P = 0.4116$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,21)} = 4.38$, $P = 0.0487$; Virus main effect T2: $F_{(1,21)} = 0.13$, $P = 0.7204$; Interaction T2: $F_{(1,21)} = 1.68$, $P = 0.2088$) followed by Bonferroni-Holm correction. **D.** Schema of the continuous optical inhibition protocol applied to inhibit the VTA-CLA pathway (top) during the social preference phase (down). **E.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{JAWS} and VTA-CLA^{GFP} mice with the object and the social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,24)} = 83.35$, $P = 2.8 \times 10^{-9}$; Virus main effect: $F_{(1,24)} = 9.86$, $P = 0.0044$; Interaction: $F_{(1,24)} = 4.15$, $P = 0.0527$) followed by Bonferroni-Holm correction. **F.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{JAWS} and VTA-CLA^{GFP} mice with the object and the social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,24)} = 104.72$, $P = 3.1 \times 10^{-10}$; Virus main effect T1: $F_{(1,24)} = 11.40$, $P = 0.0025$; Interaction T1: $F_{(1,24)} = 8.85$, $P = 0.0066$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,24)} = 20.85$, $P = 0.0001$; Virus main effect T2: $F_{(1,24)} = 3.75$, $P = 0.0646$; Interaction T2: $F_{(1,24)} = 0.17$, $P = 0.6819$) followed by Bonferroni-Holm correction. **G.** Schema of the non-contingent optical stimulation protocol applied to stimulate the VTA-CLA pathway (top) 24h and 10min before the three-chamber task (down). **H.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{Chr2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the object and the social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,34)} = 39.82$, $P = 3.2 \times 10^{-7}$; Virus main effect: $F_{(1,34)} = 9.03$, $P = 0.0050$; Interaction: $F_{(1,34)} = 0.28$, $P = 0.5890$) followed by Bonferroni-Holm correction. **I.** Time spent interacting for the VTA-CLA^{Chr2} and VTA-CLA^{YFP} mice with the familiar and the novel social

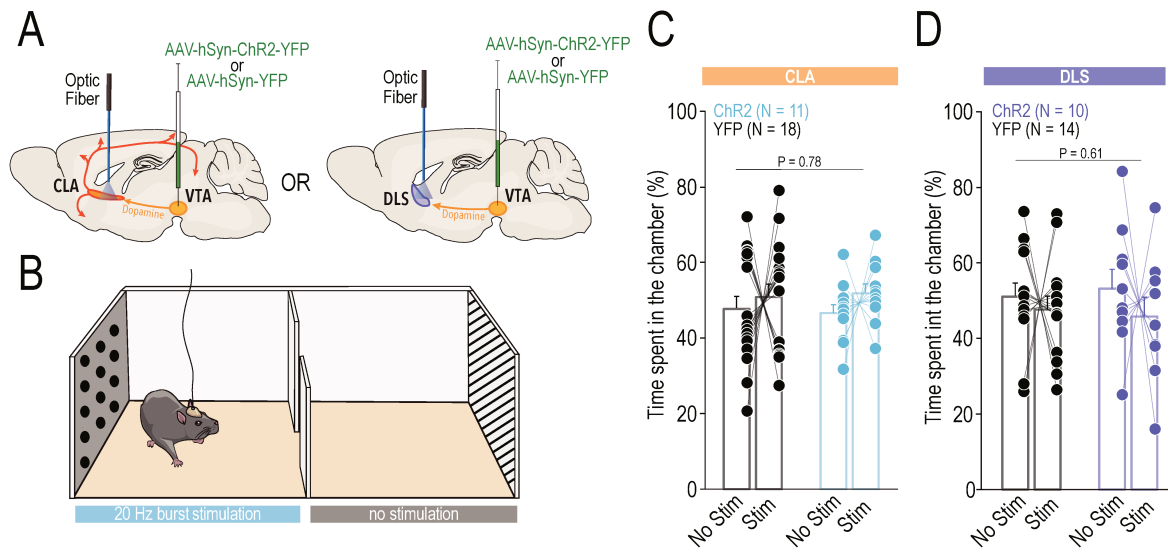
stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,34)} = 44.99$, $P = 1.1 \times 10^{-7}$; Virus main effect T1: $F_{(1,34)} = 6.65$, $P = 0.0144$; Interaction T1: $F_{(1,34)} = 0.95$, $P = 0.3361$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,34)} = 22.48$, $P = 3.7 \times 10^{-5}$; Virus main effect T2: $F_{(1,34)} = 4.94$, $P = 0.0331$; Interaction T2: $F_{(1,34)} = 8.6 \times 10^{-6}$, $P = 0.9996$) followed by Bonferroni-Holm correction. N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.



Supplementary Figure 6

Supplementary Figure 6: Optogenetic activation of the VTA-DLS pathway.

A. Schema of injection site with AAV-hSyn-ChR2-YFP or AAV-hSyn-YFP in the VTA and optic fiber implantation above the DLS. **B.** Schema of the three-chamber task with habituation, social preference and social novelty phases. **C.** Time spent interacting for VTA-DLS^{ChR2} and VTA-DLS^{YFP} mice with the object and the social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,22)} = 45.31$, $P = 9.1 \times 10^{-7}$; Virus main effect: $F_{(1,22)} = 0.51$, $P = 0.4837$; Interaction: $F_{(1,22)} = 0.30$, $P = 0.5864$) followed by Bonferroni-Holm correction. **D.** Time spent interacting for VTA-DLS^{ChR2} and VTA-DLS^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect: $F_{(1,22)} = 17.52$, $P = 0.0004$; Virus main effect: $F_{(1,22)} = 1.90$, $P = 0.1822$; Interaction: $F_{(1,22)} = 0.01$, $P = 0.9275$) followed by Bonferroni-Holm correction. **E.** Time spent interacting for VTA-DLS^{ChR2} and VTA-DLS^{YFP} mice with the familiar and the novel social stimuli during T1 and T2. RM two-way ANOVA (Stimulus main effect T1: $F_{(1,22)} = 27.78$, $P = 2.7 \times 10^{-5}$; Virus main effect T1: $F_{(1,22)} = 2.28$, $P = 0.1456$; Interaction T1: $F_{(1,22)} = 0.06$, $P = 0.8044$ / Stimulus main effect T2: $F_{(1,22)} = 1.13$, $P = 0.2980$; Virus main effect T2: $F_{(1,22)} = 1.01$, $P = 0.3258$; Interaction T2: $F_{(1,22)} = 0.01$, $P = 0.9108$) followed by Bonferroni-Holm correction. N indicates the number of mice. All the data are shown as the mean \pm s.e.m. as error bars.



Supplementary Figure 7

Supplementary Figure 7: Optogenetic activation of the VTA-CLA or VTA-DLS pathway does not induce a real-time place preference.

A. Schema of injection site with AAV-hSyn-ChR2-YFP or AAV-hSyn-YFP in the VTA and optic fiber implantation above the CLA (left) or the DLS (right). **B.** Schema of the real-time place preference with stimulation protocol in the associated chamber. **C.** Time spent in the chamber for VTA-CLA^{ChR2} and VTA-CLA^{YFP} mice depending on the stimulation protocol. RM two-way ANOVA (Chamber main effect: $F_{(1,27)} = 0.75$, $P = 0.3937$; Virus main effect: $F_{(1,27)} = 0.08$, $P = 0.7791$; Interaction: $F_{(1,27)} = 0.06$ $P = 0.8138$). **D.** Time spent in the chamber for VTA-DLS^{ChR2} and VTA-DLS^{YFP} mice depending on the stimulation protocol. RM two-way ANOVA (Chamber main effect: $F_{(1,22)} = 0.74$, $P = 0.40$; Virus main effect: $F_{(1,22)} = 0.26$, $P = 0.6130$; Interaction: $F_{(1,22)} = 0.10$ $P = 0.7498$).

Chapitre 8 : Contrôle cholinergique endogène de la VTA et récompenses primaires

Au cours de ces travaux, je me suis intéressée à plusieurs voies et leur implication dans différents aspects de l'addiction à la nicotine. Néanmoins, une question que je me suis posée tout au long de ce travail de doctorat concerne le rôle endogène de ces voies et circuits. Je me suis donc concentrée sur le rôle du contrôle cholinergique endogène de la VTA en réponse à des récompenses « naturelles » (par opposition aux drogues). Pour se faire nous avons développé une nouvelle tâche au sein du laboratoire que je vais à présent vous présenter après une courte revue bibliographique sur le sujet.

Comme discutée précédemment, l'activité des neurones DAergiques de la VTA joue un rôle primordial dans l'encodage de récompenses naturelles, comme la nourriture et les interactions sociales (voir **Chapitre 4**) (Gunaydin et al. 2014; Solié et al. 2022). Nous savons que cette activité des neurones DAergiques est régulée par l'ACh, via l'expression de fortes densités de récepteurs nicotiques, rendant le système également réceptif à la nicotine (Changeux 2010b; Faure et al. 2014; Zoli et al. 2015). Ainsi, des études se sont attelées à étudier comment la VTA répond à la nicotine, et comment une exposition chronique à la nicotine détourne le fonctionnement normal du circuit pour mener à l'addiction (Caillé et al. 2009; Dongelmans et al. 2021). Cependant, l'étude du contrôle cholinergique endogène de la VTA issu des afférences en provenance des noyaux du pont, et plus particulièrement son implication dans l'encodage de récompenses naturelles, mais également son rôle de manière générale, reste peu étudié.

Les principaux travaux s'y étant intéressés ont été réalisés à travers l'étude comportementale de souris délétées pour la sous-unité $\beta 2$ des nAChR, permettant ainsi d'éliminer le contrôle nicotinique de la VTA, qui passe majoritairement par les récepteurs $\alpha 4\beta 2^*$ (Faure et al. 2014). Ainsi, ces différentes études ont permis de mettre en avant l'implication de la modulation cholinergique dans différents types de comportement. En effet, les souris $\beta 2^{-/-}$ présentent une hyperactivité locomotrice dans une arène qui serait la conséquence d'une absence de certains états inactifs ou « stops » (Maubourguet et al. 2008). Ces états, dits inactifs en matière de déplacement, sont en réalité associés chez des souris de type sauvage à l'analyse de leur environnement. Ils se traduisent notamment par des comportements de redressement sur les pattes arrière (*rearing*), pouvant également s'effectuer le long des murs (*wall rearing*). Ces stops constituent des moments importants

permettant aux animaux d'analyser leur environnement, et de collecter des informations qui pourront à terme leur permettre de s'y adapter. Les souris $\beta 2^{-/-}$ naviguent effectivement beaucoup plus, se rendant d'un point A à un point B, et explorant ainsi beaucoup moins leur environnement (Granon et al. 2003). De manière surprenante, ces déficits d'exploration se traduisent également par une amélioration de leur capacité d'apprentissage spatial. Les souris $\beta 2^{-/-}$ présentent également des modifications au niveau de leurs séquences comportementales (Granon et al. 2003; Maubourguet et al. 2008; Serreau et al. 2011). L'absence des états inactifs pourrait ainsi impacter les stratégies utilisées par les animaux pour explorer leurs environnements, menant à des modifications de leurs séquences comportementales mais également à terme de leur prise de décision. Ces différences au niveau de l'organisation des séquences comportementales chez la souris ont également été observées dans une autre étude. L'utilisation d'une tâche mettant en conflit différents types de récompenses naturelles a également abouti à l'observation de différences au niveau de l'organisation comportementale (Serreau et al. 2011). Les souris $\beta 2^{-/-}$ placées dans un nouvel environnement en compagnie d'un congénère ainsi que de petites pelletes de nourriture présentent des déficits au niveau de la flexibilité de leurs choix et dans la résolution de conflits. Ces déficits ne sont pas expliqués par un dysfonctionnement des comportements d'inhibition comme l'impulsivité motrice, ou le contrôle moteur (Granon et al. 2003; Serreau et al. 2011). Par ailleurs, les souris $\beta 2^{-/-}$ présentent également des déficits cognitifs dans leur manière d'interagir socialement (Granon et al. 2003). En effet, celles-ci ont tendance à s'engager de manière plus importante dans des interactions sociales, et à s'en dégager beaucoup moins que les souris WT. Finalement, une étude du laboratoire a permis de mettre en évidence l'importance de la sous-unité $\beta 2$ des nAChR dans la recherche d'incertitude (Naudé et al. 2016). Des souris $\beta 2^{-/-}$ ont ainsi réalisé une tâche dans laquelle trois points sont récompensés de manière probabiliste (25%, 50%, 100%) par une stimulation intra-crâniale du MFB. De manière intéressante, les souris $\beta 2^{-/-}$ explorent significativement moins le point récompensé à 50% que les souris WT. Il est important de noter que la particularité de ce point réside dans l'incertitude maximale d'y obtenir une récompense. Les souris $\beta 2^{-/-}$ présenteraient ainsi un déficit au niveau de la recherche d'incertitude, ce phénotype étant restauré par la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ spécifiquement au niveau de la VTA.

Outre l'utilisation de souris $\beta 2^{-/-}$, des enregistrements de type micro-dialyse au niveau de la VTA ont également permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration extracellulaire d'ACh lors de la consommation de nourriture et d'eau (Rada et al. 2000). Par ailleurs, l'administration de molécules modifiant le tonus cholinergique produit des effets biphasiques sur les comportements renforcés par une récompense naturelle (Grasing 2016).

En effet, l'administration d'inhibiteurs de l'AChE, d'agonistes des nAChR ou des mAChR peut à la fois augmenter et diminuer les comportements renforcés par une récompense (auto stimulation, CPP) (Liu 2000; Grottick and Higgins 2000; van Haaren et al. 2001; Sanjakdar et al. 2015). Chez l'Homme, l'administration de fortes doses d'inhibiteur de l'AChE est à l'origine d'anorexie, de nausées et de perte de poids (Imbimbo 2001). A l'inverse, l'injection d'antagonistes des nAChR ou des mAChR bloquent ces mêmes comportements (Yeomans and Baptista 1997; Levin et al. 2000). De ces résultats, une hypothèse qui expliquerait ces effets biphasiques a été formulée. En accord avec les travaux de R. L. Solomon et J. D. Corbit (Solomon and Corbit 1974, 1978), l'hypothèse serait qu'au-delà d'un premier seuil, plutôt faible, l'ACh augmenterait les comportements renforcés par une récompense naturelle, puis lorsque les niveaux dépassent un second seuil plus élevé, l'ACh s'opposerait à ces mêmes comportements (Grasing 2016). De cette manière, les niveaux d'ACh pourraient jouer un rôle essentiel dans la modulation des informations concernant la valeur motivationnelle via le contrôle qu'elle exerce sur le système mésolimbique (Mark et al. 2011). Bien que l'ensemble de ces travaux ait permis de mieux comprendre les potentiels rôles d'une modulation nicotinique endogène générale, les techniques employées ne permettent pas d'étudier de manière précise les dynamiques de libération d'ACh au niveau de la VTA.

Nous avons développé une nouvelle tâche dans le but d'étudier le rôle de la cholinergie endogène, et ce, de manière plus éthologique. L'objectif était ensuite d'y étudier les dynamiques de libération d'ACh et de manipuler la transmission nicotinique grâce aux outils chémogénétiques développés au cours de ma thèse. Nous avons donc construit une cage constituée de deux compartiments, chacun pouvant héberger une souris (voir **Figure 8.1**). Au sein de chaque compartiment, sont disposés deux leviers, le premier permettant l'obtention de pelletes de nourriture et le second permettant d'ouvrir une porte entre les deux chambres. Cette porte est constituée de barreaux métalliques espacés d'un centimètre, permettant des interactions visuelles, auditives, olfactives et tactiles entre les deux individus (voir **Figure 8.1**). Des faisceaux lasers sont également disposés au niveau de la mangeoire. En récupérant la pellette de nourriture, la souris rompt le faisceau, nous servant de proxy pour savoir à quel moment la nourriture est consommée. Un biberon d'eau par chambre est accessible sans contrainte tout au long de la tâche. Les souris y sont hébergées de manière continue durant quatre jours et performant donc la tâche en parallèle. L'image est enregistrée par une caméra et les souris sont détectées de manière directe. Ainsi, cette tâche nous permet d'étudier différents paramètres qui pourraient dépendre de la modulation cholinergique endogène, à savoir l'organisation des séquences comportementales face à différents types de récompenses naturelles en conflit (nourriture

et interactions sociales), de manière générale les interactions sociales, et enfin l'encodage de l'incertitude. En effet, l'incertitude peut survenir lors de l'ouverture de la porte déclenchée par la souris présente dans l'autre chambre, mais également en jouant sur les règles d'obtention des récompenses lors des appuis-leviers.

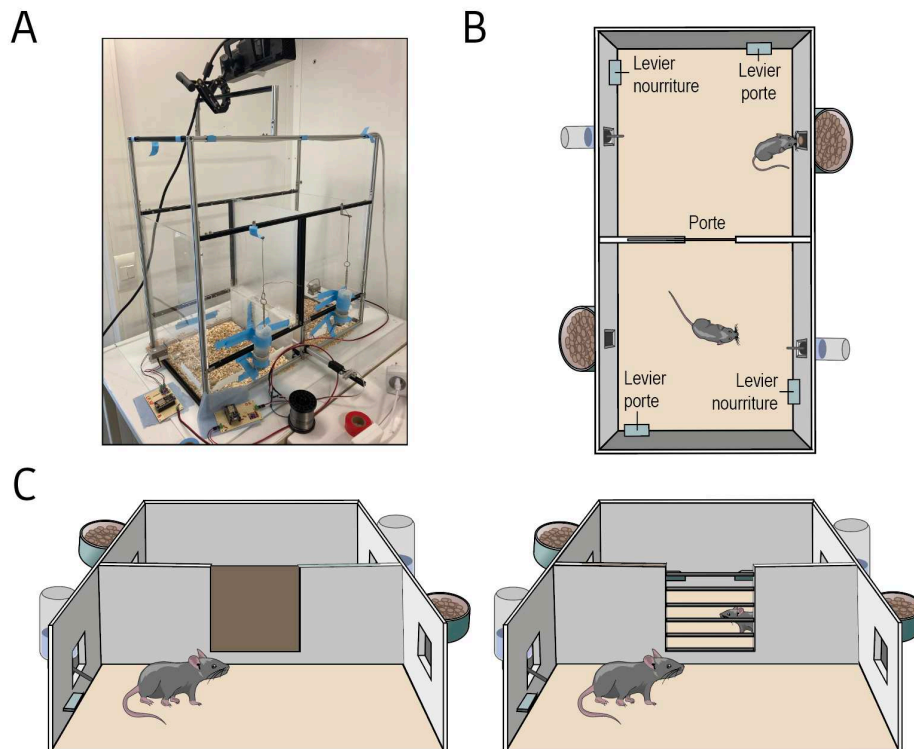


Figure 8.1 : La Slow-dating task | **A.** Photographie de la cage. **B.** Représentation schématique de la cage vue du dessus. Chaque compartiment héberge une souris durant quatre jours, et est composé de deux leviers, l'un permettant la délivrance d'une pellette de nourriture, le second permettant l'ouverture de la porte. La nourriture est délivrée au niveau de la mangeoire, de part et d'autre de laquelle un faisceau laser est positionné. L'eau se trouve à disposition dans un biberon accessible tout au long de la tâche. **C.** Représentation schématique de la cage vue de profil, porte fermée à gauche et ouverte à droite.

Cette tâche, que nous avons appelée « Slow-dating task » (SDT), présente plusieurs avantages, notamment en éliminant le besoin de priver les animaux de nourriture ou de les isoler en amont. Elle permet également de limiter les contacts entre les animaux et l'expérimentateur, mais aussi d'étudier le comportement des souris de manière continue et au moment approprié de leur cycle circadien. Les souris étant des animaux nocturnes, nous avons pu observer la présence d'un pic d'activité se situant au début de la nuit, entre 20 heures et minuit, ainsi qu'une très faible activité diurne pour l'ensemble des récompenses observées (i.e. la nourriture et les interactions sociales) (voir **Figure 8.2**). En comptabilisant les appuis-levier délivrant de la nourriture, nous avons pu observer une augmentation de

leur nombre entre le premier et le deuxième jour, le maximum se trouvant lors du deuxième jour (voir **Figure 8.2**). Le nombre d'appuis-leviers diminue ensuite entre le deuxième et le troisième jour pour se stabiliser durant le restant de la tâche au nombre nécessaire pour répondre aux besoins des souris (environ 150 pellettes par jour). Ces résultats suggèrent un apprentissage de l'association entre l'appui-levier et l'obtention d'une pellette de nourriture. En regardant le nombre de faisceaux laser rompus (*beam broken*), nous pouvons voir une évolution inverse avec un maximum atteint le premier jour, et le nombre d'appui-levier diminuant au cours de la tâche pour se stabiliser à un nombre légèrement supérieur à leurs besoins alimentaires. Il existe ainsi un raffinement du comportement au cours de l'apprentissage de l'association entre l'appui-levier et l'obtention d'une récompense à la fois pour les appuis-leviers, mais également pour les *beams broken*. Concernant les appuis-levier permettant l'ouverture de la porte, nous pouvons constater que le nombre reste stable tout au long de l'expérience. De manière intéressante, en traçant les trajectoires des souris au cours des six secondes suivant un appui-levier, nous avons pu observer qu'alors que l'association entre le levier délivrant la nourriture et la nourriture semble claire, l'association entre le levier permettant l'ouverture de la porte et la porte semble l'être beaucoup moins (voir **Figure 8.2**). En effet, on observe suite à un appui-levier porte une forte proportion de trajectoires se dirigeant vers la mangeoire. Ces résultats mettent ainsi en lumière l'existence pour la souris d'une incertitude concernant la récompense obtenue suite à l'appui sur le levier permettant l'ouverture de la porte. Cette incertitude pourrait également expliquer le nombre plus élevé de *beam broken* obtenus tout au long de la tâche. Afin d'étudier les différentes séquences comportementales et leur organisation, nous avons mis en place des analyses. Pour se faire, nous avons créé des régions d'intérêt au niveau des différents leviers, de la mangeoire et de la porte. La détection de la souris dans ces régions, associée aux temps d'appuis-levier et *beam broken* nous permettent de créer des matrices de transition entre les différents éléments remarquables de la cage. Ces analyses nous permettent d'obtenir finalement l'ensemble des séquences réalisées par la souris.

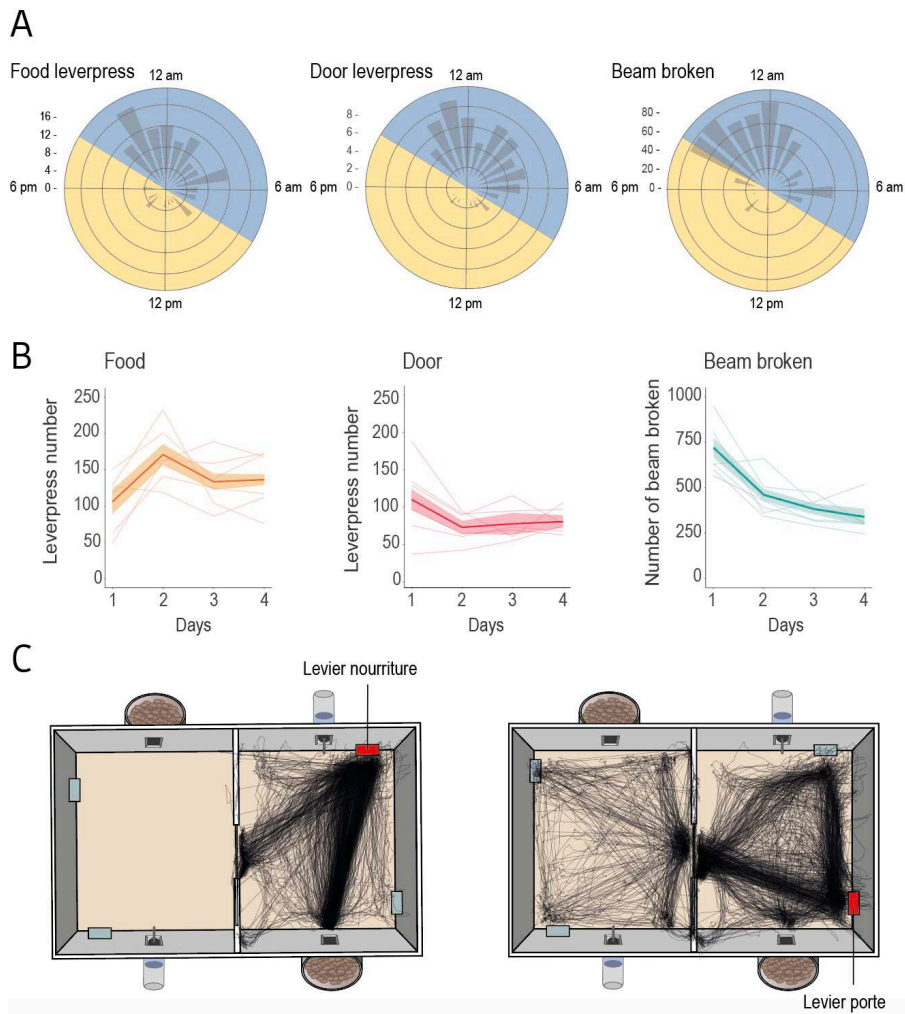


Figure 8.2 : Premiers résultats dans la SDT | **A.** Nombre d'appuis-levier sur la dernière journée de la tâche pour la nourriture (Gauche), pour la porte (Milieu), et nombre de faisceaux laser coupés, représentatif des pellettes de nourriture consommées (Droite). L'ensemble des animaux présentent un pic d'activité en début de nuit. **B.** Évolution du nombre d'appui-levier pour la nourriture, la porte et les faisceaux laser coupés au cours de la tâche. **C.** Représentation des trajectoires d'une souris au cours des six secondes suivant un appui-levier pour obtenir de la nourriture (Gauche), et pour ouvrir la porte (Droite). L'ouverture de la porte semble également induire un mouvement de la souris n'ayant pas appuyé sur le levier au niveau de la porte.

Cette tâche a pour objectif de pouvoir étudier les dynamiques de libération d'ACh, mais également de manipuler la transmission nicotinique endogène à l'aide des différents outils développés au cours de ma thèse. Pour se faire, nous avons réalisé des expériences d'expression d'un senseur de l'ACh (GACH) (Jing et al. 2018, 2020) au niveau des neurones de la VTA (voir **Figure 8.3**). Ces expériences avaient cependant un très faible rendement de par une mauvaise expression du senseur, et le signal enregistré était problématique à l'analyse. En effet, nous n'avons pas observé de transients d'activité composés d'un front de montée rapide et d'une phase de décroissance plus lente, qui seraient synonymes d'une

transmission synaptique, ni de variations de fluorescence avec des dynamiques plus lentes pour une transmission volumique. Nous avons enregistré des activités possédant des fronts de montée et de descente rapide ainsi qu'une absence de variance de l'amplitude des évènements, donnant lieu à des évènements de type tout ou rien. Après avoir réalisé différents types d'analyses pour détecter ces évènements, changé le sérotype et le promoteur du virus exprimant le senseur, nous avons décidé d'arrêter l'utilisation de ce senseur et de se concentrer sur l'utilisation du senseur de la DA. Nous avons donc réalisé des enregistrements en photométrie fibrée de la libération de DA au niveau du NAc, dont les résultats restent encore à être analysés, et horodatés sur les différents évènements remarquables de la cage (appui-levier, ouverture de la porte, interactions sociales, consommation des pelletes). Par la suite, l'utilisation des souris KI β 2E61C et du MPEG₄Ch pourront nous permettre d'étudier l'impact d'une inhibition prolongée de la transmission nicotinique à la fois au niveau comportemental, mais également au niveau de la libération de DA dans les structures cibles, et ainsi de mieux comprendre le rôle de la modulation nicotinique endogène de la VTA.

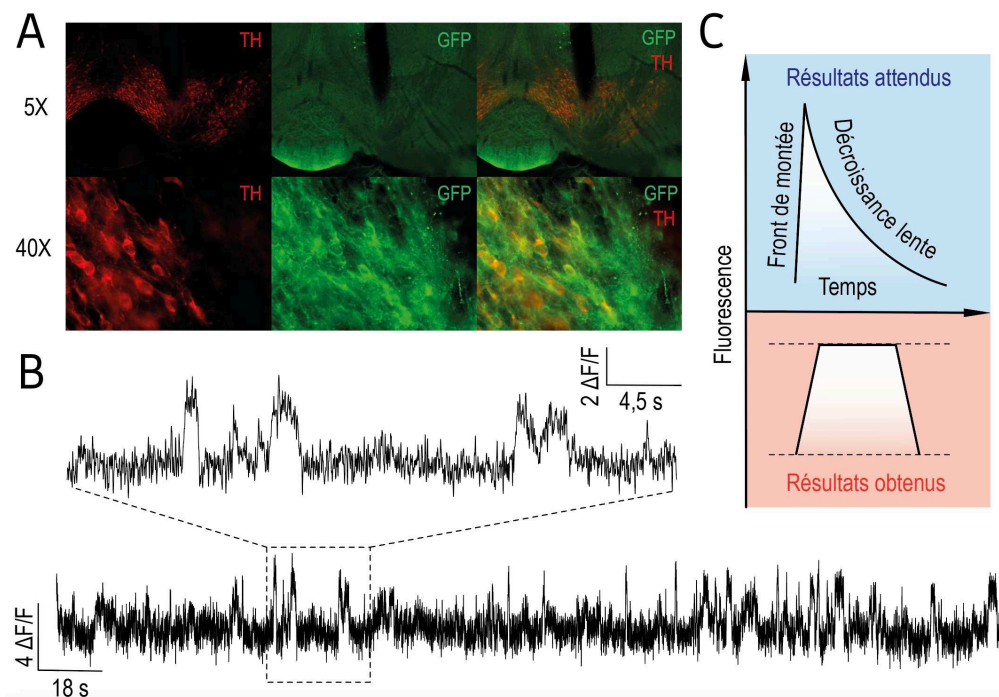


Figure 8.3 : Enregistrements des évènements cholinergiques dans la VTA | A. Site d'injection du senseur de l'ACh, GCh4.3. **B.** Exemple d'enregistrement en photométrie fibrée du signal cholinergique dans la VTA **C.** Représentation schématique d'un transient composé d'un front de montée rapide et d'une décroissance lente d'un signal en bleu, et des types de signaux obtenus composé d'un front de montée et d'une décroissance rapide, ainsi que d'une amplitude bimodale des évènements.

Discussion

Discussion

1. Développement d'outils chémogénétiques pour étudier la transmission nicotinique

Le développement d'outil chémogénétique a été un axe très important de ma thèse et a constitué ma contribution majeure à l'article présenté lors du **Chapitre 6**. Aussi, de nombreuses expériences ont été menées avant d'aboutir à leur mise en place *in vivo*. Après vous avoir présenté quelques-unes d'entre elles et les questionnements auxquels nous avons été confrontés, je discuterai des questions soulevées par nos outils sur les dynamiques de turnover des nAChR.

Afin d'étudier les implications différentielles des sous-types de nAChR dans le fonctionnement endogène des circuits et après perturbation par la nicotine, le laboratoire a développé de nouveaux outils chémogénétiques (souris KI et ligands, voir **Chapitre 5**). Un des premiers objectifs de ma thèse a été de vérifier que la mutation E61C des souris KI n'a pas d'effet adverse sur la physiologie des cellules et que nous pouvons moduler la transmission nicotinique avec les ligands complémentaires. Pour se faire, j'ai caractérisé l'activité électrophysiologique des neurones DAergiques de la VTA de ces souris en patch clamp. J'ai pu montrer que la mutation ne perturbe pas la physiologie de base des neurones (données non montrées) et que l'amplitude des courants nicotiniques est inchangée (voir **Figure 9.1**). J'ai ensuite réalisé des enregistrements électrophysiologiques des neurones de la VTA de ces souris KI après incubation de la tranche avec l'antagoniste photo contrôlable (MAHoCh). Les courants nicotiniques évoqués par un puff d'ACh (en présence d'Atropine dans le bain) ont été enregistrés pour un même neurone après exposition à la lumière violette, permettant au MAHoCh de prendre sa configuration *cis*, ou à la lumière verte lui permettant alors de passer dans une configuration *trans*. Ainsi, comme observé suite à une transduction virale de la sous-unité mutée (Durand-de Cuttoli et al. 2018), nous avons pu observer que l'amplitude des courants était inhibée sous lumière violette et restaurée sous lumière verte (voir **Figure 9.1**). Cependant, nous avons également pu constater qu'il existait une grande variabilité dans le pourcentage de photo inhibition des courants nicotiniques des neurones de la VTA chez la souris $\beta 2E61C$, dont la moyenne avoisinait seulement 30 %. Le nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ étant majoritairement exprimé dans les neurones DA de la VTA, nous avons été surpris par ces résultats. Le faible rendement obtenu peut s'expliquer de différentes manières. Par exemple, une oxydation des cystéines pendant la préparation des tranches pourrait diminuer le rendement de conjugaison avec le maléimide. Cependant, le fort

rendement d'antagonisme observé avec MPEG₄Ch (voir **Figure 9.1**) laisse penser que ce phénomène, même si existant, n'est pas suffisant pour expliquer le faible rendement. A noter cependant que les taux de marquage avec MPEG₄Ch sont plus importants lorsque le ligand est infusé *in vivo* que lorsqu'il est incubé avec les tranches (voir **Chapitre 6**), laissant penser que les cystéines sont en partie oxydées lors de la préparation des tranches. Malgré l'expression majoritaire des nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ au niveau de la VTA, d'autres récepteurs y sont également exprimés et ne comportent pas la sous-unité $\beta 2$, ce qui pourrait alors diminuer le pourcentage de photo inhibition des courants nicotiques. Là encore, la comparaison avec le fort niveau d'antagonisme observé avec MPEG₄Ch laisse penser que le problème ne vient pas du niveau d'expression de $\beta 2$. Une autre possibilité est que la molécule elle-même, le MAHoCh, se soit dégradée. Nous avons analysé le lot de MAHoCh utilisé par chromatographie HPLC et constaté en effet la présence d'autres dérivés contenant un groupe maléimide, qui pourraient potentiellement réagir avec les cystéines et réduire le rendement de marquage. D'autre part, le maléimide est un groupement chimique très réactif qui a pu s'hydrolyser au contact de l'eau lors du stockage, même si nous prenons soin de le dissoudre dans du DMSO anhydre. La réalisation de ces mêmes expériences en incubant cette fois-ci les tranches de VTA avec le ligand irréversible (MPEG₄Ch) nous a permis d'obtenir un pourcentage plus important d'inhibition des courants (d'environ 60 %), correspondant plus aux ordres de grandeur attendus. De plus, ces expériences avec MPEG₄Ch ont montré une absence d'effet chez les animaux WT, indiquant que la cystéine E61C est essentielle pour l'attachement du ligand et l'antagonisme des récepteurs. Les problèmes rencontrés lors des expériences utilisant le MAHoCh seraient donc plus susceptibles de provenir du MAHoCh en lui-même. Pour cette raison, je me suis focalisée sur l'utilisation du MPEG₄Ch pour le reste de ma thèse.

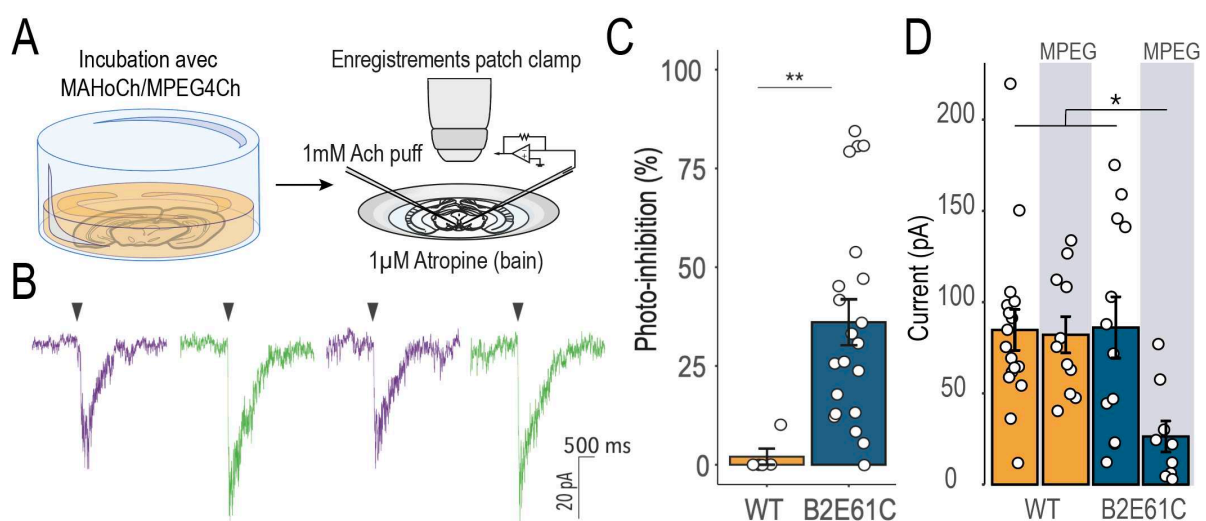


Figure 9.1 : Caractérisation des ligands chémogénétiques chez la souris KI β 2E61C |
A. Les tranches de cerveau sont incubées avec du MAHoCh ou du MPEG₄Ch (50 μ M) puis l'excès de ligand est lavé. Des enregistrements électrophysiologiques des courants nicotiques évoqués par un puff d'ACh dans la VTA en présence d'atropine dans le bain sont ensuite réalisés. **B.** Photo-antagonisme des courants nicotiques après marquage avec le MAHoCh : l'amplitude des courants nicotiques est diminuée sous lumière violette puis restaurée sous lumière verte. **C.** Pourcentage de photo-inhibition des courants nicotiques par le MAHoCh chez des souris KI ou WT. **D.** Amplitude des courants nicotiques des neurones DAergiques de la VTA chez des souris KI ou WT après incubation (ou non) avec du MPEG₄Ch. Le MPEG₄Ch n'a pas d'effet sur les souris WT, et inhibe les courants nicotiques chez la souris KI β 2E61C.

Des expériences d'infusion unique de MPEG₄Ch au niveau de l'IPN nous ont permis de bloquer la transmission nicotinique pendant plus de vingt jours, permettant ainsi de constater que le MPEG₄Ch agit de manière non seulement immédiate mais aussi durable. Ces résultats suggèrent également que l'attachement du ligand au nAChR est irréversible, comme cela avait déjà pu être observé pour ce type de liaison (Szijj et al. 2018). Cependant, la durée de l'antagonisme induit par le MPEG₄Ch questionne les mécanismes mis en jeu dans les dynamiques de *turnover* des récepteurs (défini ici comme le recyclage entre les nAChR présents au niveau des stocks intracellulaires et ceux présents à la membrane), à propos desquels nous n'avons que peu d'information. Le MPEG₄Ch étant une molécule polaire, il est peu probable qu'il puisse diffuser à travers la membrane intracellulaire pour marquer les stocks de nAChR intracellulaires. De plus, le milieu intracellulaire étant un milieu réducteur, quand bien même le MPEG₄Ch réussirait à passer la membrane cellulaire, le maléimide serait hydrolysé, ne permettant ainsi pas le marquage des nAChR intracellulaires. De cette manière, le MPEG₄Ch ne devrait marquer que les nAChR extracellulaires présents au niveau de la membrane plasmique. Par ailleurs, il est peu probable que le MPEG₄Ch demeure sous sa forme attachable pendant tant de jours dans le cerveau. En effet, en raison de sa petite taille, le MPEG₄Ch devrait diffuser rapidement hors du site d'injection. De plus, sa réactivité chimique nous laisse supposer que le groupement maléimide devrait rapidement s'hydrolyser au contact des différentes cystéines libres présentes dans cet environnement. Tous ces éléments nous amènent à penser qu'il est peu probable que le MPEG₄Ch puisse marquer les nAChR intracellulaires, ou qu'il puisse séjourner de manière prolongée dans le milieu extracellulaire tout en restant fonctionnel. Une hypothèse concernant les mécanismes à l'origine de l'antagonisme durable induit par le MPEG₄Ch, serait que les dynamiques de *turnover* des récepteurs sont très lentes (supérieure à vingt jours), et que lors de nos expériences, le stock membranaire de nAChR n'a pas été renouvelé. À l'inverse, il est également possible que la cinétique du *turnover* des récepteurs soit très rapide, et comparable à celle du marquage par le MPEG₄Ch. Ainsi, lors

de son infusion, le MPEG₄Ch pourrait marquer l'ensemble des nAChR synthétisés par la cellule, ces derniers étant recyclés en permanence. Dans ce cas, le rétablissement d'une transmission nicotinique normale de la cellule dépendrait de la synthèse *de novo* de récepteurs pouvant prendre plusieurs semaines (Fornasiero et al. 2018). Indépendamment des cinétiques de *turnover* des récepteurs, il serait également possible que le stock intracellulaire de récepteurs soit très faible par rapport au nombre de nAChR présents à la membrane. Dans ce cas, l'infusion de MPEG₄Ch permettrait d'antagoniser une grande majorité des récepteurs de la cellule en ne marquant que le stock présent à la membrane.

Les processus de *turnover* des nAChR *in vivo* étant peu connus et difficiles à étudier, réaliser cette même expérience dans d'autres structures pourrait s'avérer intéressant. En effet, l'infusion de MPEG₄Ch au niveau de la VTA nous permettrait de comprendre si les cinétiques de *turnover* des nAChR sont les mêmes pour d'autres types de récepteurs comme les nAChR $\beta 2^*$. Il pourrait également être intéressant d'infuser du MPEG₄Ch au niveau d'une autre structure exprimant les nAChR $\beta 4^*$ comme la mHb, ce qui nous permettrait de déterminer si pour un même type de récepteur, les cinétiques de *turnover* sont différentes en fonction de la structure au niveau de laquelle il est exprimé. La nicotine ayant déjà été démontrée comme pouvant jouer le rôle de chaperonne (Corringer et al. 2006; Lester et al. 2009), il pourrait également être intéressant d'utiliser nos outils chémogénétiques pour observer si une exposition chronique à la nicotine (ou un arrêt d'exposition pour mimer le manque) peut modifier les cinétiques de *turnover* des récepteurs.

L'ensemble de ces outils chémogénétiques nous offre différentes possibilités pour manipuler la transmission nicotinique et plus précisément un sous-type de nAChR, ce qui est actuellement impossible à réaliser via l'utilisation d'agents pharmacologiques traditionnels. Le MAHoCh permet de réaliser un *knock-out* réversible avec une excellente résolution temporelle puisque sa vitesse de photo-isomérisation est de l'ordre de la milliseconde. Cependant, un désavantage dans son utilisation réside dans la nécessité d'amener la lumière, et donc une fibre optique au niveau de la structure d'intérêt. Une possibilité d'amélioration pourrait être de réussir à rendre l'azobenzène sensible à des longueurs d'ondes dans l'infra-rouge proche (800-1000 nm) (Dong et al. 2015) afin de remplacer l'étape d'implantation intra-crâniale de la fibre optique par la fixation d'une LED au-dessus du crâne. De cette manière, la stimulation lumineuse serait moins invasive et se ferait de manière transcrâniale. À l'inverse du MAHoCh, le MPEG₄Ch permet d'antagoniser les nAChR de manière irréversible et durable. La souris KI nous permet de manipuler la transmission nicotinique endogène, cependant, cet avantage est également un

inconvenient. En effet, la mutation cystéine étant encodée au niveau du génome, il n'est pas possible de cibler un type neuronal ou une voie neuronale particuliers. Pour y remédier, le laboratoire développe actuellement de nouveaux AAV encodant la sous-unité mutée des nAChR et dont l'expression sera dépendante ou non de la Cre recombinase.

2. Études des effets de la nicotine sur des structures et voies cérébrales non-canoniques

1. L'IPN et son contrôle de la VTA

Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité de la réponse des neurones de l'IPN à une injection intraveineuse (IV) de nicotine. En effet, de la même manière que dans la VTA, nous retrouvons deux populations de neurones, une population activée par la nicotine et une population inhibée (Eddine et al. 2015; Nguyen et al. 2021). Cette hétérogénéité de réponses à la nicotine observée soulève la question de son origine. En effet, alors que les mécanismes à l'origine de la réponse activée semblent clairs, ceux qui sous-tendent l'inhibition interrogent. Je discuterai donc dans un premier temps de nos hypothèses sur le sujet. Par ailleurs, ayant participé à une étude sur le rôle de la sous-unité $\beta 4$ de l'IPN dans l'addiction à la nicotine (voir **Annexe** Mondoloni et al. 2023), je discuterai ensuite du rôle plus général de l'IPN dans l'addiction à la nicotine.

Nous avons montré qu'une infusion de MPEG₄Ch dans l'IPN diminue l'effet de la nicotine sur les neurones activés sans influencer la population inhibée. Ainsi, il semblerait que l'activation des neurones de l'IPN en réponse à la nicotine se fasse de manière directe par l'intermédiaire des nAChR $\beta 4^*$. En complément de ces expériences, nous avons également réalisé des enregistrements de la réponse des neurones de l'IPN suite à une injection IV de nicotine chez des souris $\beta 2E61C$ en présence ou non de MPEG₄Ch (voir **Figure 9.2**). Dans ce cas, l'activation en réponse à la nicotine ne s'est pas trouvée altérée, tandis que l'inhibition des neurones de l'IPN était diminuée. Si les nAChR $\beta 2^*$ étaient exprimés de manière somatique, l'application de MPEG₄Ch devrait d'une part induire une augmentation de la réponse des neurones inhibés, et d'autre part diminuer la réponse des neurones activés à la nicotine. Nos résultats suggèrent ainsi que l'inhibition en réponse à la nicotine se ferait de manière indirecte. L'hypothèse que nous formulons est que les nAChR $\beta 2^*$ de l'IPN seraient exprimés de manière présynaptique. Dans ce cas, en accord avec ce que nous avons observé, l'application de MPEG₄Ch diminuerait la libération de GABA présynaptique et se traduirait donc par une diminution de la réponse des neurones inhibés suite à une injection

de nicotine. Par ailleurs, des enregistrements en patch-clamp des courants nicotiniques des neurones de l'IPN évoqués par un puff de nicotine après incubation de tranches de cerveau avec du MPEG₄Ch chez des souris β2E61C ont été réalisées. Nos résultats montrent une absence d'effet du MPEG₄Ch sur l'amplitude des courants nicotiniques évoqués (voir **Figure 9.2**), ce qui indique que la densité somato-dendritique des sous-unité β2 dans l'IPN est en moyenne plutôt faible. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'hétérogénéité des réponses des neurones de l'IPN suite à une injection IV de nicotine est liée à une expression différentielle des différents types de nAChR au sein des neurones. En accord avec cette hypothèse, une étude a montré une expression des récepteurs β2* au niveau des terminaisons des neurones de l'IPN dans le LDTg, dont l'activation suite à une injection de nicotine semble modifier la libération de neurotransmetteurs dans le LDTg (Wolfman et al. 2018). La nicotine activerait ainsi les nAChR β4* exprimés de manière somatique au niveau des neurones activés. Cette activation se traduirait par une augmentation de la fréquence de décharge, et activerait les nAChR β2 exprimés au niveau des terminaisons axonales. La libération de GABA serait donc facilitée et aboutirait à l'inhibition d'une seconde sous-population exprimant quant à elle de plus faibles niveaux de nAChR. Une manière de vérifier la validité de cette hypothèse serait d'enregistrer l'évolution de la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSC) évoqués par la nicotine en présence ou non de MPEG₄Ch.

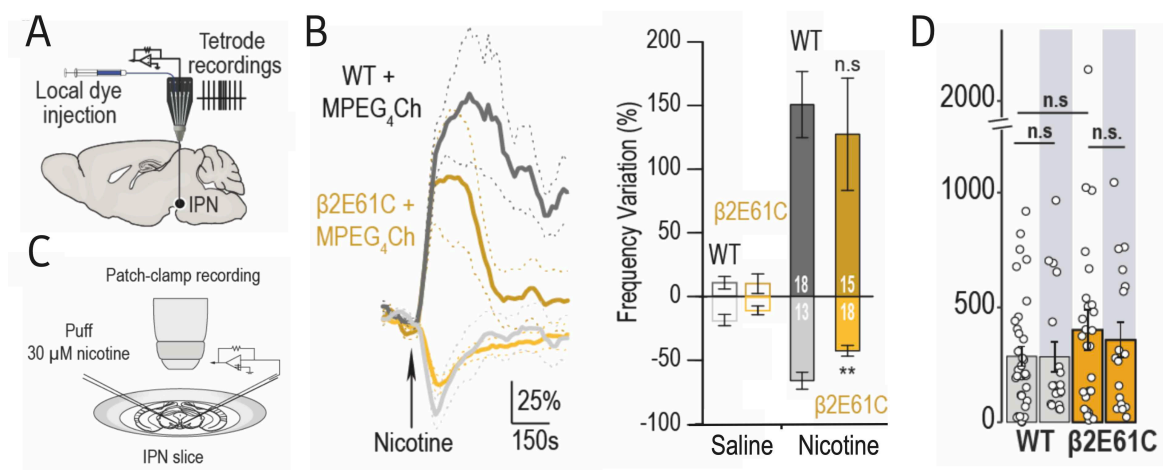


Figure 9.2 : Application de MPEG₄Ch chez la souris KI β2E61C | **A.** Des enregistrements de la fréquence de décharge des neurones de l'IPN ont été réalisés chez l'animal anesthésié en présence ou non de MPEG₄Ch. **B.** Évolution de la fréquence de décharge des neurones de l'IPN suite à une injection IV de nicotine. L'application de MPEG₄Ch induit une diminution de l'amplitude de réponse de la sous-population de neurone inhibée par la nicotine. Wilcoxon tests et corrections de Bonferroni : β2E61C vs WT, neurones activés, $p = 0.12$, neurones inhibés, $**p < 0.01$ **C.** Des tranches de cerveau d'IPN ont été réalisées et incubées avec du MPEG₄Ch (50 μM), afin d'enregistrer les courants nicotiniques évoqués par un puff

de 30 μ M de nicotine *ex vivo*. **D.** L'application de MPEG4Ch ne bloque pas les courants nicotiques dans l'IPN.

J'ai également participé à des travaux concernant le rôle de l'IPN dans l'aversion à de fortes doses de nicotine (voir **Annexe Mondoloni et al. 2023**). Dans un paradigme de choix à deux bouteilles, nous avons pu observer une hétérogénéité au niveau des profils de consommation de nicotine chez des souris isogéniques, certaines évitant la nicotine (souris *avoider*), et d'autres consommant la nicotine (souris *non-avoider*). Chez les souris évitant la nicotine, les seuils déclenchant l'aversion étaient différents entre chaque individu. De plus, une fois le seuil d'aversion atteint, les souris ne consommaient plus de nicotine, et ce même à des doses plus faibles n'élicitant initialement pas d'aversion. De manière intéressante, nous avons observé une corrélation entre la quantité de nicotine ingérée et l'amplitude des courants nicotiques des neurones de l'IPN. En effet, l'amplitude des courants nicotiques chez les souris consommant la nicotine était inférieure à celle des souris évitant la nicotine. Nous avons ensuite étudié l'impact de la délétion de la sous-unité $\beta 4$ sur la consommation de nicotine. Ainsi, les souris $\beta 4^{-/-}$ présentent une augmentation de la consommation de nicotine, notamment lorsque de fortes doses sont présentées, associée à une faible amplitude des courants nicotiques au niveau de l'IPN, et aucune aversion pour la drogue. La réexpression de la sous-unité $\beta 4$ spécifiquement dans l'IPN permet de rétablir l'aversion et un profil de consommation normal. Ces résultats suggèrent ainsi l'importance de la transmission nicotinique de l'IPN dépendante de $\beta 4$ dans la régulation de la consommation de nicotine et plus particulièrement dans les phénomènes d'aversion à de fortes doses de nicotine. Cette seconde étude a également été l'occasion d'étudier l'impact d'une exposition chronique à la nicotine à la fois sur la consommation de nicotine, et sur la transmission nicotinique au niveau de l'IPN. Nous avons pu observer qu'une exposition chronique à la nicotine induit une diminution de l'amplitude des courants nicotiques au niveau de l'IPN, associée à une augmentation de la consommation de nicotine. Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 5**, une exposition chronique à la nicotine s'accompagne d'une désensibilisation des nAChR, induisant une diminution de la transmission nicotinique, compensée par leur *up-régulation* à la membrane de la cellule. Ces modifications de la transmission nicotinique au niveau de l'IPN pourraient alors perturber sa capacité à sonder les concentrations de nicotine, ne lui permettant plus d'exercer un frein sur sa consommation. Ces processus augmenteraient alors la fenêtre de concentration de la nicotine perçue comme récompensante et diminueraient les propriétés aversives de la nicotine, facilitant ensuite la mise en place d'une addiction à la nicotine.

L'ensemble de ces travaux de thèse met en avant une implication plus globale de l'IPN aux différentes étapes de l'addiction à la nicotine, depuis le renforcement pour de faibles doses jusqu'à l'aversion à de fortes doses de nicotine. L'IPN serait ainsi capable de sonder la concentration de nicotine et d'exercer un frein, à toutes les doses, sur sa consommation. Il diminuerait ainsi l'aspect renforçant des faibles doses de nicotine tout en s'opposant à la consommation de fortes doses en induisant de l'aversion. De cette manière, la réponse de l'IPN à la nicotine devrait être fortement corrélée à la consommation de nicotine, une réponse élevée réduisant la fenêtre de concentration de nicotine perçue comme récompensante, tandis qu'une réponse plus faible se traduirait par une consommation plus importante de nicotine. Enfin, bien que la perturbation du fonctionnement de l'IPN par la nicotine fasse l'objet de nombreux travaux, le rôle endogène de cette structure reste toutefois obscur (Molas et al. 2017b, 2024; Tapper and Molas 2020). Il serait ainsi intéressant de mieux comprendre le rôle de l'IPN en dehors d'un contexte d'addiction et d'étudier par exemple l'existence ou non de ce frein de l'activité de la VTA par l'IPN au niveau du fonctionnement cérébral endogène.

2. La voie VTA-CLA

Le CLA est une structure, qui bien que peu étudié jusqu'à présent, a récemment gagné en intérêt et été impliquée dans des fonctions cognitives très variées (attention, saillance, sommeil, conscience, voir **Chapitre 3**). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à son rôle dans l'encodage de la saillance. Aussi, dans cette partie, je discuterai de nos résultats et de leurs limites.

Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 5**, une exposition chronique à la nicotine produit des adaptations à des niveaux moléculaires, cellulaires et comportementaux. Par exemple, les neurones DAergiques de la VTA voient leur activité basale augmenter (Caillé et al. 2009; Dongelmans et al. 2021). Dans une tâche de prise de décision, cela se traduit par une modification des stratégies employées, en favorisant une maximisation des récompenses par l'exploitation des ressources connues, diminuant ainsi l'exploration de l'environnement (Dongelmans et al. 2021). Nos résultats ont permis de mettre en évidence qu'une exposition chronique à la nicotine modifie certaines composantes liées aux interactions sociales. En effet, alors que des souris témoins s'habituent à un stimulus nouveau au cours d'une tâche de nouveauté sociale, une exposition chronique à la nicotine induit une augmentation du temps passé à interagir avec le stimulus social nouveau, et reflète un maintien de l'intérêt pour le stimulus nouveau tout au long de la tâche. Cependant, de manière intéressante, une exposition chronique à la nicotine n'a pas eu d'effet sur le temps passé à interagir avec un

stimulus lors d'une tâche d'habituation sociale, les souris sous nicotine s'habituant tout autant que les souris contrôles. La différence entre nos deux tâches réside dans l'existence d'un choix à réaliser dans la tâche trois-chambre, absent dans la tâche d'habituation sociale. En effet, alors que dans la tâche d'habituation sociale, un seul stimulus social est présenté à la souris expérimentale, dans la tâche trois-chambres la souris a le choix d'interagir avec un stimulus social familier ou nouveau. Ainsi, la nicotine modifierait la prise de décision sociale en maintenant la saillance de la nouveauté sociale dans le temps. Pour étudier les substrats neuronaux sous-tendant ces changements comportementaux, nous nous sommes intéressés aux projections DAergiques au niveau du CLA. En effet plusieurs études ont déjà révélé l'existence de projections DAergiques au niveau du CLA, ainsi que l'expression de récepteurs de la DA (Savasta et al. 1986; Wamsley et al. 1989; Zingg et al. 2018; Terem et al. 2020). De plus, l'activité des neurones exprimant les récepteurs D1 (D1+) du CLA est nécessaire à la mise en place d'un comportement de préférence de place à la cocaïne, et pourrait donc être impliquée dans les processus motivationnels (Terem et al. 2020). Par ailleurs, les interactions sociales sont des comportements complexes (voir **Chapitre 4**) mettant en jeu de nombreux processus cognitifs et des informations sensorielles multiples (Chen and Hong 2018). Le CLA étant une structure exhibant de fortes connexions réciproques avec l'ensemble du cortex, et recevant des afférences de nombreux centres neuromodulateurs, comme la VTA, nous avons pensé qu'il serait un site idéal où nicotine et interactions sociales pourraient interagir (Zingg et al. 2018). Nos premières données ont permis de confirmer cette hypothèse. Nous avons en effet observé qu'une injection IP de nicotine et les interactions sociales produisent toutes deux une augmentation de la libération de DA dans le CLA. En raison des difficultés techniques liées au ciblage du CLA, nous avons réalisé ces mêmes expériences en mesurant les variations de DA au niveau du DLS, une structure anatomiquement proche du CLA, comme contrôle. Nos résultats ont mis en évidence que malgré le fait que la DA augmente dans ces deux structures suite à une injection de nicotine, l'augmentation de DA lors d'interactions sociales est spécifique du CLA.

Dans un second temps, nous avons manipulé l'activité de la voie VTA-CLA à l'aide de stimulations optogénétiques. L'activation optogénétique de la voie VTA-CLA induit une perte de la préférence pour le stimulus social nouveau. Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats, serait qu'en stimulant la voie tout au long de la tâche, nous induisons une libération phasique de DA au niveau de tous les éléments de l'environnement. En effet, alors que cette activité est normalement temporellement alignée sur des éléments de manière précise, notre stimulation optogénétique nivelle la saillance associée à tous les

éléments de l'environnement. En accord avec cette idée, les souris stimulées semblent passer un peu plus de temps à explorer le stimulus familier que les souris témoins. Afin de comprendre si la voie VTA-CLA encode les interactions sociales de manière générale ou seulement la saillance sociale, il aurait été intéressant de stimuler optogénétiquement l'activité de la voie lors d'une tâche d'interaction sociale libre. De la même manière, il aurait également été intéressant de moduler l'activité de cette voie lors d'une tâche de reconnaissance d'objet, dans le but de comprendre si la voie VTA-CLA encode la saillance de manière générale ou la saillance sociale spécifiquement.

Nous avons également réalisé des stimulations optogénétiques de la voie VTA-CLA de façon non-contingente à la tâche, qui semblent mimer les effets comportementaux résultant d'une exposition chronique à la nicotine. En effet, les souris exprimant la channel-rhodopsine (ChR2) passent significativement plus de temps à interagir avec le nouveau stimulus social tout au long de la tâche, et plus particulièrement au cours des 5 dernières minutes. La stimulation optogénétique de la VTA de manière non-contingente à une tâche induit une augmentation de l'activité basale des neurones DA de la VTA (Bariselli et al. 2018). Contrairement à ces expériences, dans notre étude, nous stimulons les terminaisons axonales au niveau du CLA et ne savons donc pas exactement quels sont les effets produits par notre stimulation. Une expérience intéressante, mais non-aisée, serait d'enregistrer l'activité des neurones de la VTA projetant vers le CLA *in vivo*, afin d'observer si notre protocole de stimulation optogénétique non contingente modifie l'activité des neurones.

Afin de vérifier que la stimulation de la voie VTA-CLA n'était pas juste récompensante en soi, nous avons réalisé une préférence de place en temps réel (rtPP). Contrairement aux résultats obtenus dans l'étude de Terem et al., pour qui la rtPP passant par la stimulation des neurones D1+ du CLA produit une préférence pour le compartiment stimulé, nous n'avons pas observé de préférence pour le compartiment pairé à la stimulation optogénétique (Terem et al. 2020). Il est important de noter que malgré l'utilisation du terme rtPP, cette étude réalise en fait une rtCPP avec un conditionnement par la lumière ayant lieu sur plusieurs jours. En effet, dans leur étude, les auteurs réalisent trois jours de conditionnement à la fin desquels ils mesurent le temps passé dans les compartiments pairés ou non à une stimulation optogénétique des neurones D1+ du CLA. Si l'on compare nos résultats à ceux de leur premier jour de conditionnement, nous obtenons des résultats similaires, c'est-à-dire une absence de préférence pour le compartiment pairé à une stimulation optogénétique. De plus, bien que le temps passé dans le compartiment pairé à la stimulation ait augmenté entre le pré-test et le post-test pour Terem et al., le temps passé dans la chambre pairée à la stimulation ne dépasse pas 50 %, ce qui ne traduit pas

vraiment une préférence. Outre ces disparités au niveau des protocoles utilisés, nos différences de résultats pourraient s'expliquer de plusieurs manières. En effet, dans leur étude, Terem et al. stimulent les neurones D1+ du CLA, tandis que nous stimulons au niveau du CLA les afférences en provenance de la VTA. Une possibilité serait alors que notre stimulation produit à la fois une activation des récepteurs D1 et D2. Une seconde possibilité pourrait être que nous ne stimulons pas spécifiquement les afférences DAergiques en provenance de la VTA. Nous ne pouvons effectivement pas exclure qu'il existe des afférences GABAergiques et/ou glutamatergiques, et que notre stimulation induise la libération de plusieurs neurotransmetteurs. Il serait ainsi intéressant de réaliser des études de traçage anatomique afin de déterminer s'il existe des projections autres que DAergiques en provenance de la VTA.

En plus de la modulation DAergique, le CLA reçoit également des afférences cholinergiques en provenance du télencéphale basal (Zingg et al. 2018). L'ACh étant importante dans les processus attentionnels, et l'inactivation du CLA rendant les animaux plus susceptibles aux distracteurs présents dans l'environnement dans une tâche d'attention, certaines études ont supposé que le contrôle cholinergique du CLA pourrait être important dans les processus attentionnels (Schmitz and Duncan 2018; Atlan et al. 2018; Fodouliau et al. 2020). L'ACh agirait comme un gain au niveau du CLA, modulant, selon ses niveaux, l'activité des différentes projections claustrales. Selon Nair et al., des niveaux plus élevés d'ACh favoriseraient l'activation des projections claustrales vers les régions corticales, tandis que des niveaux plus faibles favoriseraient l'activité des projections vers les régions sous-corticales (Wong et al. 2021; Nair et al. 2023). Une exposition chronique à la nicotine pourrait ainsi favoriser l'activité de la voie provenant du CLA et projetant vers les cortex de manière durable, ou alors la défavoriser en raison de la désensibilisation des nAChR exprimés au niveau du CLA. Le CLA exprimant une grande diversité de nAChR, sa transmission nicotinique est probablement perturbée par une exposition chronique à la nicotine. Il serait donc intéressant d'explorer davantage l'implication du CLA dans la dépendance à la nicotine. Pour se faire, nous pourrions moduler spécifiquement la transmission nicotinique au niveau du CLA en injectant du MPEG₄Ch dans le CLA de souris β 2E61C, et regarder les effets sur la consommation de nicotine ou sur un comportement d'auto administration de nicotine. Par ailleurs, les nAChR étant exprimés dans tout le cerveau, il est possible que la nicotine agisse à la fois sur la transmission nicotinique et DAergique du CLA, entraînant une perturbation des niveaux d'attention et de la détection de la saillance. Ces processus se manifesteraient dans notre étude par un biais dans la prise de décision vers l'interaction avec nouveaux stimuli sociaux en raison de la maintenance de sa saillance dans le temps. Ainsi, il pourrait

être intéressant d'exposer des souris de manière chronique à la nicotine, tout en inhibant chroniquement via l'expression de DREADD, la voie VTA-CLA. Ces expériences nous permettraient d'observer si nous prévenons l'apparition des effets de la nicotine, et si la voie VTA-CLA pourrait être une cible potentielle de traitement dans le cadre de l'addiction.

3. Intégration de ces différents circuits et fonctionnement endogène

Dans ce manuscrit, j'ai pu vous présenter mes différents travaux de thèse : l'un portant sur l'encodage de la saillance sociale dans une condition de choix par la voie VTA-CLA, et sa perturbation suite à une exposition chronique à la nicotine, et l'autre sur l'existence d'un contrôle de l'activité de la VTA par l'IPN dans le cadre d'un renforcement à la nicotine. Outre ces travaux centrés sur la perturbation des circuits par la nicotine, j'ai également pu vous présenter des travaux dont l'objectif est de se recentrer sur le rôle endogène de la transmission nicotinique au niveau de la VTA. Néanmoins, un sujet ayant été peu abordé dans ces travaux correspond au rôle endogène de l'IPN, et à son potentiel contrôle de la VTA en dehors du cadre de la nicotine. L'IPN a notamment été impliqué dans l'encodage de la familiarité sociale (Molas et al. 2017b), et une très récente étude a permis d'approfondir le rôle des terminaisons de l'IPN au niveau du LDTg dans cet encodage (Molas et al. 2024). Les auteurs ont tout d'abord enregistré en photométrie fibrée l'activité des neurones DAergiques de la VTA ainsi que la libération de DA consécutive dans le NAc en réponse à un stimulus social nouveau ou familier. Ils ont pu observer une augmentation de ces deux activités en réponse à un stimulus social nouveau, qui était par ailleurs considérablement réduite pendant les interactions avec le stimulus familier. Après avoir confirmé l'activation de la VTA par la saillance sociale comme cela avait déjà été montré précédemment (Gunaydin et al. 2014; Solié et al. 2022), les auteurs se sont intéressés aux réponses de l'IPN dans cette même tâche. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une diminution de l'activité des neurones GABAergiques de l'IPN projetant vers le LDTg en réponse à la nouveauté sociale, et une activation de ces terminaisons en réponse à un stimulus social familier. De plus, des manipulations optogénétiques de la voie IPN-LDTg ont permis de moduler les temps d'interaction avec les différents stimuli sociaux. En effet, alors que l'activation de la voie réduit l'interaction avec les nouveaux stimuli et diminue la libération de DA dans le NAc, son inhibition augmente les temps d'interactions avec les stimuli familiers. L'ensemble de ces résultats confirme l'encodage de la saillance par les neurones DAergiques de la VTA, et met en lumière la régulation dynamique de ce circuit par les terminaisons GABAergiques de l'IPN au niveau du LDTg qui signalent la familiarité. Ces travaux apportent des informations

concernant le rôle endogène de l'IPN, qui restait jusqu'alors flou car majoritairement étudié dans le cadre de l'addiction à la nicotine (Fowler et al. 2011; Fowler and Kenny 2014; Wolfman et al. 2018; Mondoloni et al. 2023), ainsi que des informations sur son action modulatrice de la VTA. Ces travaux, associés aux nôtres, mettent en évidence l'implication de la voie VTA-CLA dans l'encodage de la saillance sociale en situation de choix, et l'encodage de la familiarité via la modulation indirecte de l'activité de la VTA par l'IPN. Afin d'étudier si la saillance sociale en condition de choix (encodée par la voie VTA-CLA) est modulée par l'IPN, il pourrait être intéressant de mesurer l'évolution de la libération de DA dans le CLA suite à la manipulation des projections GABAergiques de l'IPN dans le LDTg au cours d'une tâche de nouveauté sociale. L'ensemble des acteurs de ces différents circuits exprimant des nAChR, leur activité est probablement perturbée lors d'une exposition prolongée à la nicotine. Comme nous avons pu le montrer, la nicotine semble augmenter la saillance des stimuli sociaux nouveaux en condition de choix par le biais de la voie VTA-CLA. Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier le rôle de la transmission nicotinique de ces différentes structures spécifiquement dans la tâche de nouveauté sociale, à l'aide des multiples outils chémogénétiques développés par le laboratoire. De la même manière, il serait intéressant de bloquer spécifiquement la transmission nicotinique de l'IPN chez des souris $\beta 4E61C$ exposées chroniquement à la nicotine avec du MPEG₄Ch dans la tâche de nouveauté sociale, afin d'étudier l'implication de cette voie dans les effets observés sur les interactions sociales. Comme nous l'avons vu précédemment, les neurones de l'IPN qui projettent vers le LDTg ne semblent exprimer des nAChR qu'au niveau des terminaisons axonales. Aussi, il pourrait être intéressant de bloquer spécifiquement ces nAChR présynaptiques avec le MPEG₄Ch en exprimant la mutation cystéine uniquement sur les terminaisons de l'IPN au niveau du LDTg. Par ailleurs, si nos prochaines expériences nous permettent d'identifier le Raphé comme étant la structure intermédiaire permettant le contrôle de la VTA par l'IPN dans le renforcement à la nicotine, il pourra être intéressant d'étudier le rôle endogène du circuit IPN-DRN-VTA dans un contexte hors addiction à la nicotine. L'ensemble de ces travaux confirme le rôle central de la VTA dans l'encodage de la saillance et identifie de nouvelles structures telles que l'IPN et le LDTg comme des agents qui modulent son activité et la saillance résultante. Cette information encodée par la VTA constitue un aspect essentiel de la prise de décision sociale, et pourrait être ensuite transmise et traitée par des structures plus télencéphalique comme le CLA et ses vastes connexions réciproques avec les différents cortex.

Bibliographie

Ables JL, Görlich A, Antolin-Fontes B, et al (2017) Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular $\alpha 5$ nicotinic neurons regulates nicotine preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13012–13017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717506114>

Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, et al (2010) The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci* 13:1354–1356. <https://doi.org/10.1038/nn.2654>

Agnati LF, Zoli M, Strömberg I, Fuxe K (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69:711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)

Albuquerque EX, Pereira EF, Mike A, et al (2000) Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. *Behav Brain Res* 113:131–141. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00208-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00208-4)

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 89:73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>

Allison DW, Ohran AJ, Stobbs SH, et al (2006) Connexin-36 gap junctions mediate electrical coupling between ventral tegmental area GABA neurons. *Synap N Y N* 60:20–31. <https://doi.org/10.1002/syn.20272>

Aloise-Young PA, Kaepfner CJ (2005) Sociometric Status as a Predictor of Onset and Progression in Adolescent Cigarette Smoking. *Nicotine Tob Res* 7:199–206. <https://doi.org/10.1080/14622200500055277>

Amarante LM, Laubach M (2021) Coherent theta activity in the medial and orbital frontal cortices encodes reward value. *eLife* 10:e63372. <https://doi.org/10.7554/eLife.63372>

American Psychiatric Association, American Psychiatric Association (eds) (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5th ed. American Psychiatric Association, Washington, D.C

Anderson DJ (2016) Circuit modules linking internal states and social behaviour in flies and mice. *Nat Rev Neurosci* 17:692–704. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.125>

Anselme P (2009) The effect of exposure to drugs on the processing of natural rewards. *Neurosci Biobehav Rev* 33:314–335. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.10.002>

- Antolin-Fontes B, Ables JL, Görlich A, Ibañez-Tallon I (2015) The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology* 96:213–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.019>
- Aransay A, Rodríguez-López C, García-Amado M, et al (2015) Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front Neuroanat* 9:59. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00059>
- Arias HR (1997) Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Rev* 25:133–191. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00020-9)
- Ashton H, Marsh VR, Millman JE, et al (1980) Biphasic dose-related responses of the CNV (contingent negative variation) to i.v. nicotine in man. *Br J Clin Pharmacol* 10:579–589
- Atlan G, Terem A, Peretz-Rivlin N, et al (2018) The Claustrum Supports Resilience to Distraction. *Curr Biol* 28:2752–2762.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.068>
- Auerbach A (2012) Thinking in cycles: MWC is a good model for acetylcholine receptor-channels. *J Physiol* 590:93–98. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214684>
- Ayano G (2016) Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat* 2:. <https://doi.org/10.4172/2471-271X.1000120>
- Azam (2002) Expression of alpha5 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and cortical development - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15558717/>. Accessed 23 Feb 2024
- Baddick CG, Marks MJ (2011) An autoradiographic survey of mouse brain nicotinic acetylcholine receptors defined by null mutants. *Biochem Pharmacol* 82:828–841. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.04.019>
- Baeyer A (1866) Ueber die Reduction aromatischer Verbindungen mittelst Zinkstaub. *Justus Liebigs Ann Chem* 140:295–296. <https://doi.org/10.1002/jlac.18661400306>
- Bariselli S, Hörnberg H, Prévost-Solié C, et al (2018) Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nat Commun* 9:3173. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05382-3>
- Barnes GM, Farrell MP (1992) Parental Support and Control as Predictors of Adolescent Drinking, Delinquency, and Related Problem Behaviors. *J Marriage Fam* 54:763–776. <https://doi.org/10.2307/353159>
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>

- Beier K (2022) Modified viral-genetic mapping reveals local and global connectivity relationships of ventral tegmental area dopamine cells. *eLife* 11:e76886. <https://doi.org/10.7554/eLife.76886>
- Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, et al (2015) Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 162:622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Beiranvand F, Zlabinger C, Orr-Urtreger A, et al (2014) Nicotinic acetylcholine receptors control acetylcholine and noradrenaline release in the rodent habenulo-interpeduncular complex. *Br J Pharmacol* 171:5209–5224. <https://doi.org/10.1111/bph.12841>
- Benarroch EE (2013) Pedunculopontine nucleus. *Neurology* 80:1148–1155. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182886a76>
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. *Endocr Rev* 22:724–763. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0451>
- Benowitz NL (2010) Nicotine Addiction. *N Engl J Med* 362:2295–2303. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0809890>
- Benwell (1988) Evidence that Tobacco Smoking Increases the Density of (–)-[3H]Nicotine Binding Sites in Human Brain - Benwell - 1988 - *Journal of Neurochemistry* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1988.tb10600.x>. Accessed 27 Feb 2024
- Berlin S, Szobota S, Reiner A, et al (2016) A family of photoswitchable NMDA receptors. *eLife* 5:e12040. <https://doi.org/10.7554/eLife.12040>
- Berridge KC (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81:179–209. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.004>
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26:507–513. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00233-9)
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: ‘liking’, ‘wanting’, and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.014>
- Berthoud H-R (2011) Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21:888–896. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.004>
- Berthoud H-R (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26:393–428. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00014-3)

Beutler LR, Wanat MJ, Quintana A, et al (2011) Balanced NMDA receptor activity in dopamine D1 receptor (D1R)- and D2R-expressing medium spiny neurons is required for amphetamine sensitization. *Proc Natl Acad Sci* 108:4206–4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101424108>

Beyeler A, Namburi P, Glober GF, et al (2016) Divergent routing of positive and negative information from the amygdala during memory retrieval. *Neuron* 90:348–361. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.004>

Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, et al (2008) Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 165:1163–1171. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111711>

Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>

Björklund A, Lindvall O, Nobin A (1975) Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Res* 89:29–42. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90131-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90131-6)

Blaiss CA, Janak PH (2009) The Nucleus Accumbens Core and Shell are Critical for the Expression, but not the Consolidation, of Pavlovian Conditioned Approach. *Behav Brain Res* 200:22–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.024>

Borroto-Escuela DO, Fuxe K (2020) On the G Protein-Coupled Receptor Neuromodulation of the Claustrum. *Neurochem Res* 45:5–15. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02822-4>

Bouarab C, Thompson B, Polter AM (2019) VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Front Neural Circuits* 13:

Bousseynol E, Didienne S, Takillah S, et al (2023) Dopaminergic and prefrontal dynamics co-determine mouse decisions in a spatial gambling task. *Cell Rep* 42:112523. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112523>

Brody AL, Mandelkern MA, London ED, et al (2006) Cigarette Smoking Saturates Brain $\alpha 4 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Arch Gen Psychiatry* 63:907–915. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.8.907>

Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010) Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* 68:815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>

Brown GM, Krigstein E, Dankova J, Hornykiewicz O (2008) Relationship Between Hypothalamic and Median Eminence Catecholamines and Thyroid Function. *Neuroendocrinology* 10:207–217. <https://doi.org/10.1159/000122090>

- Bueno D, Lima LB, Souza R, et al (2019) Connections of the laterodorsal tegmental nucleus with the habenular-interpeduncular-raphé system. *J Comp Neurol* 527:3046–3072. <https://doi.org/10.1002/cne.24729>
- Buzsáki G, Bickford RG, Ponomareff G, et al (1988) Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 8:4007–4026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-04007.1988>
- Buzsáki G, Logothetis N, Singer W (2013) Scaling Brain Size, Keeping Timing: Evolutionary Preservation of Brain Rhythms. *Neuron* 80:751–764. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.002>
- Cabanac M (1971) Physiological Role of Pleasure. *Science* 173:1103–1107. <https://doi.org/10.1126/science.173.4002.1103>
- Cachope R, Mateo Y, Mathur BN, et al (2012) Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing. *Cell Rep* 2:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.011>
- Caggiula AR, Donny EC, Chaudhri N, et al (2002a) Importance of nonpharmacological factors in nicotine self-administration. *Physiol Behav* 77:683–687. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00918-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00918-6)
- Caggiula AR, Donny EC, White AR, et al (2002b) Environmental stimuli promote the acquisition of nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 163:230–237. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1156-5>
- Caillé S, Guillem K, Cador M, et al (2009) Voluntary Nicotine Consumption Triggers In Vivo Potentiation of Cortical Excitatory Drives to Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 29:10410–10415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2950-09.2009>
- Calabresi P, Lacey MG, North RA (1989) Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. *Br J Pharmacol* 98:135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb16873.x>
- Camps M, Kelly PH, Palacios JM (1990) Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect* 80:105–127. <https://doi.org/10.1007/BF01257077>
- Capogna M (2014) GABAergic cell type diversity in the basolateral amygdala. *Curr Opin Neurobiol* 26:110–116. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.01.006>

Carpenter CM, Wayne GF, Connolly GN (2007) The role of sensory perception in the development and targeting of tobacco products. *Addict Abingdon Engl* 102:136–147. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01649.x>

Castro DC, Berridge KC (2014) Advances in the neurobiological bases for food ‘liking’ versus ‘wanting.’ *Physiol Behav* 136:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.022>

Chang AJ, Wang L, Lucantonio F, et al (2021) Neuron-type specificity of dorsal raphe projections to ventral tegmental area

Changeux J-P (2010a) Allosteric Receptors: From Electric Organ to Cognition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:1–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105741>

Changeux J-P (2018) The nicotinic acetylcholine receptor: a typical ‘allosteric machine.’ *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 373:20170174. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0174>

Changeux J-P (2010b) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 11:389–401. <https://doi.org/10.1038/nrn2849>

Chen H, Sharp BM, Matta SG, Wu Q (2011) Social interaction promotes nicotine self-administration with olfactogustatory cues in adolescent rats. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 36:2629–2638. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.149>

Chen P, Hong W (2018) Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron* 98:16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>

Clemens S, Rye D, Hochman S (2006) Restless legs syndrome. *Neurology* 67:125–130. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223316.53428.c9>

Coddington LT, Dudman JT (2018) The timing of action determines reward prediction signals in identified midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci* 21:1563–1573. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0245-7>

Coddington LT, Lindo SE, Dudman JT (2023) Mesolimbic dopamine adapts the rate of learning from action. *Nature* 614:294–302. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05614-z>

Cohen JD, McClure SM, Yu AJ (2007) Should I stay or should I go? How the human brain manages the trade-off between exploitation and exploration. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:933–942. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2098>

Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C (2013) Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochem Pharmacol* 86:1063–1073. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.023>

- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271-284. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90072-8)
- Corrigall WA, Coen KM (1989) Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology (Berl)* 99:473-478. <https://doi.org/10.1007/BF00589894>
- Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL (1994) Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res* 653:278-284. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90401-4)
- Corringer P-J, Sallette J, Changeux J-P (2006) Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: A novel mechanism of neural plasticity? *J Physiol-Paris* 99:162-171. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2005.12.012>
- Covington HE, Kikusui T, Goodhue J, et al (2005) Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 30:310-321. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300587>
- Crick FC, Koch C (2005) What is the function of the claustrum? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 360:1271-1279. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1661>
- Crow TJ (1972) A map of the rat mesencephalon for electrical self-stimulation. *Brain Res* 36:265-273. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90734-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90734-2)
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317-324. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.04.006>
- Dale HH, Feldberg W, Vogt M (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* 86:353-380
- Dani JA (2003) Roles of dopamine signaling in nicotine addiction. *Mol Psychiatry* 8:255-256. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001284>
- Dani JA (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166-174. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01011-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01011-8)
- Dani JA, Bertrand D (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>

Dani JA, Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16:905–908. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80112-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80112-9)

Dautan D, Souza AS, Huerta-Ocampo I, et al (2016) Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nat Neurosci* 19:1025–1033. <https://doi.org/10.1038/nn.4335>

Dawson G, Carver L, Meltzoff AN, et al (2002) Neural correlates of face and object recognition in young children with autism spectrum disorder, developmental delay, and typical development. *Child Dev* 73:700–717. <https://doi.org/10.1111/1467-8624.00433>

Dawson TM, Gehlert DR, McCabe RT, et al (1986) D-1 dopamine receptors in the rat brain: a quantitative autoradiographic analysis. *J Neurosci* 6:2352–2365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-08-02352.1986>

Day JJ, Roitman MF, Wightman RM, Carelli RM (2007) Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 10:1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>

Dayan P (2012) Twenty-Five Lessons from Computational Neuromodulation. *Neuron* 76:240–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.027>

De Biasi M, Dani JA (2011) Reward, Addiction, Withdrawal to Nicotine. *Annu Rev Neurosci* 34:105–130. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113734>

De Bundel D, Zussy C, Espallergues J, et al (2016) Dopamine D2 receptors gate generalization of conditioned threat responses through mTORC1 signaling in the extended amygdala. *Mol Psychiatry* 21:1545–1553. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.210>

de Jong JW, Fraser KM, Lammel S (2022) Mesoaccumbal Dopamine Heterogeneity: What Do Dopamine Firing and Release Have to Do with It? *Annu Rev Neurosci* 45:109–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-110920-011929>

de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, et al (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol* 90:198–216. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.010>

de Wit H, Phillips TJ (2012) Do initial responses to drugs predict future use or abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 36:1565–1576. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.04.005>

DeFalco J, Tomishima M, Liu H, et al (2001) Virus-Assisted Mapping of Neural Inputs to a Feeding Center in the Hypothalamus. *Science* 291:2608–2613. <https://doi.org/10.1126/science.1056602>

DeGroot SR, Zhao-Shea R, Chung L, et al (2020) Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *Biol Psychiatry* S0006322320317078. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.018>

Demarest KT, McKay DW, Riegler GD, Moore KE (2008a) Biochemical Indices of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neuronal Activity during Lactation: A Lack of Response to Prolactin. *Neuroendocrinology* 36:130–137. <https://doi.org/10.1159/000123449>

Demarest KT, Riegler GD, Moore KE (2008b) Prolactin-Induced Activation of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons: Evidence for Both a Rapid ‘Tonic’ and a Delayed ‘Induction’ Component. *Neuroendocrinology* 38:467–475. <https://doi.org/10.1159/000123935>

Descarries L, Bérubé-Carrière N, Riad M, et al (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* 58:290–302. <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. *Prog Brain Res* 125:27–47. [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. *Proc Natl Acad Sci* 85:5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>

Dobi A, Margolis EB, Wang H-L, et al (2010) Glutamatergic and Nonglutamatergic Neurons of the Ventral Tegmental Area Establish Local Synaptic Contacts with Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons. *J Neurosci* 30:218–229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>

Dölen G, Darvishzadeh A, Huang KW, Malenka RC (2013) Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* 501:179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12518>

Dong M, Babalhavaeji A, Samanta S, et al (2015) Red-Shifting Azobenzene Photoswitches for in Vivo Use. *Acc Chem Res* 48:2662–2670. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00270>

Dongelmans M, Durand-de Cuttoli R, Nguyen C, et al (2021) Chronic nicotine increases midbrain dopamine neuron activity and biases individual strategies towards reduced exploration in mice. *Nat Commun* 12:6945. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27268-7>

Donovick PJ, Burrig RG, Zuromski E (1970) Localization of quinine aversion within the septum, habenula, and interpeduncular nucleus of the rat. *J Comp Physiol Psychol* 71:376–383. <https://doi.org/10.1037/h0029114>

Donthamsetti PC, Winter N, Schönberger M, et al (2017) Optical Control of Dopamine Receptors Using a Photoswitchable Tethered Inverse Agonist. *J Am Chem Soc* 139:18522–18535. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07659>

Drenan RM, Nashmi R, Imoukhuede P, et al (2008) Subcellular Trafficking, Pentameric Assembly, and Subunit Stoichiometry of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Containing Fluorescently Labeled $\alpha 6$ and $\beta 3$ Subunits. *Mol Pharmacol* 73:27–41. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039180>

Durand-de Cuttoli R, Mondoloni S, Marti F, et al (2018) Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. *eLife* 7:. <https://doi.org/10.7554/eLife.37487>

Eddine R, Valverde S, Tolu S, et al (2015) A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. *Sci Rep* 5:8184. <https://doi.org/10.1038/srep08184>

Ellwood IT, Patel T, Wadia V, et al (2017) Tonic or Phasic Stimulation of Dopaminergic Projections to Prefrontal Cortex Causes Mice to Maintain or Deviate from Previously Learned Behavioral Strategies. *J Neurosci* 37:8315–8329. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1221-17.2017>

Ernst M, Paulus MP (2005) Neurobiology of decision making: a selective review from a neurocognitive and clinical perspective. *Biol Psychiatry* 58:597–604. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.004>

Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL (2012) The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* 76:1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>

Everitt BJ, Morris KA, O'Brien A, Robbins TW (1991) The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience* 42:1–18. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90145-e](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90145-e)

Everitt, Robbins (1997) Central cholinergic systems and cognition - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/9046571/>. Accessed 7 Feb 2024

Exley R, Maubourguet N, David V, et al (2011) Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 4$ and subunit $\alpha 6$ to the reinforcing effects of nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7577–7582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103000108>

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 CP, Rains MF, Noerager B, et al (1997) Influence of Subunit Composition on Desensitization of Neuronal Acetylcholine Receptors at Low Concentrations of Nicotine. *J Neurosci* 17:5747–5759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05747.1997>

Fernando ABP, Murray JE, Milton AL (2013) The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. *Front Behav Neurosci* 7:190. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00190>

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, et al (2007) New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:681–698. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105140>

Floresco SB (2015) The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. *Annu Rev Psychol* 66:25–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115159>

Floresco SB (2013) Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an “inverted-U” toward a family of functions. *Front Neurosci* 7:62. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00062>

Floresco SB, West AR, Ash B, et al (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968–973. <https://doi.org/10.1038/nn1103>

Fodoulian L, Gschwend O, Huber C, et al (2020) The claustrum-medial prefrontal cortex network controls attentional set-shifting. 2020.10.14.339259

Ford CP (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>

Forget B, Scholze P, Langa F, et al (2018) A Human Polymorphism in CHRNA5 Is Linked to Relapse to Nicotine Seeking in Transgenic Rats. *Curr Biol* 28:3244–3253.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.044>

Fornasiero EF, Mandad S, Wildhagen H, et al (2018) Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. *Nat Commun* 9:4230. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06519-0>

Fowler CD, Kenny PJ (2014) Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology* 76 Pt B:533–544. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.008>

Fowler CD, Lu Q, Johnson PM, et al (2011) Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471:597–601. <https://doi.org/10.1038/nature09797>

Frahm S, Antolin-Fontes B, Görlich A, et al (2015a) An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. In: eLife. <https://elifesciences.org/articles/11396/figures>. Accessed 9 Feb 2024

Frahm S, Antolin-Fontes B, Görlich A, et al (2015b) An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. eLife 4:e11396. <https://doi.org/10.7554/eLife.11396>

Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.013>

Gabor AJ, Peele TL (1964) ALTERATIONS OF BEHAVIOR FOLLOWING STIMULATION OF THE CLAUSTRUM OF THE CAT. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 17:513–519. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(64\)90181-6](https://doi.org/10.1016/0013-4694(64)90181-6)

Galloway MP (1988) Neurochemical interactions of cocaine with dopaminergic systems. Trends Pharmacol Sci 9:451–454. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(88\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(88)90137-X)

Gao M, Jin Y, Yang K, et al (2010) Mechanisms Involved in Systemic Nicotine-Induced Glutamatergic Synaptic Plasticity on Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area. J Neurosci 30:13814–13825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1943-10.2010>

Garcia-Rivas V, Deroche-Gamonet V (2019) Not all smokers appear to seek nicotine for the same reasons: implications for preclinical research in nicotine dependence. Addict Biol 24:317–334. <https://doi.org/10.1111/adb.12607>

Gentry CL, Wilkins LH, Lukas RJ (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. J Pharmacol Exp Ther 304:206–216. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041756>

Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. Annu Rev Neurosci 34:441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>

Giorla E, Nordmann S, Pelloux Y, et al (2018) Peer presence and familiarity as key factors to reduce cocaine intake: evidence from translational research. 286518

Glimcher PW (2009) Chapter 32 - Choice: Towards a Standard Back-pocket Model. In: Glimcher PW, Camerer CF, Fehr E, Poldrack RA (eds) Neuroeconomics. Academic Press, London, pp 503–521

Goll Y, Atlan G, Citri A (2015) Attention: the claustrum. Trends Neurosci 38:486–495. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.05.006>

- Gong S, Zheng C, Doughty ML, et al (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917–925. <https://doi.org/10.1038/nature02033>
- Görlich A, Antolin-Fontes B, Ables JL, et al (2013) Reexposure to nicotine during withdrawal increases the pacemaking activity of cholinergic habenular neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17077–17082. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313103110>
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, et al (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78:703–711. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.024>
- Grabus SD, Martin BR, Brown SE, Damaj MI (2006) Nicotine place preference in the mouse: influences of prior handling, dose and strain and attenuation by nicotinic receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 184:456–463. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0305-7>
- Grace A, Bunney B (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866–2876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02866.1984>
- Grace A, Bunney B (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4:2877–2890. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02877.1984>
- Grace AA, Bunney BS (1980) Nigral Dopamine Neurons: Intracellular Recording and Identification with L-Dopa Injection and Histofluorescence. *Science* 210:654–656. <https://doi.org/10.1126/science.7433992>
- Grady SR, Moretti M, Zoli M, et al (2009) Rodent Habenulo–Interpeduncular Pathway Expresses a Large Variety of Uncommon nAChR Subtypes, But Only the $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 3\beta 3\beta 4$ Subtypes Mediate Acetylcholine Release. *J Neurosci* 29:2272–2282. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5121-08.2009>
- Graf M, Nair A, Wong KLL, et al (2020) Identification of Mouse Claustral Neuron Types Based on Their Intrinsic Electrical Properties. *eneuro* 7:ENEURO.0216–20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0216-20.2020>
- Granon S, Faure P, Changeux J-P (2003) Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci* 100:9596–9601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533498100>
- Grasing K (2016) A threshold model for opposing actions of acetylcholine on reward behavior: Molecular mechanisms and implications for treatment of substance abuse disorders. *Behav Brain Res* 312:148–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.022>

Graybiel AM (1997) The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophr Bull* 23:459–469. <https://doi.org/10.1093/schbul/23.3.459>

Grieder TE, Sellings LH, Vargas-Perez H, et al (2010) Dopaminergic Signaling Mediates the Motivational Response Underlying the Opponent Process to Chronic but Not Acute Nicotine. *Neuropsychopharmacology* 35:943–954. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.198>

Groenewegen HJ, Ahlenius S, Haber SN, et al (1986) Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 249:65–102. <https://doi.org/10.1002/cne.902490107>

Grottick AJ, Higgins GA (2000) Effect of subtype selective nicotinic compounds on attention as assessed by the five-choice serial reaction time task. *Behav Brain Res* 117:197–208. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00305-3)

Grundey J, Barlay J, Batsikadze G, et al (2018) Nicotine modulates human brain plasticity via calcium-dependent mechanisms. *J Physiol* 596:5429–5441. <https://doi.org/10.1113/JP276502>

Gudelsky GA (1981) Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. *Psychoneuroendocrinology* 6:3–16. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(81\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0306-4530(81)90044-5)

Gudelsky GA, Porter JC (1980) Release of Dopamine from Tuberoinfundibular Neurons into Pituitary Stalk Blood after Prolactin or Haloperidol Administration*. *Endocrinology* 106:526–529. <https://doi.org/10.1210/endo-106-2-526>

Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, et al (2014) Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell* 157:1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>

Häfner H, Nowotny B, Löffler W, et al (1995) When and how does schizophrenia produce social deficits? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 246:17–28. <https://doi.org/10.1007/BF02191811>

Han Z-Y, Zoli M, Cardona A, et al (2003) Localization of [3H]nicotine, [3H]cytisine, [3H]epibatidine, and [125I]alpha-bungarotoxin binding sites in the brain of *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol* 461:49–60. <https://doi.org/10.1002/cne.10659>

Haney M, Maccari S, Le Moal M, et al (1995) Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Res* 698:46–52. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00788-R](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00788-R)

Harada M, Pascoli V, Hiver A, et al (2021) Corticostriatal Activity Driving Compulsive Reward Seeking. *Biol Psychiatry* 90:808–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.08.018>

Harrington L, Viñals X, Herrera-Solís A, et al (2016) Role of β_4^* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. *Neuropsychopharmacology* 41:1790–1802. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.346>

Hart AS, Rutledge RB, Glimcher PW, Phillips PEM (2014) Phasic Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens Symmetrically Encodes a Reward Prediction Error Term. *J Neurosci* 34:698–704. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2489-13.2014>

Harvey DM, Yasar S, Heishman SJ, et al (2004) Nicotine serves as an effective reinforcer of intravenous drug-taking behavior in human cigarette smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 175:134–142. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1818-6>

Hay YA, Lambolez B, Tricoire L (2016) Nicotinic Transmission onto Layer 6 Cortical Neurons Relies on Synaptic Activation of Non- α_7 Receptors. *Cereb Cortex* 26:2549–2562. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv085>

Heilbronner SR, Hayden BY, Platt ML (2010) Neuroeconomics of risk-sensitive decision making. In: *Impulsivity: The behavioral and neurological science of discounting*. American Psychological Association, Washington, DC, US, pp 159–187

Hemmendinger LM, Moore RY (1984) Interpeduncular nucleus organization in the rat: Cytoarchitecture and histochemical analysis. *Brain Res Bull* 13:163–179. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90018-2)

Henderson BJ, Lester HA (2015) Inside-out neuropharmacology of nicotinic drugs. *Neuropharmacology* 96:178–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.022>

Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR (1983) Cigarette smokers self-administer intravenous nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 19:887–890. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90099-0)

Higgs S (2016) Cognitive processing of food rewards. *Appetite* 104:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.003>

Hikosaka O, Kim HF, Amita H, et al (2019) Direct and indirect pathways for choosing objects and actions. *Eur J Neurosci* 49:637–645. <https://doi.org/10.1111/ejn.13876>

Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H (2002) Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol* 12:217–222. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00307-0](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00307-0)

Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH (2012) Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons: Electrophysiological Properties and Projections. *J Neurosci* 32:15076–15085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3128-12.2012>

- Holstege J c., Dijken HV, Buijs R m., et al (1996) Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat, and monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 376:631–652. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961223\)376:4<631::AID-CNE10>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<631::AID-CNE10>3.0.CO;2-P)
- Hong W, Kim D-W, Anderson DJ (2014) Antagonistic Control of Social versus Repetitive Self-Grooming Behaviors by Separable Amygdala Neuronal Subsets. *Cell* 158:1348–1361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.049>
- Horan WP, Blanchard JJ (2003) Neurocognitive, social, and emotional dysfunction in deficit syndrome schizophrenia - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920996402004103>. Accessed 18 Mar 2024
- Hsu Y-WA, Tempest L, Quina LA, et al (2013) Medial Habenula Output Circuit Mediated by $\alpha 5$ Nicotinic Receptor-Expressing GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus. *J Neurosci* 33:18022–18035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2927-13.2013>
- Hughes JR (1992) Tobacco withdrawal in self-quitters. *J Consult Clin Psychol* 60:689–697. <https://doi.org/10.1037//0022-006x.60.5.689>
- Hughes JR, Hatsukami DK, Pickens RW, et al (1984) Effect of nicotine on the tobacco withdrawal syndrome. *Psychopharmacology (Berl)* 83:82–87. <https://doi.org/10.1007/BF00427428>
- Husson M, Harrington L, Tochon L, et al (2020) $\beta 4$ -Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 40:3465–3477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0356-19.2020>
- Imbimbo BP (2001) Pharmacodynamic-Tolerability Relationships of Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer’s Disease. *CNS Drugs* 15:375–390. <https://doi.org/10.2165/00023210-200115050-00004>
- Isaac PF, Rand MJ (1972) Cigarette Smoking and Plasma Levels of Nicotine. *Nature* 236:308–310. <https://doi.org/10.1038/236308a0>
- Jackson J, Smith JB, Lee AK (2020) The Anatomy and Physiology of Claustrum-Cortex Interactions. *Annu Rev Neurosci* 43:231–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-092519-101637>
- Jackson KJ, Marks MJ, Vann RE, et al (2010) Role of $\alpha 5$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in Pharmacological and Behavioral Effects of Nicotine in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 334:137–146. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.165738>

Jenkinson N, Nandi D, Muthusamy K, et al (2009) Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Mov Disord* 24:319–328. <https://doi.org/10.1002/mds.22189>

Ji D, Lape R, Dani JA (2001) Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 31:131–141. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00332-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00332-4)

Jing M, Li Y, Zeng J, et al (2020) An optimized acetylcholine sensor for monitoring in vivo cholinergic activity. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0953-2>

Jing M, Zhang P, Wang G, et al (2018) A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for in vitro and in vivo studies. *Nat Biotechnol* 36:726–737. <https://doi.org/10.1038/nbt.4184>

Jones IW, Wonnacott S (2004) Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:11244–11252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004>

Kable JW, Glimcher PW (2009) The Neurobiology of Decision: Consensus and Controversy. *Neuron* 63:733–745. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.003>

Karpen JW, Ruiz M (2002) Ion channels: does each subunit do something on its own? *Trends Biochem Sci* 27:402–409. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02124-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02124-2)

Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 192:407–436

Katz B, Thesleff S (1957) A study of the ‘desensitization’ produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138:63–80

Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844–858. <https://doi.org/10.1038/nrn2234>

Keiflin R, Janak PH (2015) Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron* 88:247–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.037>

Kelley AE, Berridge KC (2002) The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *J Neurosci* 22:3306–3311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03306.2002>

Kelly RB (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72:43–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80027-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80027-3)

Kenny PJ, Markou A (2001) Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 70:531–549. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00651-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00651-7)

Kepecs A, Fishell G (2014) Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505:318–326. <https://doi.org/10.1038/nature12983>

Keramati M, Gutkin B (2014) Homeostatic reinforcement learning for integrating reward collection and physiological stability. *Elife* 3:e04811

Kim J, Matney CJ, Roth RH, Brown SP (2016) Synaptic Organization of the Neuronal Circuits of the Claustrum. *J Neurosci* 36:773–784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3643-15.2016>

Kim Y, Venkataraju KU, Pradhan K, et al (2015) Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Rep* 10:292–305. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.014>

Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, et al (2019) Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 39:31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>

Kleinhans NM, Johnson LC, Richards T, et al (2009) Reduced neural habituation in the amygdala and social impairments in autism spectrum disorders. *Am J Psychiatry* 166:467–475. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07101681>

Klenowski PM, Zhao-Shea R, Freels TG, et al (2022) Dynamic activity of interpeduncular nucleus GABAergic neurons controls expression of nicotine withdrawal in male mice. *Neuropsychopharmacology* 47:641–651. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01107-1>

Klink R, d'Exaerde A de K, Zoli M, Changeux J-P (2001) Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei. *J Neurosci* 21:1452–1463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01452.2001>

Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>

Koubeissi MZ, Bartolomei F, Beltagy A, Picard F (2014) Electrical stimulation of a small brain area reversibly disrupts consciousness. *Epilepsy Behav* 37:32–35. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.05.027>

Kozlowski LT, Herman CP (1984) The Interaction of Psychosocial and Biological Determinants of Tobacco Use: More on the Boundary Model. *J Appl Soc Psychol* 14:244–256. <https://doi.org/10.1111/j.1559-1816.1984.tb02234.x>

Kramer PF, Brill-Weil SG, Cummins AC, et al (2022) Synaptic-like axo-axonal transmission from striatal cholinergic interneurons onto dopaminergic fibers. *Neuron* 110:2949–2960.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.011>

Kramer RH, Mouroto A, Adesnik H (2013) Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci* 16:816–823. <https://doi.org/10.1038/nn.3424>

Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL, et al (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>

Lammel S, Hetzel A, Häckel O, et al (2008) Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* 57:760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>

Lammel S, Ion DI, Roeper J, Malenka RC (2011) Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron* 70:855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>

Lammel S, Lim BK, Ran C, et al (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>

Le Houezec J (2003) Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 7:811–819

Lee H, Kim D-W, Remedios R, et al (2014) Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature* 509:627–632. <https://doi.org/10.1038/nature13169>

Lemoine D, Jiang R, Taly A, et al (2012) Ligand-Gated Ion Channels: New Insights into Neurological Disorders and Ligand Recognition. *Chem Rev* 112:6285–6318. <https://doi.org/10.1021/cr3000829>

Léna C, Changeux J-P, Mulle C (1993) Lena C, Changeux JP, Mulle C. Evidence for “preterminal” nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 13: 2680-2688. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 13:2680–8

Lenn NJ, Hamill GS (1984) Subdivisions of the interpeduncular nucleus: A proposed nomenclature. *Brain Res Bull* 13:203–204. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90023-6)

Lester HA, Xiao C, Srinivasan R, et al (2009) Nicotine is a Selective Pharmacological Chaperone of Acetylcholine Receptor Number and Stoichiometry. Implications for Drug Discovery. *AAPS J* 11:167–177. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9090-7>

Levin ED, Mead T, Rezvani AH, et al (2000) The nicotinic antagonist mecamylamine preferentially inhibits cocaine vs. food self-administration in rats. *Physiol Behav* 71:565–570. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00382-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00382-6)

Liebreich O (1865) Ueber die chemische Beschaffenheit der Gehirnsubstanz. *Justus Liebigs Ann Chem* 134:29–44. <https://doi.org/10.1002/jlac.18651340107>

Lima LB, Bueno D, Leite F, et al (2017) Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. *J Comp Neurol* 525:2411–2442. <https://doi.org/10.1002/cne.24217>

Lin W-C, Davenport CM, Mourot A, et al (2014) Engineering a Light-Regulated GABAA Receptor for Optical Control of Neural Inhibition. *ACS Chem Biol* 9:1414. <https://doi.org/10.1021/cb500167u>

Lindvall O, Björklund A, Divac I (1978) Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res* 142:1–24. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90173-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90173-7)

Lisman JE (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 20:38–43. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10070-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10070-9)

Liu C, Cai X, Ritzau-Jost A, et al (2022a) An action potential initiation mechanism in distal axons for the control of dopamine release. *Science* 375:1378–1385. <https://doi.org/10.1126/science.abn0532>

Liu C, Tose AJ, Verharen JPH, et al (2022b) An inhibitory brainstem input to dopamine neurons encodes nicotine aversion. *Neuron* 110:3018–3035.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.003>

Liu W-F (2000) Effects of cholinesterase inhibitors on a two-component chained schedule performance in rats. *Neurotoxicol Teratol* 22:389–396. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00086-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00086-0)

Liu W-Z, Zhang W-H, Zheng Z-H, et al (2020) Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. *Nat Commun* 11:2221. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15920-7>

Lodge DJ, Grace AA (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci* 103:5167–5172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510715103>

Loewi O (1922) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflüg Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere* 193:201–213. <https://doi.org/10.1007/BF02331588>

Maldonado AM, Finkbeiner LM, Kirstein CL (2008) Social interaction and partner familiarity differentially alter voluntary ethanol intake in adolescent male and female rats. *Alcohol* 42:641–648. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.08.003>

Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, et al (2006) Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors. *Neuron* 50:911–921. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.007>

Mangold JE, Payne TJ, Ma JZ, et al (2008) Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans. *J Med Genet* 45:578–582. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.057844>

Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002) Synaptic Mechanisms Underlie Nicotine-Induced Excitability of Brain Reward Areas. *Neuron* 33:905–919. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00625-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00625-6)

Mansvelder HD, McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349–357. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00042-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00042-8)

Marcott PF, Mamaligas AA, Ford CP (2014) Phasic dopamine release drives rapid activation of striatal D2-receptors. *Neuron* 84:164–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.058>

Mark GP, Shabani S, Dobbs LK, Hansen ST (2011) Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward. *Physiol Behav* 104:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.052>

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>

Marks MJ, Burch JB, Collins AC (1983) Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 226:817–825

Marti F, Arib O, Morel C, et al (2011) Smoke Extracts and Nicotine, but not Tobacco Extracts, Potentiate Firing and Burst Activity of Ventral Tegmental Area Dopaminergic Neurons in Mice. *Neuropsychopharmacology* 36:2244–2257. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.112>

Martin DA, Nichols CD (2016) Psychedelics Recruit Multiple Cellular Types and Produce Complex Transcriptional Responses Within the Brain. *EBioMedicine* 11:262–277. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.049>

Maskos U (2008) The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology: Nicotinic master modulation. *Br J Pharmacol* 153:S438–S445. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.5>

Maskos U, Molles BE, Pons S, et al (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436:103–107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>

Mathur BN (2014) The claustrum in review. *Front Syst Neurosci* 8:48. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00048>

Mathuru AS, Jesuthasan S (2013) The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. *Front Neural Circuits* 7:99. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00099>

Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, et al (2007) Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* 190:269–319. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>

Maubourguet N, Lesne A, Changeux J-P, et al (2008) Behavioral Sequence Analysis Reveals a Novel Role for $\beta 2^*$ Nicotinic Receptors in Exploration. *PLoS Comput Biol* 4:e1000229. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000229>

McDonald AJ (2003) Is There an Amygdala and How Far Does It Extend? *Ann N Y Acad Sci* 985:1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07067.x>

McDonald AJ (1982) Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 208:401–418. <https://doi.org/10.1002/cne.902080409>

McGranahan TM, Patzlaff NE, Grady SR, et al (2011) $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors on Dopaminergic Neurons Mediate Nicotine Reward and Anxiety Relief. *J Neurosci* 31:10891–10902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011>

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, et al (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 145:209–212. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90024-2)

Mei L, Osakada T, Lin D (2023) Hypothalamic control of innate social behaviors. *Science* 382:399–404. <https://doi.org/10.1126/science.adh8489>

Mena-Segovia J, Winn P, Bolam JP (2008) Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* 58:265–271. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.02.003>

Merrill CB, Friend LN, Newton ST, et al (2015) Ventral tegmental area dopamine and GABA neurons: Physiological properties and expression of mRNA for endocannabinoid biosynthetic elements. *Sci Rep* 5:16176. <https://doi.org/10.1038/srep16176>

Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>

Minces (2017) Cholinergic shaping of neural correlations. <https://www-pnas-org.insb.bib.cnrs.fr/doi/10.1073/pnas.1621493114>. Accessed 7 Feb 2024

Missale C, Nash SR, Robinson SW, et al (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78:189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>

Molas S, DeGroot S, Zhao-Shea R, Tapper AR (2017a) Anxiety and nicotine dependence: Emerging role of the habenulo-interpeduncular axis. *Trends Pharmacol Sci* 38:169–180. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.001>

Molas S, Freels TG, Zhao-Shea R, et al (2024) Dopamine control of social novelty preference is constrained by an interpeduncular-tegmentum circuit. *Nat Commun* 15:2891. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47255-y>

Molas S, Zhao-Shea R, Liu L, et al (2017b) A circuit-based mechanism underlying familiarity signaling and the preference for novelty. *Nat Neurosci* 20:1260–1268. <https://doi.org/10.1038/nn.4607>

Mondoloni S, Nguyen C, Vicq E, et al (2023) Prolonged nicotine exposure reduces aversion to the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus. *eLife* 12:e80767. <https://doi.org/10.7554/eLife.80767>

Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431:760–767. <https://doi.org/10.1038/nature03015>

Morales M, Margolis EB (2017) Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18:73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>

Morel C, Fattore L, Pons S, et al (2014) Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry* 19:930–936. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.158>

Morel C, Fernandez SP, Pantouli F, et al (2018) Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. *Mol Psychiatry* 23:1597–1605. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.145>

Morton G, Nasirova N, Sparks DW, et al (2018) Chrna5-Expressing Neurons in the Interpeduncular Nucleus Mediate Aversion Primed by Prior Stimulation or Nicotine Exposure. *J Neurosci* 38:6900–6920. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0023-18.2018>

Moy SS, Nadler JJ, Perez A, et al (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 3:287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>

Mulvihill KG (2019) Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochem Int* 122:94–105. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.004>

Murphy CA, DiCamillo AM, Haun F, Murray M (1996) Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. *Behav Brain Res* 81:43–52. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)00041-1)

Nair A, Teo YY, Augustine GJ, Graf M (2023) A functional logic for neurotransmitter corelease in the cholinergic forebrain pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:e2218830120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2218830120>

Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, et al (2015) A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature* 520:675–678. <https://doi.org/10.1038/nature14366>

Narikiyo K, Mizuguchi R, Ajima A, et al (2020) The claustrum coordinates cortical slow-wave activity. *Nat Neurosci* 23:741–753. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0625-7>

Nashmi R, Dickinson ME, McKinney S, et al (2003) Assembly of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Assessed with Functional Fluorescently Labeled Subunits: Effects of Localization, Trafficking, and Nicotine-Induced Upregulation in Clonal Mammalian Cells and in Cultured Midbrain Neurons. *J Neurosci* 23:11554–11567. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11554.2003>

Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, et al (2007) Chronic Nicotine Cell Specifically Upregulates Functional $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptors: Basis for Both Tolerance in Midbrain and Enhanced Long-Term Potentiation in Perforant Path. *J Neurosci* 27:8202–8218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-07.2007>

Nasirova N, Quina LA, Novik S, Turner EE (2021) Genetically Targeted Connectivity Tracing Excludes Dopaminergic Inputs to the Interpeduncular Nucleus from the Ventral Tegmentum and Substantia Nigra. *eNeuro* 8:ENEURO.0127-21.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0127-21.2021>

Naudé J, Tolu S, Dongelmans M, et al (2016) Nicotinic receptors in the ventral tegmental area promote uncertainty-seeking. *Nat Neurosci* 19:471–478. <https://doi.org/10.1038/nn.4223>

Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, et al (2003) Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63:332–341. <https://doi.org/10.1124/mol.63.2.332>

Nguyen C, Mondoloni S, Le Borgne T, et al (2021) Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron* 109:2604–2615.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>

Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, et al (1997) Vesicular monoamine transporter-2: immunogold localization in striatal axons and terminals. *Synap N Y N* 26:194-198. [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)

Norimoto H, Fenk LA, Li H-H, et al (2020) A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep. *Nature* 578:413-418. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1993-6>

Numan M (2012) Maternal Behavior: Neural Circuits, Stimulus Valence, and Motivational Processes. *Parenting* 12:105-114. <https://doi.org/10.1080/15295192.2012.680406>

Olds J (1956) Pleasure Centers in the Brain. *Sci Am* 195:105-117

Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>

Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synap N Y N* 61:87-95. <https://doi.org/10.1002/syn.20345>

Omelchenko N, Sesack SR (2009) Ultrastructural Analysis of Local Collaterals of Rat Ventral Tegmental Area Neurons: GABA Phenotype and Synapses onto Dopamine and GABA Cells. *Synap N Y N* 63:895-906. <https://doi.org/10.1002/syn.20668>

Otsu Y, Darcq E, Pietrajtis K, et al (2019) Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. *Science* 366:250-254. <https://doi.org/10.1126/science.aax1522>

Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE (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 (Berl)* 144:54-60. <https://doi.org/10.1007/s002130050976>

Paladini CA, Tepper JM (1999) GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synap N Y N* 32:165-176. [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)

Palmatier MI, Evans-Martin FF, Hoffman A, et al (2006) Dissociating the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine using a rat self-administration paradigm with concurrently available drug and environmental reinforcers. *Psychopharmacology (Berl)* 184:391-400. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0183-4>

Paoletti P, Ellis-Davies GCR, Mouroto A (2019) Optical control of neuronal ion channels and receptors. *Nat Rev Neurosci* 20:514-532. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0197-2>

- Parikh V, Kozak R, Martinez V, Sarter M (2007) Prefrontal Acetylcholine Release Controls Cue Detection on Multiple Timescales. *Neuron* 56:141–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.025>
- Pavel B, Menardy F, Rotaru D, et al (2019) Electrical Stimulation in the Claustrum Area Induces a Deepening of Isoflurane Anesthesia in Rat. *Brain Sci* 9:304. <https://doi.org/10.3390/brainsci9110304>
- Pavlov IP (1932) The reply of a physiologist to psychologists. *Psychol Rev* 39:91–127. <https://doi.org/10.1037/h0069929>
- Pavlov IP (1957) *Experimental psychology and other essays*. Philosophical Library, Oxford, England
- Pelloux Y, Giorla E, Montanari C, Baunez C (2019) Social modulation of drug use and drug addiction. *Neuropharmacology* 159:107545. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.027>
- Perry DC, Dávila-García MI, Stockmeier CA, Kellar KJ (1999) Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1545–1552
- Perry DC, Xiao Y, Nguyen HN, et al (2002) Measuring nicotinic receptors with characteristics of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem* 82:468–481. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00951.x>
- Pessiglione M (2014) Comment le cerveau motive le comportement: du circuit de la récompense au système des valeurs. *Bull Académie Natl Médecine* 198:1283–1296. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31224-5](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31224-5)
- Petersen DR, Norris KJ, Thompson JA (1984) A comparative study of the disposition of nicotine and its metabolites in three inbred strains of mice. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 12:725–731
- Petrovich GD, Ross CA, Holland PC, Gallagher M (2007) Medial prefrontal cortex is necessary for an appetitive contextual conditioned stimulus to promote eating in sated rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:6436–6441. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5001-06.2007>
- Peyron C, Luppi P-H, Kitahama K, et al (1996) Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroreport* 6: 2527–2531. *Neuroreport* 6:2527–31. <https://doi.org/10.1097/00001756-199512150-00019>
- Phillips AG, Blaha CD, Fibiger HC (1989) Neurochemical correlates of brain-stimulation reward measured by ex vivo and in vivo analyses. *Neurosci Biobehav Rev* 13:99–104. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80017-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80017-X)

Picciotto MR (2003) Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493–499. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00230-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00230-X)

Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ (2002) Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 13:1097–1106. <https://doi.org/10.1097/00001756-200207020-00006>

Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS (2012) Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 76:116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>

Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401–404. <https://doi.org/10.1038/37120>

Piña JA, Namba MD, Leyrer-Jackson JM, et al (2018) Social Influences on Nicotine-Related Behaviors. *Int Rev Neurobiol* 140:1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.07.001>

Polack P-O, Friedman J, Golshani P (2013) Cellular mechanisms of brain state-dependent gain modulation in visual cortex. *Nat Neurosci* 16:1331–1339. <https://doi.org/10.1038/nn.3464>

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 23:163–178. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90223-2](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90223-2)

Qi J (2014) A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat Commun*

Quina LA, Harris J, Zeng H, Turner EE (2017) Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. *J Comp Neurol* 525:2632–2656. <https://doi.org/10.1002/cne.24221>

Rada PV, Mark GP, Yeomans JJ, Hoebel BG (2000) Acetylcholine Release in Ventral Tegmental Area by Hypothalamic Self-Stimulation, Eating, and Drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 65:375–379. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00218-X)

Rahman FE, Baizer JS (2007) Neurochemically defined cell types in the claustrum of the cat. *Brain Res* 1159:94–111. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.011>

Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, et al (1996) Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347–351. <https://doi.org/10.1038/380347a0>

Rangel A, Camerer C, Montague PR (2008) A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat Rev Neurosci* 9:545–556. <https://doi.org/10.1038/nrn2357>

Rayes D, Rosa MJD, Sine SM, Bouzat C (2009) Number and Locations of Agonist Binding Sites Required to Activate Homomeric Cys-Loop Receptors. *J Neurosci* 29:6022–6032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0627-09.2009>

Redish AD (2004) Addiction as a computational process gone awry. *Science* 306:1944–1947. <https://doi.org/10.1126/science.1102384>

Remedios R, Logothetis NK, Kayser C (2014) A role of the claustrum in auditory scene analysis by reflecting sensory change. *Front Syst Neurosci* 8:44. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00044>

Ren J, Qin C, Hu F, et al (2011) Habenula “cholinergic” neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron* 69:445–452. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.038>

Riddle DR, Lo DC, Katz LC (1995) NT-4-mediated rescue of lateral geniculate neurons from effects of monocular deprivation. *Nature* 378:189–191. <https://doi.org/10.1038/378189a0>

Risinger FO, Oakes RA (1995) Nicotine-induced conditioned place preference and conditioned place aversion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51:457–461. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00007-j](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00007-j)

Risner ME, Goldberg SR (1983) A comparison of nicotine and cocaine self-administration in the dog: fixed-ratio and progressive-ratio schedules of intravenous drug infusion. *J Pharmacol Exp Ther* 224:319–326

Robinson AM, Lacy RT, Strickland JC, et al (2016) The effects of social contact on cocaine intake under extended-access conditions in male rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 24:285–296. <https://doi.org/10.1037/pha0000078>

Roeper J (2013) Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci* 36:336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.003>

Rowell TE (1974) The concept of social dominance. *Behav Biol* 11:131–154. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(74\)90289-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(74)90289-2)

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. *Dev Neurobiol* 71:45–61. <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>

Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C (1980) Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 280:972–976

Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803–834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>

- Salas R, Pieri F, De Biasi M (2004) Decreased Signs of Nicotine Withdrawal in Mice Null for the $\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit. *J Neurosci* 24:10035–10039. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1939-04.2004>
- Salas R, Pieri F, Fung B, et al (2003) Altered Anxiety-Related Responses in Mutant Mice Lacking the $\beta 4$ Subunit of the Nicotinic Receptor. *J Neurosci* 23:6255–6263. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-15-06255.2003>
- Salas R, Sturm R, Boulter J, De Biasi M (2009) Nicotinic Receptors in the Habenulo-Interpeduncular System Are Necessary for Nicotine Withdrawal in Mice. *J Neurosci* 29:3014–3018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4934-08.2009>
- Salerno MT, Zagami MT, Cortimiglia R, Infantellina F (1981) The action of iontophoretically applied acetylcholine and dopamine on single claustrum neurones in the cat. *Neuropharmacology* 20:895–899. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(81\)90085-x](https://doi.org/10.1016/0028-3908(81)90085-x)
- Salette J, Pons S, Devillers-Thierry A, et al (2005) Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* 46:595–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.029>
- Salzberg HC, Lonstein JS, Stern JM (2002) GABA(A) receptor regulation of kyphotic nursing and female sexual behavior in the caudal ventrolateral periaqueductal gray of postpartum rats. *Neuroscience* 114:675–687. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00358-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00358-5)
- Sanjakdar SS, Maldoon PP, Marks MJ, et al (2015) Differential Roles of $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ Neuronal Nicotinic Receptors in Nicotine- and Cocaine-Conditioned Reward in Mice. *Neuropsychopharmacology* 40:350–360. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.177>
- Sarter M, Bruno JP (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Rev* 23:28–46. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(96\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(96)00009-4)
- Sarter M, Parikh V, Howe WM (2009) Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10:383–390. <https://doi.org/10.1038/nrn2635>
- Sarter, Parikh (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15611726/>. Accessed 7 Feb 2024
- Sartor CE, Lessov-Schlaggar CN, Scherrer JF, et al (2010) Initial Response to Cigarettes Predicts Rate of Progression to Regular Smoking: Findings from an Offspring-of-Twins Design. *Addict Behav* 35:771–778. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2010.03.004>

Saunders BT, Robinson TE (2012) The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian conditioned responses. *Eur J Neurosci* 36:2521–2532. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08217.x>

Savasta M, Dubois A, Scatton B (1986) Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Res* 375:291–301. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90749-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90749-3)

Schilström B, Rawal N, Mameli-Engvall M, et al (2003) Dual effects of nicotine on dopamine neurons mediated by different nicotinic receptor subtypes. *Int J Neuropsychopharmacol* 6:1–11. <https://doi.org/10.1017/S1461145702003188>

Schmitz TW, Duncan J (2018) Normalization and the Cholinergic Microcircuit: A Unified Basis for Attention. *Trends Cogn Sci* 22:422–437. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.02.011>

Schultz W (2002) Getting Formal with Dopamine and Reward. *Neuron* 36:241–263. [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. *Annu Rev Psychol* 57:87–115. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070229>

Schultz W (2015) Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiol Rev* 95:853–951. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2014>

Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science* 275:1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>

Schwartz RD, Kellar KJ (1983) Nicotinic Cholinergic Receptor Binding Sites in the Brain: Regulation in Vivo. *Science* 220:214–216. <https://doi.org/10.1126/science.6828889>

Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo-pontine tegmental nuclei in the rat: A retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323:387–410. <https://doi.org/10.1002/cne.903230307>

Serreau P, Chabout J, Suarez SV, et al (2011) Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations. *Behav Brain Res* 225:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.016>

Shen J, Yakel JL (2009) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 30:673–680. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.64>

Shi W-X (2009) Electrophysiological characteristics of dopamine neurons: a 35-year update. *J Neural Transm Suppl* 103–119. https://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4_8

Shibata H, Suzuki T (1984) Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study. *Brain Res* 296:345–349. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90071-4)

Shih P-Y, Engle SE, Oh G, et al (2014) Differential Expression and Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Subdivisions of Medial Habenula. *J Neurosci* 34:9789–9802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0476-14.2014>

Shorey-Kendrick LE, Ford MM, Allen DC, et al (2015) Nicotinic receptors in non-human primates: Analysis of genetic and functional conservation with humans. *Neuropharmacology* 96:263–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.023>

Skinner BF (1953) Some contributions of an experimental analysis of behavior to psychology as a whole. *Am Psychol* 8:69–78. <https://doi.org/10.1037/h0054118>

Ślimak MA, Ables JL, Frahm S, et al (2014) Habenular expression of rare missense variants of the $\beta 4$ nicotinic receptor subunit alters nicotine consumption. *Front Hum Neurosci* 8:12. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00012>

Smith JB, Watson GDR, Liang Z, et al (2019) A Role for the Claustrum in Salience Processing? *Front Neuroanat* 13:64. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00064>

Smith MA (2012) Peer influences on drug self-administration: Social facilitation and social inhibition of cocaine intake in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 224:81–90. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2737-6>

Soden ME, Jones GL, Sanford CA, et al (2013) Disruption of Dopamine Neuron Activity Pattern Regulation through Selective Expression of a Human KCNN3 Mutation. *Neuron* 80:997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.044>

Solié C, Girard B, Righetti B, et al (2022) VTA dopamine neuron activity encodes social interaction and promotes reinforcement learning through social prediction error. *Nat Neurosci* 25:86–97. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00972-9>

Solomon RL, Corbit JD (1974) An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* 81:119–145. <https://doi.org/10.1037/h0036128>

Solomon RL, Corbit JD (1978) An Opponent-Process Theory of Motivation. *Am Econ Rev* 68:12–24

Soria-Gómez E, Busquets-Garcia A, Hu F, et al (2015) Habenular CB1 Receptors Control the Expression of Aversive Memories. *Neuron* 88:306–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.035>

Srinivasan R, Pantoja R, Moss FJ, et al (2011) Nicotine up-regulates $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *J Gen Physiol* 137:59–79. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010532>

Staley JK, Krishnan-Sarin S, Cosgrove KP, et al (2006) Human tobacco smokers in early abstinence have higher levels of $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors than nonsmokers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:8707–8714. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0546-06.2006>

Steinberg EE, Janak PH (2013) Establishing causality for dopamine in neural function and behavior with optogenetics. *Brain Res* 1511:46–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.09.036>

Steiner RC, Heath CJ, Picciotto MR (2007) Nicotine-induced phosphorylation of ERK in mouse primary cortical neurons: evidence for involvement of glutamatergic signaling and CaMKII. *J Neurochem* 103:666–678. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04799.x>

Surmeier DJ, Ding J, Day M, et al (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228–235. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008>

Sutton RS, Barto AG (1998) Reinforcement Learning: An Introduction

Symmonds M, Emmanuel JJ, Drew ME, et al (2010) Metabolic State Alters Economic Decision Making under Risk in Humans. *PLOS ONE* 5:e11090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011090>

Szjij PA, Bahou C, Chudasama V (2018) Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates. *Drug Discov Today Technol* 30:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.07.002>

Taly A, Corringer P-J, Guedin D, et al (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8:733–750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>

Tansey EM (2006) Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol* 329:419–425. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2006.03.012>

Tapia L, Kuryatov A, Lindstrom J (2007) Ca^{2+} Permeability of the $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ Stoichiometry Greatly Exceeds That of $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ Human Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* 71:769–776. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030445>

Tapper AR, Molas S (2020) Midbrain circuits of novelty processing. *Neurobiol Learn Mem* 176:107323. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107323>

Taylor SR, Badurek S, DiLeone RJ, et al (2014) GABAergic and Glutamatergic Efferents of the Mouse Ventral Tegmental Area. *J Comp Neurol* 522:3308–3334. <https://doi.org/10.1002/cne.23603>

Terem A, Gonzales BJ, Peretz-Rivlin N, et al (2020) Claustral Neurons Projecting to Frontal Cortex Mediate Contextual Association of Reward. *Curr Biol* 30:3522–3532.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.064>

Thiele A (2013) Muscarinic signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 36:271–294. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170433>

Thompson R (1960) Interpeduncular nucleus and avoidance conditioning in the rat. *Science* 132:1551–1553. <https://doi.org/10.1126/science.132.3439.1551>

Threlfell S, Lalic T, Platt NJ, et al (2012) Striatal Dopamine Release Is Triggered by Synchronized Activity in Cholinergic Interneurons. *Neuron* 75:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.038>

Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W (2005) Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science* 307:1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1105370>

Tochitsky I, Banghart MR, Mouroto A, et al (2012) Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem* 4:105–111. <https://doi.org/10.1038/nchem.1234>

Tolu S, Eddine R, Marti F, et al (2013) Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol Psychiatry* 18:382–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>

Tolu S, Marti F, Morel C, et al (2017) Nicotine enhances alcohol intake and dopaminergic responses through β_2^* and β_4^* nicotinic acetylcholine receptors. *Sci Rep* 7:45116. <https://doi.org/10.1038/srep45116>

Torgerson CM, Irimia A, Goh SYM, Van Horn JD (2014) The DTI connectivity of the human claustrum. *Hum Brain Mapp* 36:827–838. <https://doi.org/10.1002/hbm.22667>

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits. *Neuron* 91:260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>

Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron* 76:33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>

Tsai H-C, Zhang F, Adamantidis A, et al (2009) Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science* 324:1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>

Vale-Martínez A, Martí-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G, et al (1997) Effects of Habenular Lesions upon Two-Way Active Avoidance Conditioning in Rats. *Neurobiol Learn Mem* 68:68–74. <https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3777>

van Haaren F, Haworth SC, Bennett SM, Cody BA (2001) The effects of pyridostigmine bromide on progressive ratio performance in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68:81–85. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00438-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00438-X)

Veniro M, Zhang M, Caprioli D, et al (2018) Volitional social interaction prevents drug addiction in rat models. *Nat Neurosci* 21:1520–1529. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0246-6>

Vertes RP (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643–668. <https://doi.org/10.1002/cne.903130409>

Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, et al (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* 2:47–52. <https://doi.org/10.1038/nchembio756>

Von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, et al (2007) Functional Characterization of Intrinsic Cholinergic Interneurons in the Cortex. *J Neurosci* 27:5633–5642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4647-06.2007>

Walters CL, Brown S, Changeux J-P, et al (2006) The $\beta 2$ but not $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 184:339–344. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0295-x>

Wamsley JK, Gehlert DR, Filloux FM, Dawson TM (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 2:119–137

Wang H-L (2019) Dorsal Raphe Dual Serotonin-Glutamate Neurons Drive Reward by Establishing Excitatory Synapses on VTA Mesoaccumbens Dopamine Neurons

Wang H-L, Morales M (2009) Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 29:340–358. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06576.x>

Wang Q, Ng L, Harris JA, et al (2017) Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *J Comp Neurol* 525:1317–1346. <https://doi.org/10.1002/cne.24047>

Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, et al (2012) Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* 74:858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>

Watanabe S (2011) Drug-social interactions in the reinforcing property of methamphetamine in mice. *Behav Pharmacol* 22:203. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328345c815>

Watanabe S (2015) Common experience modifies the reinforcing properties of methamphetamine-injected cage mates but not morphine-injected cage mates in C57 mice. *Behav Pharmacol* 26:636–641. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000137>

Webb SJ, Jones EJH, Merkle K, et al (2010) Toddlers with elevated autism symptoms show slowed habituation to faces. *Child Neuropsychol J Norm Abnorm Dev Child Adolesc* 16:255–278. <https://doi.org/10.1080/09297041003601454>

Weber M, David-Pfeuty T, Changeux JP (1975) Regulation of binding properties of the nicotinic receptor protein by cholinergic ligands in membrane fragments from *Torpedo marmorata*. *Proc Natl Acad Sci* 72:3443–3447. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3443>

Weiner DM, Brann MR (1989) The distribution of a dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *FEBS Lett* 253:207–213. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80960-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80960-3)

White MG, Mathur BN (2018) Claustrum circuit components for top-down input processing and cortical broadcast. *Brain Struct Funct* 223:3945–3958. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1731-0>

Wills L, Ables JL, Braunscheidel KM, et al (2022) Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. *Pharmacol Rev* 74:271–310. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299>

Wirtshafter D (1981) The role of interpeduncular connections with the tegmentum in avoidance learning. *Physiol Behav* 26:985–989. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90197-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90197-9)

Wise RA (2005) Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol* 493:115–121. <https://doi.org/10.1002/cne.20689>

Wolfman SL, Gill DF, Bogdanic F, et al (2018) Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nat Commun* 9:2710. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04654-2>

Wong KLL, Nair A, Augustine GJ (2021) Changing the Cortical Conductor’s Tempo: Neuromodulation of the Claustrum. *Front Neural Circuits* 15:

Woolf NJ (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37:475–524. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90006-m](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90006-m)

Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, et al (1995) Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol* 351:357–373. <https://doi.org/10.1002/cne.903510304>

Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, et al (2011) Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons Target Non-Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. *J Neurosci* 31:7811–7816. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-11.2011>

Xiao C, Cho JR, Zhou C, et al (2016) Cholinergic Mesopontine Signals Govern Locomotion and Reward through Dissociable Midbrain Pathways. *Neuron* 90:333–347. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.028>

Xu M, Chung S, Zhang S, et al (2015) Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat Neurosci* 18:1641–1647. <https://doi.org/10.1038/nn.4143>

Yang H, Jong JW de, Tak Y, et al (2018) Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* 97:434–449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>

Yeomans J, Baptista M (1997) Both Nicotinic and Muscarinic Receptors in Ventral Tegmental Area Contribute to Brain-Stimulation Reward. *Pharmacol Biochem Behav* 57:915–921. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00467-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00467-4)

Yu AJ, Dayan P (2005) Uncertainty, Neuromodulation, and Attention. *Neuron* 46:681–692. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.026>

Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85–105. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00065-2)

Zarei MM, Radcliffe KA, Chen D, et al (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88:755–764. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00246-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00246-2)

Zarrindast M-R, Khakpai F (2015) The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med* 18:591–603

Zeng H, Sanes JR (2017) Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nat Rev Neurosci* 18:530–546. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>

Zhang J, Tan L, Ren Y, et al (2016) Presynaptic Excitation via GABA B Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. *Cell* 166:716–728. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.026>

Zhang S, Qi J, Li X, et al (2015) Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci* 18:386–392. <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. *Biol Psychiatry* 89:847–856. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.026>

- Zhao-Shea R, DeGroot SR, Liu L, et al (2015) Increased CRF signalling in a ventral tegmental area-interpeduncular nucleus-medial habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. *Nat Commun* 6:6770. <https://doi.org/10.1038/ncomms7770>
- Zhao-Shea R, Liu L, Pang X, et al (2013) Activation of GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus Triggers Physical Nicotine Withdrawal Symptoms. *Curr Biol* 23:2327–2335. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.041>
- Zhao-Shea R, Liu L, Soll LG, et al (2011) Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 36:1021–1032. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.240>
- Zingg B, Dong H-W, Tao HW, Zhang LI (2018) Input-output organization of the mouse claustrum. *J Comp Neurol* 526:2428–2443. <https://doi.org/10.1002/cne.24502>
- Zoli M (2000) Distribution of Cholinergic Neurons in the Mammalian Brain with Special Reference to their Relationship with Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. In: Clementi F, Fornasari D, Gotti C (eds) *Neuronal Nicotinic Receptors*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 13–30
- Zoli M (1998) Identification of Four Classes of Brain Nicotinic Receptors Using. 12
- Zoli M, Pistillo F, Gotti C (2015) Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96:302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>

Annexe

Prolonged nicotine exposure reduces aversion to the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus

Sarah Mondoloni¹, Claire Nguyen¹, Eléonore Vicq^{1,2}, Maria Ciscato², Joachim Jehl^{1,2}, Romain Durand-de Cuttoli¹, Nicolas Torquet¹, Stefania Tolu¹, Stéphanie Pons³, Uwe Maskos³, Fabio Marti^{1,2}, Philippe Faure^{1,2*}, Alexandre Mourot^{1,2*†}

¹Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Paris, France; ²Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, Paris, France; ³Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Département de neuroscience, Paris, France

Abstract Nicotine intake is likely to result from a balance between the rewarding and aversive properties of the drug, yet the individual differences in neural activity that control aversion to nicotine and their adaptation during the addiction process remain largely unknown. Using a two-bottle choice experiment, we observed considerable heterogeneity in nicotine-drinking profiles in isogenic adult male mice, with about half of the mice persisting in nicotine consumption even at high concentrations, whereas the other half stopped consuming. We found that nicotine intake was negatively correlated with nicotine-evoked currents in the interpeduncular nucleus (IPN), and that prolonged exposure to nicotine, by weakening this response, decreased aversion to the drug, and hence boosted consumption. Lastly, using knock-out mice and local gene re-expression, we identified $\beta 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors of IPN neurons as molecular and cellular correlates of nicotine aversion. Collectively, our results identify the IPN as a substrate for individual variabilities and adaptations in nicotine consumption.

*For correspondence: phfaure@gmail.com (PF); almourot@gmail.com (AM)

†These authors contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 18

Preprinted: 17 December 2021

Received: 03 June 2022

Accepted: 29 May 2023

Published: 30 May 2023

Reviewing Editor: Lan Ma, Fudan University, China

© Copyright Mondoloni et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Editor's evaluation

The vulnerability to adaptations in nicotine addiction is largely determined by individual differences in neural activity controlling nicotine aversion. In the current study, Mondoloni and colleagues differentiated individual mice into "avoiders" and "non-avoiders" based on their nicotine drinking behavior in two-bottle choice tests, and identified a nicotinic receptor, $\beta 4$ nAChR, in the interpeduncular nuclei as a key substrate for mediating nicotine aversion. This finding has important implications for understanding individual differences in drug addiction.

Introduction

Nicotine remains one of the most-widely used addictive substance in the world, and even though cigarette smoking is overall decreasing, the use of new products such as electronic cigarettes has risen dramatically in recent years (WHO, 2021). Nicotine administration induces a range of effects, from pleasant (i.e. appetitive, rewarding, reinforcing, anxiolytic...) to noxious (i.e. anxiogenic, aversive...) (Fowler and Kenny, 2014; Verendeev and Riley, 2013; Wills et al., 2022). These multifaceted

effects have been described both in humans and in rodents. They greatly depend on the dose of nicotine administered, show substantial inter-individual variability, and are considered essential in the regulation of nicotine intake and in the maintenance of addiction. Understanding the variable effects of nicotine at the molecular and circuit levels is therefore fundamental to progress in the pathophysiology of nicotine addiction and to develop efficient smoking-cessation therapies.

Nicotine mediates its physiological effects by activating nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), pentameric ligand-gated ion channels encoded by a large multigene family (Wills et al., 2022). There are nine α ($\alpha 2$ –10) and three β ($\beta 2$ –4) nAChR subunits expressed in the brain, which can assemble to form homo-pentamers or hetero-pentamers with various localizations and functions (Taly et al., 2009; Zoli et al., 2015). Initiation of consumption and reinforcement to nicotine involve the mesolimbic dopamine reward circuit, which originates in the ventral tegmental area (VTA; Maskos et al., 2005). Nicotine primarily acts on this circuit by activating $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, a receptor subtype that displays high affinity for the drug (Durand-de Cuttoli et al., 2018; Maskos et al., 2005; Tapper et al., 2004; Tolu et al., 2013). An acute injection of nicotine also inhibits a subset of VTA dopamine neurons that project to the amygdala (Nguyen et al., 2021), and this results in elevated anxiety in mice, illustrating the heterogeneity of the brain reward circuit, and the complexity of nicotine dependence.

Another important pathway in the neurobiology of nicotine addiction is the medial habenulo-interpeduncular (MHb-IPN) axis (Fowler et al., 2011; Frahm et al., 2011; Molas et al., 2017; Morton et al., 2018; Tuesta et al., 2017; Wolfman et al., 2018). This pathway is deeply implicated in the regulation of aversive physiological states such as fear and anxiety (Molas et al., 2017; Otsu et al., 2019; Yamaguchi et al., 2013; Zhang et al., 2016). It is believed to directly mediate aversion to high doses of nicotine (Fowler et al., 2011; Frahm et al., 2011), to trigger affective (anxiety) and somatic symptoms following nicotine withdrawal (Pang et al., 2016; Salas et al., 2009; Zhao-Shea et al., 2015; Zhao-Shea et al., 2013) and to be involved in relapse to nicotine-seeking (Forget et al., 2018). Strikingly, neurons of the MHb-IPN axis express the highest density and largest diversity of nAChRs in the brain, notably the rare $\alpha 5$, $\alpha 3$, and $\beta 4$ subunits (Zoli et al., 2015). These are encoded by the *CHRNA5-A3-B4* gene cluster, some sequence variants of which are associated with a high risk of addiction in humans (Bierut et al., 2008; Lassi et al., 2016). The $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits are virtually absent in the VTA, or in other parts of the brain. The implication of these different subunits in the response of the IPN to nicotine was so far investigated using brain slice physiology experiments or indirect approaches such as c-fos quantification (Fowler et al., 2011; Wolfman et al., 2018). Recording the physiological response of IPN neurons to nicotine in the intact brain in vivo remains a prerequisite to understand the mechanism of action of nicotine on this pathway.

A distinct feature of addiction is that, overall, only some individuals lose control over their drug use, progressively shifting to compulsive drug intake (Deroche-Gamonet et al., 2004; George and Koob, 2017; Juarez et al., 2017; Pascoli et al., 2018; Siciliano et al., 2019). About one-third to one-half of people who have tried smoking tobacco become regular users (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Individual differences in the sensitivities of the VTA and MHb-IPN systems, and in their respective adaptations during chronic tobacco use, could contribute to the vulnerability to nicotine and to the severity of the addiction process. Yet, the neural mechanism that makes individuals more prone to maintain nicotine consumption than durably stop are unclear. In addition, whether the MHb-IPN pathway respond differently to nicotine in individuals with and without a history of nicotine use, and the mechanisms by which smokers develop tolerance to the aversive effects of nicotine, are largely unknown. Here, we used isogenic mice and electrophysiology (ex vivo and in vivo) to study the neuronal correlates of inter-individual variabilities in nicotine consumption behavior, and their adaptation after chronic exposure to the drug.

Results

Heterogeneity in nicotine consumption in isogenic wild-type mice

We used a continuous access, two-bottle choice nicotine-drinking test to assess consumption profiles in male wild-type (WT) C57BL/6 mice single-housed in their home cage (Figure 1A). In this test, animals have continuous and concurrent access to two bottles containing a solution of either 2% saccharine (vehicle) or nicotine plus 2% saccharine (to mask the bitter taste of nicotine). After a 4-day habituation period with water in both bottles, nicotine concentration was progressively increased

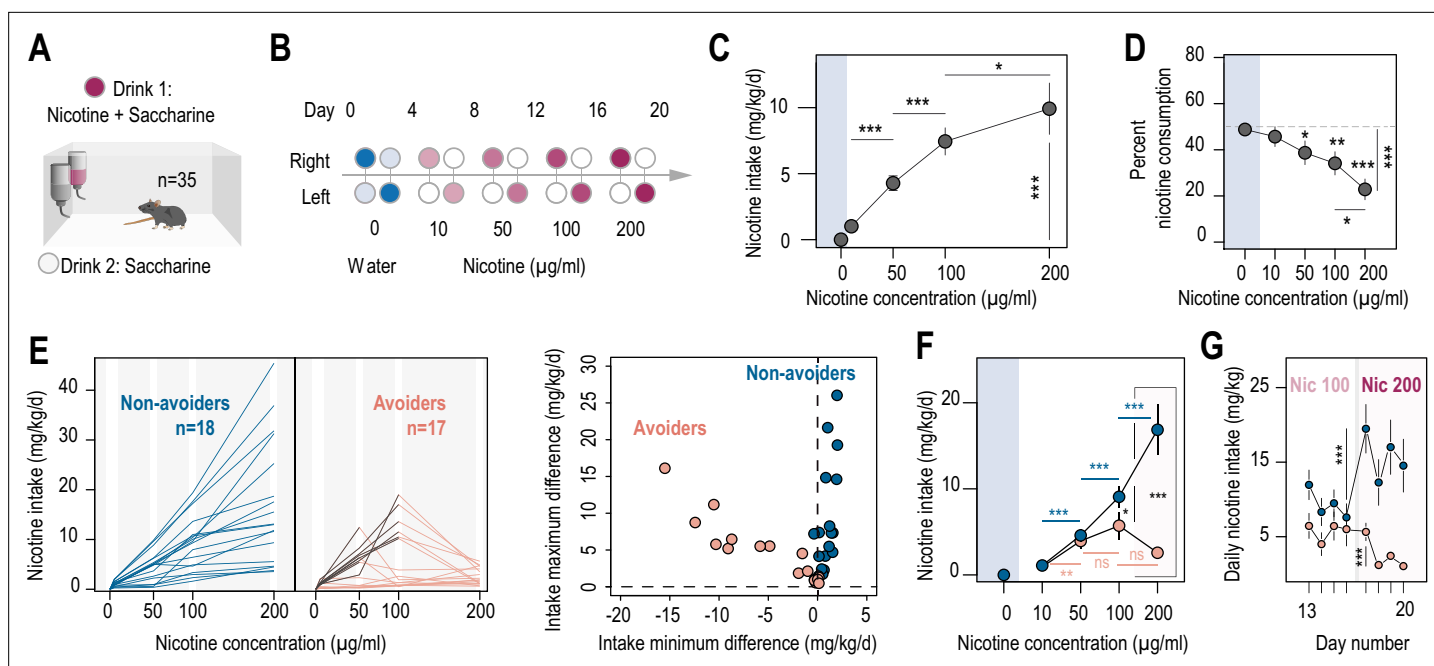


Figure 1. Two different profiles, avoiders and non-avoiders, emerged in WT mice subjected to a two-bottle choice nicotine-drinking test. **(A)** Continuous access, two-bottle choice setup. **(B)** Two-bottle choice paradigm. Each dot represents a bottle and is color-coded according to whether it contains water (blue or light blue), nicotine plus 2% saccharine (red, gradient of color intensities according to the nicotine concentration), or 2% saccharine (white) solutions. The nicotine concentration in the bottle increased progressively from 10 to 50, 100 and 200 µg/ml. Each condition lasted 4 days, and the bottles were swapped every other day. **(C)** Nicotine intake (mg/kg/day), averaged over 4 days, at different nicotine concentrations (Friedman test, $n=35$, $df = 3$, $p < 0.001$ and Mann-Whitney post-hoc test with Holm-Bonferroni correction). **(D)** Percent nicotine consumption in WT mice for each concentration of nicotine, averaged over 4 days (Friedman test, $n=35$, $df = 4$, $p < 0.001$ and Mann-Whitney post-hoc test with Holm-Bonferroni correction). **(E)** Left, nicotine intake in individual avoiders ($n=17$) and non-avoiders ($n=18$). Right, minimum and maximum values of the difference in nicotine intake between 2 consecutive days, for each individual. **(F)** Nicotine intake in avoiders and non-avoiders for each nicotine concentration, averaged over 4 days (Mann-Whitney comparison with a Holm-Bonferroni correction). **(G)** Daily nicotine intake in avoiders and non-avoiders for nicotine 100 and 200 µg/ml (paired Mann-Whitney). Note the drop in nicotine consumption at day 18 for avoiders. In all figure panels, avoiders are depicted in pinkish-orange while non-avoiders are in blue. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 1:

Source data 1. Source data for **Figure 1**.

Figure supplement 1. Nicotine intake and consumption profiles in avoiders and non-avoiders.

in one bottle across 16 days, from 10 to 200 µg/ml (4 days at each concentration), while alternating the side of the nicotine-containing solution every other day to control for side bias (**Figure 1B**). The consumption from each bottle was measured every minute. We found that daily nicotine intake increased throughout the paradigm, stabilizing at about 10 mg/kg/day on average for the highest nicotine concentration tested (**Figure 1C**). Overall, the percent of nicotine consumption, that is, the nicotine solution intake relative to the total fluid intake, was initially close to 50%, and decreased for nicotine concentrations above 50 µg/ml (**Figure 1D**). These results match what was observed in previous studies using male C57BL/6 mice, notably that these mice rarely show nicotine consumption over 50%, whether the water is supplemented with saccharine or not (**Bagdas et al., 2019; Matta et al., 2006**). The decrease in percent nicotine consumption observed at the population level over the course of the task suggests that mice adapt their behavior to reduce their number of visits to the nicotine-containing bottle. Indeed, we observed that mice responded rapidly (within a day) to the increase in nicotine concentration by adjusting their nicotine intake (**Figure 1—figure supplement 1A**), resulting in titration of the nicotine dose, as previously reported (**Fowler et al., 2011; Tuesta et al., 2017**).

We noticed some disparity between mice and decided to analyze nicotine consumption profiles for each individual more closely. In particular, some mice abruptly reduced their intake right after an increase in nicotine concentration in the bottle, or had very low nicotine intake throughout the task

(intake never exceeded 2 mg/kg/day; **Figure 1E**). We classified these mice (17/35) as 'avoiders'. The other half of the mice (18/35), on the other hand, displayed a continuous increase in nicotine intake, or eventually reached a titration plateau in their consumption. These mice were classified as 'non-avoiders'. Another way to examine these distinct consumption profiles is to quantify the differences in intake between 2 consecutive days (positive differences indicate an increase in intake, while negative differences indicate a decrease in intake). The distinction between the two phenotypic groups becomes clear when we plot, for each mouse, the minimum and maximum values of the intake difference between 2 consecutive days (**Figure 1E**, right). The group of avoiders was characterized either by a negative minimum difference in intake (mice that reduce their intake abruptly), or by a minimum and maximum difference in intake close to zero (very low intake throughout the task). In contrast, the non-avoider mice were characterized by a minimum difference in intake between 2 consecutive days that was always positive, indicating a continuous increase in intake throughout the task. Overall, only a small proportion of the mice (7/35, all non-avoiders) reached a plateau in their consumption, which somewhat contrasts with the apparent titration observed at the population level, either here (**Figure 1C**) or in previous studies (Fowler et al., 2011; Tuesta et al., 2017). Avoiders and non-avoiders (phenotypes defined as above throughout the manuscript) showed on average similar nicotine intake for low concentrations of nicotine (10 and 50 $\mu\text{g/ml}$, $p > 0.05$), but while nicotine intake increased throughout the task for non-avoiders (16.9 \pm 2.9 mg/kg/day for 200 $\mu\text{g/ml}$ of nicotine) it dropped down to 2.6 \pm 0.4 mg/kg/day for such high nicotine concentration in avoiders (**Figure 1F**), and almost reached zero over the last 3 days (**Figure 1G**). The percent nicotine consumption was fairly constant throughout the task in non-avoiders, whereas in avoiders, it drastically decreased as nicotine concentration increased, to approximate zero at the end of the task (**Figure 1—figure supplement 1B**). We then compared the level of aversion produced by nicotine in avoiders and non-avoiders, with that produced by quinine, a notoriously bitter molecule. We found that all naive mice actively avoided the quinine-containing solution, and showed near-zero percent quinine consumption, as was observed with nicotine for avoiders, but not for non-avoiders (**Figure 1—figure supplement 1C**). We then used lower concentrations of quinine, and found that nicotine avoidance was not correlated with quinine avoidance (**Figure 1—figure supplement 1D**). Taken together, these results indicate that individuals who avoid nicotine have a strong aversion to the drug that is not directly tied to their sensitivity to the bitter taste of nicotine.

The concentration of nicotine that triggers aversion differs among mice

Owing to the oral nature of the test, it may be difficult for mice to associate consumption in a particular bottle with the physiological effects (positive or negative) of nicotine. We thus systematically analyzed the percent nicotine consumption throughout the task in individual mice, to examine variability in their choice patterns and behavioral alterations. We found that some non-avoiders actively tracked the side associated with nicotine when the bottles were swapped (e.g. mouse #1 in **Figure 2A**), indicating a strong preference for the nicotine-containing bottle and active consumption. Other non-avoiders displayed a strong side preference and never alternated drinking side (e.g. mouse #2 in **Figure 2A**), and hence consumed nicotine in a more passive fashion. In contrast, all avoider mice ($n=17$) displayed active avoidance of the nicotine-containing solution, whether they initially tracked the nicotine solution (e.g. mice #3 and 4 in **Figure 2A**) or not (e.g. mice #5 and 6 in **Figure 2A**). To quantify the evolution of nicotine consumption at the individual level throughout the task, and to better account for the passive consumption behavior of some of the mice, we mapped each profile in a pseudo-ternary plot where the base represents the nicotine consumption index (from 0 to 100%), while the upper apex represents 100% side bias (**Figure 2B**). Such a ternary representation enables us to graphically distinguish between mice that actively track the nicotine bottle (bottom right apex, 100% nicotine consumption index), mice that actively avoid nicotine (bottom left apex, 0% nicotine consumption index), and mice that have a strong side bias (top apex), and to calculate the shortest distance for each mouse to each of the three apices. In addition, by representing the trajectory for each individual from the water condition to the 200 $\mu\text{g/ml}$ nicotine condition, this graph can be used to reveal and quantify behavioral adaptations (or lack thereof) in each individual. Overall, we found that the behavior of non-avoiders was on average fairly consistent throughout the task, that is their distance from the three apices was not really impacted by the modifications in nicotine concentration (**Figure 2C** and **Figure 2—figure supplement 1A and B**), whether they consumed nicotine actively

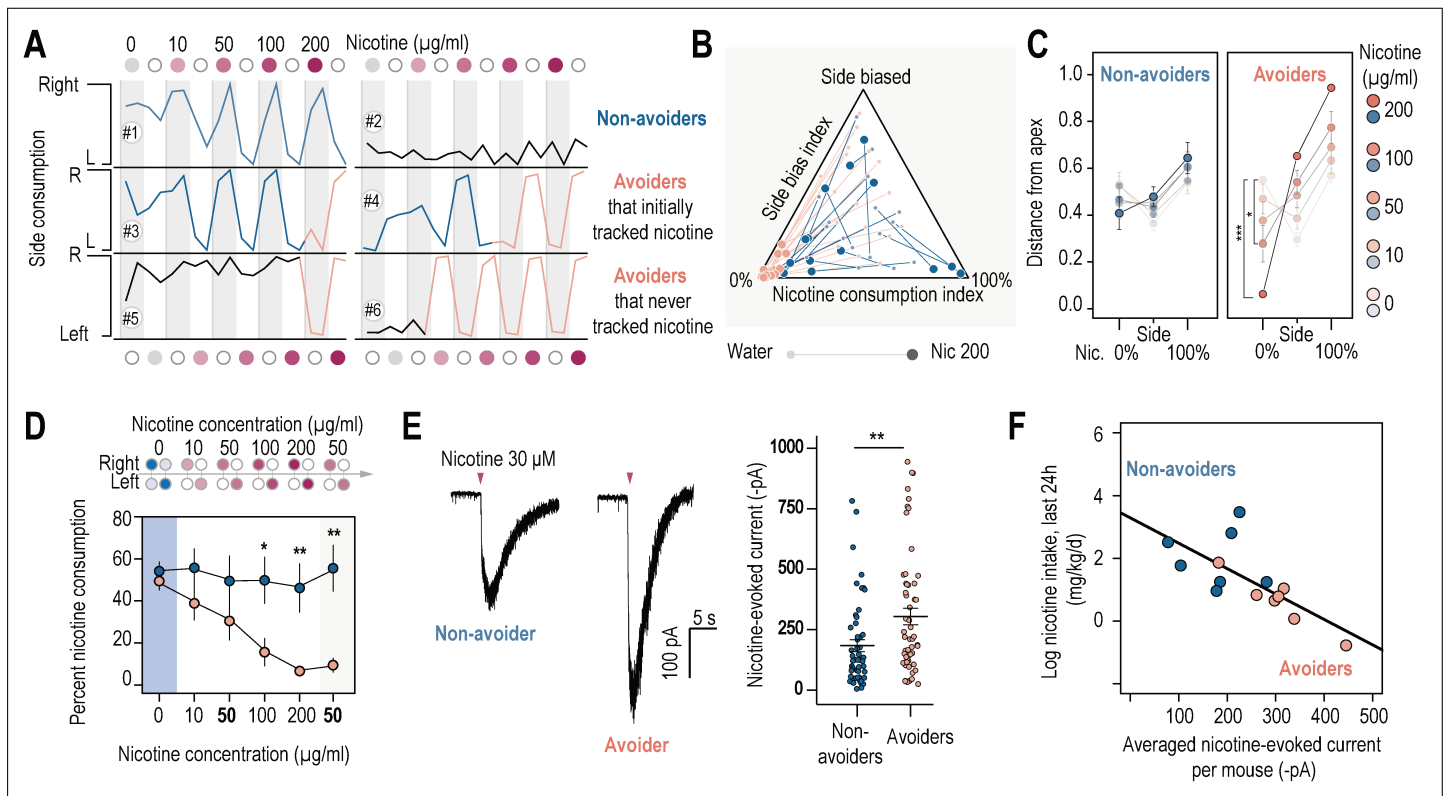


Figure 2. Nicotine intake was negatively correlated with the amplitude of the response to nicotine in IPN neurons. **(A)** Representative examples of choice behaviors (% consumption on the right vs. left bottle) in WT mice when the right-hand side bottle contains either nicotine +saccharine (red dots, grey stripe) or saccharine only (white dots, white stripes). Mice are same as in **Figure 1**. **(B)** Pseudo-ternary diagram representing, for each individual (18 non-avoiders and 17 avoiders, see **Figure 1**), its nicotine consumption index over its side bias index. Bottom left apex: 0% nicotine consumption (0%); Bottom right apex: 100% nicotine consumption (100%); Top apex: 100% side preference (Side biased, i.e. mice that never switch side). Small dots correspond to the habituation period (water vs. water) while bigger dots correspond to the condition with 200 $\mu\text{g/ml}$ of nicotine in one bottle. Note how all avoider mice end up in the bottom left apex (0% nicotine consumption) at the end of the task. **(C)** Average distance from the three apices for each condition in the task (0, 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$ of nicotine, color-coded from light to dark), for avoiders and non-avoiders. Only avoider mice significantly changed their drinking strategy as nicotine concentration increased (paired Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction). **(D)** Average percent nicotine consumption for avoider ($n=8$ mice) and non-avoider mice ($n=8$) for each concentration of nicotine. The 50 $\mu\text{g/ml}$ nicotine solution was presented a second time to the mice, at the end of the session, for 4 days. (Mann-Whitney test, Holm-Bonferroni correction, $p_{50 \text{ Nic}}=0.04$, $p_{(100 \text{ Nic})}=0.005$, $p_{(200 \text{ Nic})}=0.004$). **(E)** Representative (left) and average (right) currents recorded in voltage-clamp mode (-60 mV) from IPN neurons of non-avoiders (blue, $n=52$ neurons from 7 mice, $I=-183.20 \pm 25 \text{ pA}$) and avoiders (red, $n=57$ neurons from 7 mice, $I=-254.64 \pm 33 \text{ pA}$) following a puff application of nicotine (30 μM , 200ms). Avoiders presented greater nicotine-evoked currents than non-avoiders (Mann-Whitney test, $p=0.0027$). **(F)** Correlation between the dose consumed (log scale, over the last 24 hr prior to the recording) and the averaged nicotine evoked-current ($-\text{pA}$) per mouse ($n=14$ mice, $R^2=0.47$, $F_{1,12} = 12.45$, $p=0.004$). In all figure panels, avoiders are depicted in pinkish-orange and non-avoiders in blue. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 2:

Source data 1. Source data for **Figure 2**.

Figure supplement 1. Behavioral and electrophysiological characterization of avoiders and non-avoiders.

or passively. In contrast, the behavior of avoiders was highly nicotine concentration-dependent, with mice going further away from the 100% nicotine apex as nicotine concentration increases (**Figure 2C** and **Figure 2—figure supplement 1A, B**). Aversion to nicotine in avoider mice mainly occurred at the transition from 100 to 200 $\mu\text{g/ml}$, but some mice displayed aversion at concentrations as low as 10 $\mu\text{g/ml}$ (**Figures 1E, 2A and C**). Together, these results show that most mice can actively track or avoid nicotine, indicating that they can discriminate nicotine from the control solution. Avoiders started actively avoiding the nicotine-containing bottle once a specific drug concentration was reached, suggesting the existence of a threshold at which nicotine aversion is triggered, which apparently differs between mice.

Persistence of nicotine aversion

Do avoiders learn to stay away from the nicotine-containing solution, or do they just rapidly react to the change in nicotine concentration in the bottle to adjust their daily intake? To answer this question, we added at the end of the two-bottle choice task, that is after the 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicotine concentration, a condition with a low concentration of nicotine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 4 days. We chose 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine because avoiders and non-avoiders initially displayed comparable nicotine intake (**Figure 1F**) and percent consumption (**Figure 1—figure supplement 1B**) at this concentration. We hypothesized that if avoiders increased their percent nicotine consumption at the 200–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transition, this would indicate a rapid adjustment to the concentration proposed, in order to maintain their level of intake constant. In contrast, if avoiders maintained a steady, low percent nicotine consumption, this would indicate that nicotine aversion persists, regardless of the dose. Indeed, we found that lowering nicotine concentration from 200 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ did not increase percent nicotine consumption in avoiders (**Figure 2D**), at least for the 4 days that mice were subjected to this concentration. We then performed a complementary experiment, in which mice were directly subjected to a high concentration of nicotine (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), followed by 8 days at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. We found that, overall, mice avoided the 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicotine solution, and that the following increase in nicotine preference was gradual at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Figure 2—figure supplement 1C**). This slow adjustment to a lower-dose contrasts with the rapid (within a day) change in intake observed when nicotine concentration increases (see for instance **Figure 1—figure supplement 1A**). If we look at individuals, we observe that half of the mice (6/13) retained a steady, low nicotine preference (<20%) throughout the 8 days at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Figure 2—figure supplement 1C**), which is similar to what was observed for avoiders in **Figure 2D**. Taken together, these results suggest that some mice, the non-avoiders, rapidly adjust their intake to adapt to changes in nicotine concentration in the bottle. In contrast, for avoiders, aversion to nicotine may involve a learning mechanism that, once triggered, results in prolonged cessation of nicotine consumption.

Nicotine consumption negatively correlated with the amplitude of nicotine-evoked currents in the IPN

We then investigated the neural correlates of this nicotine aversion. We hypothesized that the IPN, which has been implicated in nicotine aversion and in negative affective states (**Fowler and Kenny, 2014; McLaughlin et al., 2017; Molas et al., 2017; Wills et al., 2022**), might be activated differently by nicotine in avoiders and non-avoiders. Therefore, we used whole-cell patch-clamp recordings in brain slices to assess, at completion of the two-bottle choice task, the functional expression level of nAChRs in IPN neurons. We recorded neurons from the rostral IPN (IPR), because these neurons have high nAChR density (**Hsu et al., 2013; Morton et al., 2018; Quina et al., 2017; Wolfman et al., 2018**). To record nicotine-evoked currents, we used a local puff application of nicotine at a concentration (30 μM) close to the EC50 for heteromeric nAChRs (**Fenster et al., 1997**). We found that the amplitude of nicotine-evoked currents was higher in IPN neurons of avoider mice than in those from non-avoiders (**Figure 2E**). Specifically, there was a negative correlation between the average amplitude of nicotine-evoked current in IPN neurons, and nicotine consumption (measured over the last 24 hr prior to the patch-clamp recording, **Figure 2F**). Because there are many types of neurons in the IPN (**Ables et al., 2017**) with heterogeneous responses to nicotine (**Figure 2E**), we verified that there was no anatomical sampling bias between the two groups (**Figure 2—figure supplement 1D**). We also found that there was no relationship between the amplitude of nicotine-induced current and the anatomical localization of the neurons (**Figure 2—figure supplement 1E**). These results indicate that nicotine consumption in mice is negatively linked to the amplitude of the nicotine response in IPN neurons.

Chronic nicotine treatment alters both nicotinic signaling in the IPN and nicotine consumption

It is still unclear at this stage whether chronic nicotine exposure progressively alters the response of IPN neurons to the drug (non-avoiders being further exposed to high nicotine doses than avoiders) or whether intrinsic differences pre-exist in avoiders and non-avoiders. To determine the effect of chronic nicotine exposure on nAChR current levels in IPN neurons, we passively and continuously exposed mice to nicotine for 4 weeks, using subcutaneously implanted osmotic minipumps. The concentration of nicotine in the minipump (10 mg/kg/day) was chosen to match the average voluntary nicotine

intake in the two-bottle choice task (**Figure 1C**). We then recorded from acute brain slices and found that indeed, prolonged exposure to nicotine reduced the amplitude of nicotine-evoked currents in the IPN of these mice compared to control mice treated with saline (**Figure 3A**; no anatomical sampling bias between the two groups, see **Figure 3—figure supplement 1A**). These results are consistent with the reduced current amplitudes observed in mice that underwent the two-bottle choice task, compared to naive mice in their home cage (**Figure 3—figure supplement 1B**).

Because IPN neurons are mostly silent in brain slices, and in order to preserve the entire circuitry intact, we decided to perform juxtacellular recordings of IPN neurons *in vivo*, and to characterize their response (expressed in % of variation from baseline) to an intravenous (i.v.) injection of nicotine (30 µg/kg). To the best of our knowledge, no description of *in vivo* recordings of IPN neurons, and thus no criteria for identification, have been reported as yet, so we solely considered for analysis neurons that were labelled *in vivo* with neurobiotin and confirmed to be within the IPN. We found that nicotine i.v. injections in naive WT mice induce an increase in the firing rate of IPN neurons compared with saline injection, and that this acute effect of nicotine was reduced after the prolonged (4 weeks) passive exposure of the mice to the drug (**Figure 3B**). The anatomical distribution of recorded neurons was similar between the two groups (**Figure 3—figure supplement 1C**), indicating that the effect of chronic nicotine is unlikely to be due to sampling variability. There was a correlation in both groups between the response to nicotine and the mediolateral (ML), but not the dorso-ventral (DV) coordinates of the neurons (**Figure 3—figure supplement 1D**). Regarding the spontaneous activity of IPN neurons, we found no correlation with their anatomical localization (**Figure 3—figure supplement 1E**), nor any effect of chronic nicotine exposure (**Figure 3—figure supplement 1F**). In both nicotine- and saline-treated animals, the amplitude of the response to nicotine was positively correlated with spontaneous activity: neurons with high basal activity responded to nicotine with a greater change in firing frequency (**Figure 3—figure supplement 1G**). Some IPN neurons responded to nicotine by decreasing their firing rate and, as with nicotine-activated neurons, the response was of smaller amplitude in the chronic nicotine-exposed group (**Figure 3—figure supplement 1H**). Together, these *ex vivo* and *in vivo* recordings demonstrate that prolonged exposure to nicotine markedly reduces the amplitude of the drug response in mouse IPN neurons.

To verify the hypothesis that altered cholinergic activity in IPN neurons impacts nicotine aversion, we performed a series of experiments. First, we evaluated the consequence of prolonged nicotine exposure on nicotine consumption. Mice were implanted with an osmotic minipump to passively deliver nicotine and, after 20 days, were subjected to a modified two-bottle task that involved a direct exposure to a high concentration of nicotine (100 µg/ml, **Figure 3C**). We chose this protocol to avoid the confounding effects of a gradual exposure to nicotine, and to evoke strong aversion in the mice. We found that mice pretreated with saline (controls) avoided nicotine (**Figure 3C**), which may indicate aversion to such high nicotine concentration. In contrast, mice pretreated with nicotine did not avoid nicotine, suggesting that they may have developed a tolerance for the aversive effects of the drug. Looking at the data day by day, we observed that control mice abruptly decreased their percent consumption when nicotine was introduced, while for nicotine-treated animals, the decrease was more gradual over the course of the 4 days (**Figure 3—figure supplement 1I**). Overall, nicotine consumption was greater in the nicotine-treated group than in the saline-treated group (**Figure 3C**). Focusing on individuals, we observed that a single saline-pretreated mouse (1/23) increased its percent consumption when nicotine was introduced in the task, while the vast majority of the mice actively avoided nicotine (close to the 0% Nicotine apex). In contrast, a marked proportion of the mice treated with nicotine (8/25) increased their percent consumption when nicotine was introduced (**Figure 3D** p -value = 0.037 Chi-squared). The two groups were identical in the water/water session (**Figure 3E**, top). However, in the water/nicotine session, mice pretreated with nicotine showed a greater distance from the 0% nicotine consumption apex, and a shorter distance from the 100% nicotine consumption apex than mice pretreated with saline (**Figure 3E**, bottom), indicating decreased aversion and increased preference for nicotine in the nicotine-pretreated group. Overall, these electrophysiological and behavioral data demonstrate that prolonged exposure to nicotine both decreases nicotine efficacy in the IPN, and also decreases aversion to nicotine in individuals, leading to increased drug use. However, chronic nicotine may produce adaptations in other brain circuits, and it remains to be demonstrated whether the neurophysiological changes observed in the IPN are causally related to the variations in aversion sensitivity.

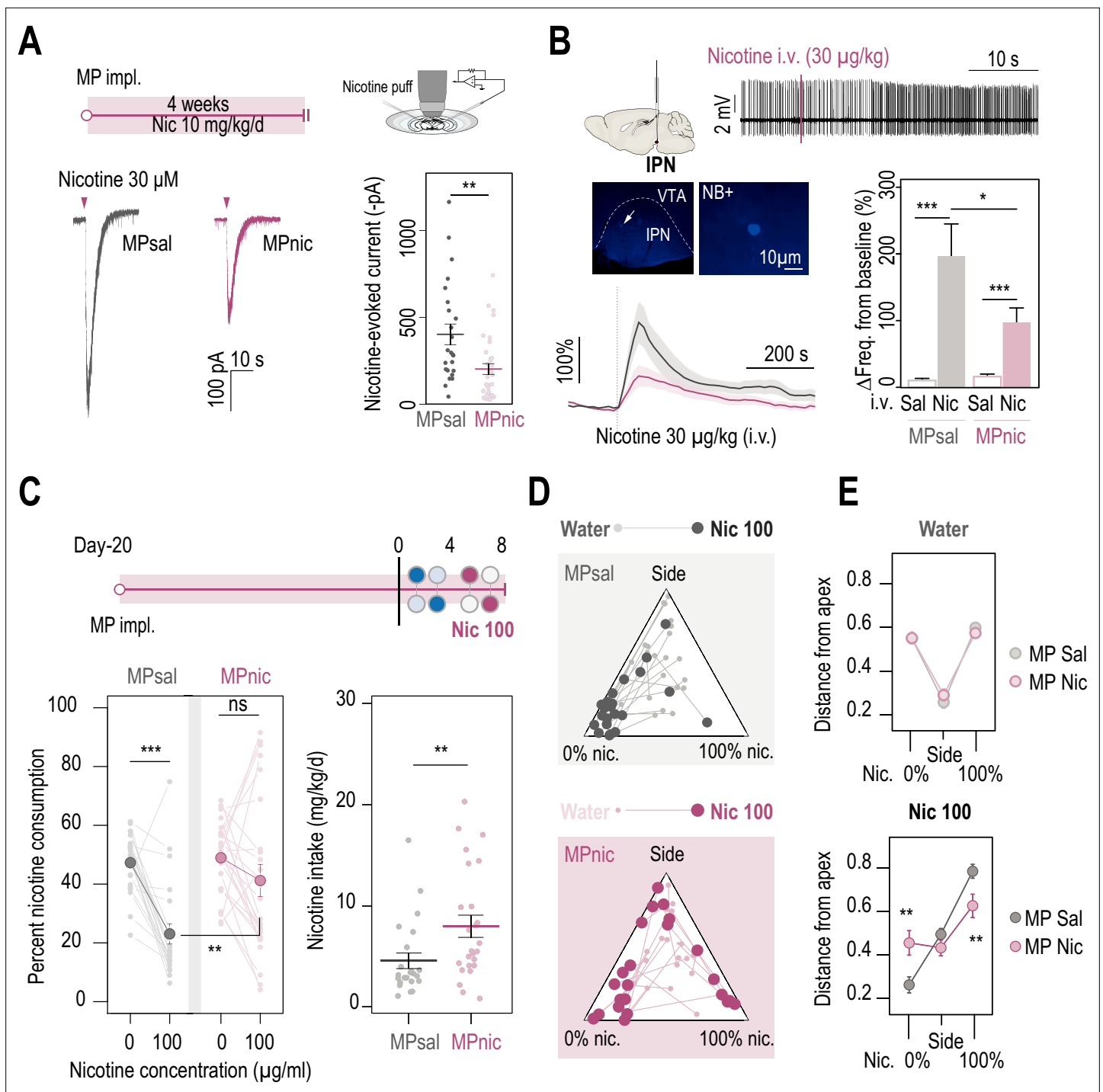


Figure 3. Chronic nicotine treatment altered both nAChR expression levels in the IPN and nicotine intake in WT mice. **(A)** Top, passive nicotine treatment protocol. Mice were implanted subcutaneously with an osmotic minipump (MP) that continuously delivers 10 mg/kg/day of nicotine. After 4 weeks of treatment, nicotine-evoked responses in IPN neurons were recorded in whole-cell voltage-clamp mode (-60 mV) from IPN slices. Bottom, representative recordings (left) and average current amplitudes (right) following a puff application of nicotine (30 μ M, 200 ms) in IPN neurons of mice treated with either saline ($n=24$ neurons from 3 mice, $I = -401 \pm 59$ pA) or nicotine ($n=34$ neurons from 4 mice, $I = -202 \pm 37$ pA). Nicotine treatment reduced the amplitude of nicotine-evoked currents in IPN neurons (Mann-Whitney test, $p=0.001$). **(B)** In vivo juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in IPN neurons of saline- and nicotine-treated animals. Top, representative electrophysiological recording of an IPN neuron, during an i.v. injection of nicotine (30 μ g/kg). Middle, post-recording identification of neurobiotin-labeled IPN neurons by immunofluorescence. Bottom, average time course and average amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline and nicotine (30 μ g/kg), for IPN neurons from saline- and nicotine-treated mice. Right, firing rate variation from baseline induced by nicotine or saline injection in IPN neurons from saline- ($n=12$ Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

neurons from 6 mice) or nicotine-treated animals (n=20 neurons from 13 mice). Responses were decreased by chronic exposure to nicotine ($p=0.035$, Mann-Whitney test). All neurons were confirmed to be located within the IPN using juxtacellular labeling with neurobiotin. (C) Top, modified two-bottle choice protocol used to evaluate the impact of a long-term exposure to nicotine on drug intake. Mice were implanted subcutaneously with a minipump that delivered 10 mg/kg/day of nicotine continuously, for 20 days before performing the modified two-bottle choice task. After 4 days of water vs. water habituation, mice were directly exposed to a high concentration of nicotine (100 $\mu\text{g/ml}$). Bottom, percent nicotine consumption and nicotine intake at 0 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of nicotine, for mice under a chronic treatment of nicotine or saline. The saline-treated group displayed a decrease in percent nicotine consumption (n=23, from $47.3\pm 2.0\%$ – $23.0\pm 3.4\%$, $p=1.7\text{e-}05$, Mann-Whitney paired test), but not the nicotine-treated group (n=25, from 48.9 ± 2.4 to $41.2\pm 5.5\%$, $p=0.16$, Mann-Whitney paired test). Overall, the saline-treated group displayed a lower percent nicotine consumption ($p=0.003$, Mann-Whitney) and lower nicotine intake than the nicotine-treated group ($p=0.004$, Mann-Whitney). (D) Pseudo-ternary diagrams representing each saline- and nicotine-treated mouse for its nicotine consumption index over its side bias index. Small dots correspond to the habituation period (water vs. water) and bigger dots to the condition with 100 $\mu\text{g/ml}$ of nicotine in one bottle. (E) Average distance from each apex in the water vs. water (top) and water vs. nicotine 100 $\mu\text{g/ml}$ conditions (bottom). Saline-treated, but not nicotine-treated mice developed a strategy to avoid nicotine ($p_{\text{Side}} = 0.013$, $p_{\text{Nic}} = 0.27$, $p_{\text{Nic}}=0.013$, Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction). In all figure panels, nicotine-treated animals are displayed in red and saline-treated (control) animals in grey.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 3:

Source data 1. Source data for **Figure 3**.

Figure supplement 1. Physiological and behavioral adaptations following chronic nicotine treatment.

Nicotine avoidance involves $\beta 4$ -containing nAChRs

We turned to mutant mice deleted for the gene encoding the $\beta 4$ nAChR subunit (*Chrn4*^{-/-} mice), because of the strong and restricted expression of this subunit in the MHb-IPN pathway (Grady et al., 2009; Harrington et al., 2016; Shih et al., 2014). The *Chrn4*-Cre transgenic mouse (RRID:MMR-RC_036203-UCD, Gene Expression Nervous System Atlas [GENSAT]), which expresses the enzyme Cre-recombinase under the *Chrn4* promoter, revealed that the $\beta 4$ subunit was distributed mostly in the rostral part of the IPN (IPR) and in its ventral and central parts (IPC), both of which receive cholinergic inputs from the MHb (Heintz, 2004). We found that *Chrn4*^{-/-} mice displayed both greater percent nicotine consumption and nicotine intake than WT animals, with minimal concentration-dependent change in percent nicotine consumption (Figure 4A). With respect to individuals, we observed both active and passive nicotine-drinking profiles in *Chrn4*^{-/-} mice, as observed in WT mice. Strikingly, however, none of the *Chrn4*^{-/-} mice (0/13) showed aversion-like behavior at high nicotine concentration, which contrasts with the high proportion of avoiders in WT animals (17/35, Figure 4B, Figure 4—figure supplement 1A, $P=0.04$ Pearson's Chi squared with Yates' continuity correction). Avoidance to quinine was similar in WT and *Chrn4*^{-/-} mice (Figure 4—figure supplement 1B), further suggesting that avoidance to nicotine is not linked to different sensitivities to the bitterness of nicotine. WT mice showed a strong nicotine concentration-dependent adaptation in their behavior, while *Chrn4*^{-/-} mice had a more consistent behavior throughout the task (Figure 4C and Figure 4—figure supplement 1C and D).

To verify that responses to nicotine were affected in IPN neurons of *Chrn4*^{-/-} mice, we first performed whole-cell patch-clamp recordings. We found that the amplitude of nicotine-evoked currents in the IPN was on average three-fold lower in *Chrn4*^{-/-} than in WT mice (Figure 4D), confirming that $\beta 4$ -containing ($\beta 4^*$) nAChRs are the major receptor subtype in the rostral IPN. Anatomical sampling was slightly different between the two groups in the mediolateral axis (Figure 4—figure supplement 2A). However, this should not affect the interpretation of the results, as there was no relationship between the mediolateral position and the response to nicotine (Figure 2—figure supplement 1E). We also found that prolonged nicotine treatment had no significant effect on the amplitude of nAChR currents in these knock-out mice (Figure 4D), suggesting that the downregulation observed after chronic nicotine treatment in the IPN of WT mice mainly affects $\beta 4^*$ nAChRs (and not other subtypes such as $\beta 2^*$ nAChRs for instance).

We then used in vivo juxtacellular recordings, to assess the role of $\beta 4^*$ nAChRs in the response to nicotine in the intact brain. Nicotine i.v. injections (30 $\mu\text{g/kg}$) resulted in an increase in IPN neuron activity (Figure 4E), that was larger in WT mice than in *Chrn4*^{-/-} mice, further demonstrating the important role of $\beta 4^*$ nAChRs in the response of the IPN to nicotine. Anatomical repartition of the recorded neurons was similar between the two groups in the medio-lateral (ML) but not in the dorso-ventral (DV) axis (Figure 4—figure supplement 2B). However, there was no correlation between the

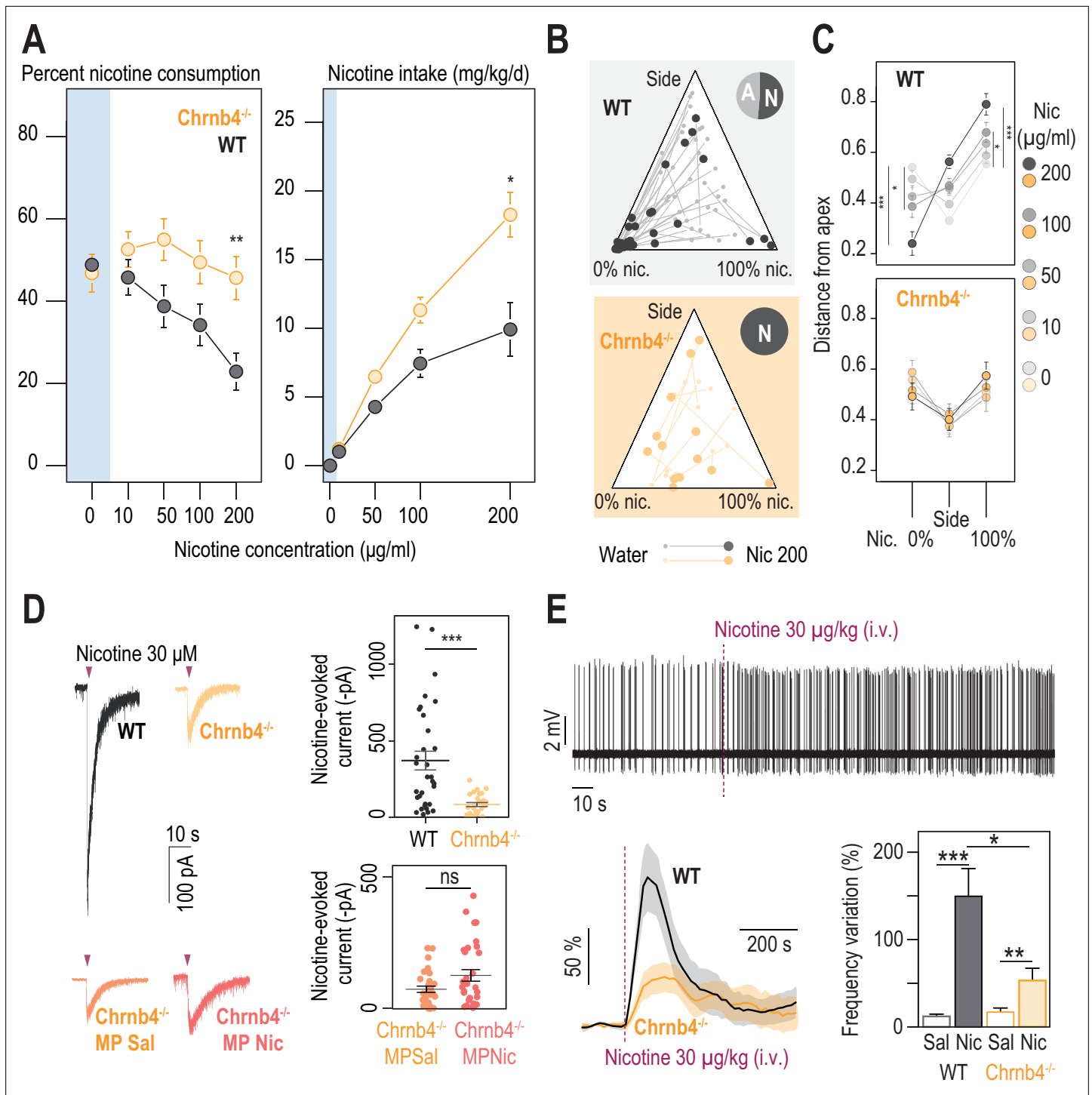


Figure 4. β_4 -containing nicotinic receptors are essential for triggering nicotine aversion in mice. **(A)** Left, average percent nicotine consumption in WT and *Chrnb4*^{-/-} mice for each concentration of nicotine in the two-bottle choice task. WT mice had lower percent nicotine consumption than *Chrnb4*^{-/-} mice (Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction). WT mice decreased their percent nicotine consumption throughout the task (Friedman test, $n=35$, $df = 4$, $p<0.001$ and Mann-Whitney post-hoc test with Holm-Bonferroni correction) while *Chrnb4*^{-/-} mice displayed a stable percent nicotine consumption (Friedman test, $n=13$, $df = 4$, $p=0.11$). Right, average nicotine intake (mg/kg/day) in *Chrnb4*^{-/-} and WT mice for the different concentrations of nicotine (Friedman test, $n=35$, $df = 3$, $p<0.001$ and Mann-Whitney post-hoc test with Holm-Bonferroni correction). *Chrnb4*^{-/-} mice consumed more nicotine than WT mice (Mann-Whitney test). **(B)** Ternary diagram representing each WT and *Chrnb4*^{-/-} individual for its nicotine consumption index over its side bias index. Small dots correspond to the habituation period (water vs. water) and bigger dots to the condition with 200 μg/ml of nicotine in one bottle. Inserts: pie charts illustrating the proportion of avoiders (A, light grey) and non-avoiders (N, dark grey) for each genotype at the end

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

of the task. Note the absence of avoiders in *Chrn4*^{-/-} mice. (C) Average distance from each apex at 0, 10, 50, 100, and 200 µg/ml of nicotine (paired Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction, p(Sacc 0–200)=0.0002, p(Sacc 0–100)=0.03; p(Nic 0–200)=0.0002, p(Sacc 0–100)=0.03). (D) Left, representative currents following a puff application of nicotine (30 µM, 200ms) in IPN neurons from naïve WT and *Chrn4*^{-/-} mice, or from saline-treated (orange) and nicotine-treated (dark orange) *Chrn4*^{-/-} mice. Right, average nicotine-evoked currents recorded in IPN neurons from naïve WT (n=32 neurons from 5 mice, I = -370±61 pA) and *Chrn4*^{-/-} (n=27 neurons from 4 mice, I = -83±13 pA) mice, and from *Chrn4*^{-/-} chronically treated with either saline (Sal, n=30 neurons from 6 mice, I = -72±11 pA) or nicotine (Nic, n=31 neurons from 5 mice, I = -123±21 pA). *Chrn4*^{-/-} mice presented a large decrease in nicotine-evoked currents (Mann-Whitney test, p=4e-05). Nicotine treatment did not alter nicotine-evoked currents in IPN neurons of *Chrn4*^{-/-} mice (Mann-Whitney test, p=0.15). (E) Juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in IPN neurons of naïve WT and *Chrn4*^{-/-} mice. Top, representative recording in *Chrn4*^{-/-} mice. Bottom left, average nicotine-evoked responses at 30 µg/kg of nicotine in IPN neurons from WT and *Chrn4*^{-/-} mice. Bottom right, average amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline and nicotine (30 µg/kg), for IPN neurons from WT (n=18 neurons from 14 mice) and *Chrn4*^{-/-} (n=10 neurons from 8 mice) mice. Nicotine-induced responses were smaller in *Chrn4*^{-/-} than in WT mice (p=0.04, Mann Whitney test). All recorded neurons were neurobiotin-labelled and confirmed to be within the IPN. In all figure panels WT animals are depicted in grey and *Chrn4*^{-/-} mice in yellow. *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 4:

Source data 1. Source data for **Figure 4**.

Figure supplement 1. Behavioral differences between WT and *Chrn4*^{-/-} mice.

Figure supplement 2. Electrophysiological differences between WT and *Chrn4*^{-/-} mice.

anatomical coordinates of the neurons (whether DV or ML) and their nicotine response (**Figure 4—figure supplement 2C**), allowing us to compare the two groups. Overall, IPN neurons of WT and *Chrn4*^{-/-} mice had similar spontaneous frequencies (**Figure 4—figure supplement 2D and E**), suggesting that β4*nAChRs play little role in regulating the excitability of IPN neurons in anesthetized mice. The amplitude of the nicotine response was positively correlated with the basal firing rate of the neurons for *Chrn4*^{-/-} mice (**Figure 4—figure supplement 2F**), confirming what we observed with WT mice equipped with saline or nicotine minipumps (**Figure 3—figure supplement 1G**). In both WT and *Chrn4*^{-/-} mice, we observed a population of neurons that decreased their firing rate, but with no difference in response amplitude between the two genotypes (**Figure 4—figure supplement 2G**), suggesting that β4*nAChR are mainly involved in increasing, not decreasing, neuronal activity in response to nicotine injection. Collectively, our results in *Chrn4*^{-/-} mice demonstrate the key role of the β4 nAChR subunit in signaling aversion to nicotine, and its predominant function in the activation of the IPN by nicotine.

β4*nAChRs of the IPN are critically involved in nicotine aversion

β4*nAChRs are enriched in the IPN, yet they are also expressed to some extent in other brain regions. Hence, to directly implicate IPN β4*nAChRs in nicotine aversion, and more generally in nicotine consumption, we targeted re-expression of β4 in the IPN specifically, using lentiviral vectors in *Chrn4*^{-/-} mice (KO-β4^{IPN} mice, **Figure 5A**). Mice transduced with eGFP (KO-GFP^{IPN} mice) were used as controls. Proper transduction in the IPN was verified using immunohistochemistry after completion of the two-bottle choice task (**Figure 5A**), and mice with expression of GFP in the VTA were excluded from analyses. Transduction of β4, but not of GFP alone, in the IPN increased the amplitude of nicotine-evoked currents (**Figure 5B**) and restored levels found in WT animals (U test, p=0.6, **Figure 5—figure supplement 1A**). Transduction of β4 in the IPN also restored the response to nicotine in vivo (**Figure 5C**). We compared nicotine intake in the two groups of mice in the two-bottle choice task. We found that re-expression of β4 in the IPN of *Chrn4*^{-/-} mice decreased nicotine intake compared to the group of mice transduced with eGFP in the IPN (**Figure 5D**). Overall, nicotine intake was similar in WT and in KO-β4^{IPN} animals (p>0.5 for all concentrations), demonstrating the causal role of β4 nAChRs of IPN neurons in nicotine consumption behaviors. At the individual level, the proportion mice that avoided nicotine at 200 µg/kg was very low for KO-GFP^{IPN} control mice (2/18), but greater for KO-β4^{IPN} mice (8/17, **Figure 5E**, p=0.04 Chi squared). The behavior of KO-GFP^{IPN} was steady throughout the task, whereas it was highly nicotine concentration-dependent for KO-β4^{IPN} mice (**Figure 5F and Figure 5—figure supplement 1B and C**), as already observed with WT mice. Mice with strong percent nicotine consumption were only found in the KO-GFP^{IPN} control group. Collectively, these results show that selective re-expression of β4 in the IPN of *Chrn4*^{-/-} mice rescued aversion for nicotine, and highlight

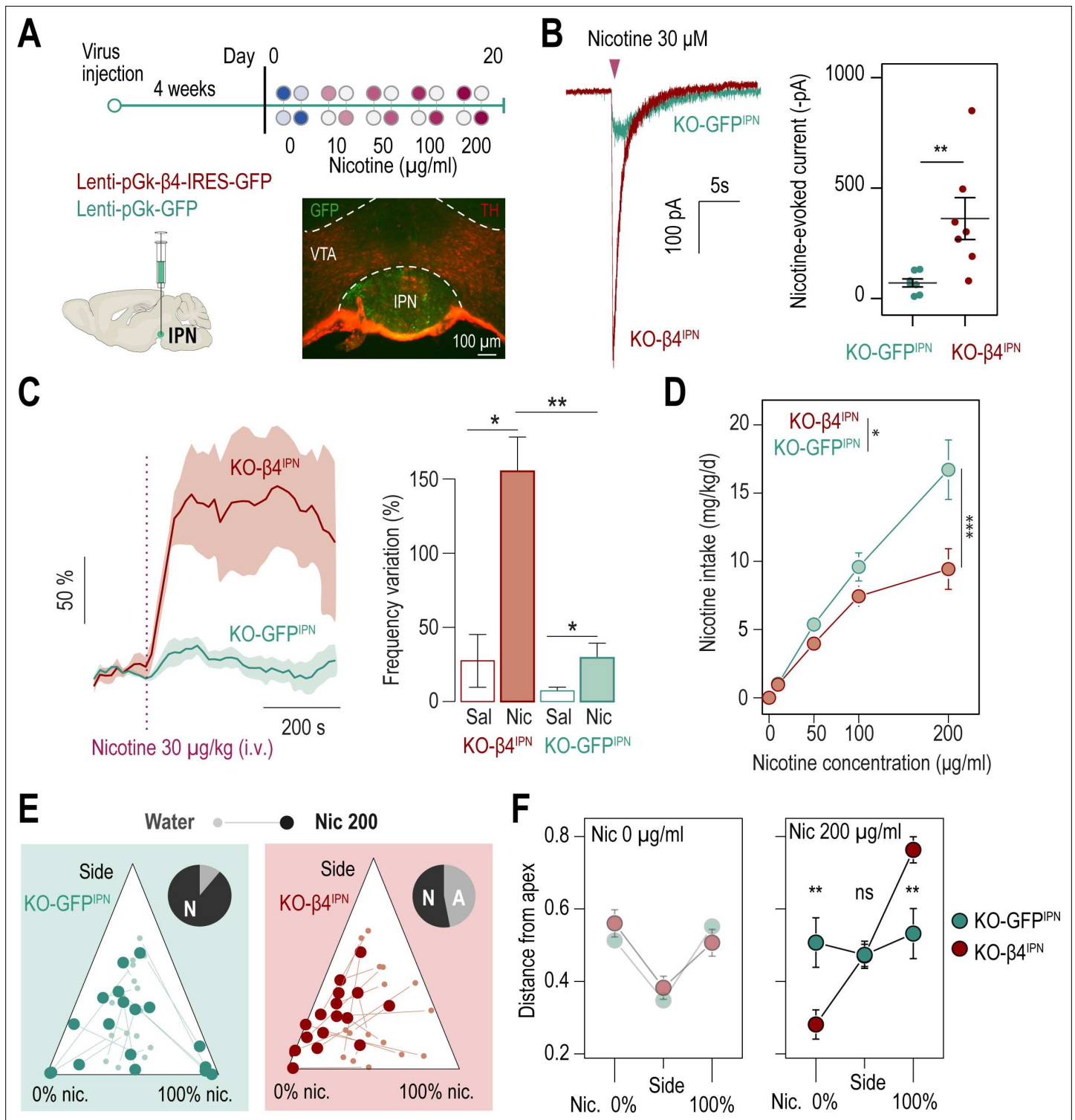


Figure 5. β4-containing nAChRs of the IPN are involved in the control of nicotine consumption and in aversion to nicotine in mice. **(A)** Protocol: stereotaxic transduction of the β4 subunit together with GFP (or GFP alone in control mice) in the IPN of *Chrb4*^{-/-} mice, and subsequent two-bottle choice task. Bottom right: coronal section highlighting proper viral transduction of lenti-pGK-β4-IRES-GFP in the IPN. **(B)** Validation of the re-expression strategy using whole-cell patch-clamp recordings. Representative currents and average responses following a puff application of nicotine (30 µM, 200ms) on IPN neurons from *Chrb4*^{-/-} mice transduced in the IPN with either lenti-pGK-β4-IRES-GFP (KO-β4^{IPN}, n=7 neurons from 2 mice, I = -362±95 pA) or lenti-pGK-GFP (KO-GFP^{IPN}, n=7 neurons from 1 mouse, I = -71±18 pA; Mann-Whitney test, p=0.004). **(C)** Juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in IPN neurons of naive *Chrb4*^{-/-} mice transduced with either GFP (KO-GFP^{IPN}) or β4 in the IPN (KO-β4^{IPN}). Left, average nicotine-evoked

Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

responses at 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of nicotine in IPN neurons from KO-GFP^{IPN} and KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ mice. Right, average amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline or nicotine (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), for IPN neurons of KO-GFP^{IPN} (n=7 neurons from 4 mice) and KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ mice (n=5 neurons from 3 mice). Nicotine-evoked responses were larger in KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ than KO-GFP^{IPN} mice ($p=0.005$, Mann-Whitney test). (D) Average nicotine intake was lower in KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ than in KO-GFP^{IPN} (two-way repeated measure; ANOVA: genotype \times dose interaction, $F(3, 99)=6.3$, $***p<0.001$; main effect of dose, $F(3, 99)=69.1$, $***p<0.001$, effect of genotype, $F(1, 33)=6.637$, $*p=0.015$). (E) Ternary diagram representing each *Chrb4*^{-/-} mouse, transduced with either $\beta 4$ or GFP, and illustrating its nicotine consumption index over its side bias index. Small dots correspond to the habituation period (water vs. water) and bigger dots to the condition with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine in one bottle. Inserts: pie charts illustrating the proportion of avoiders (A, light grey) and non-avoiders (N, dark grey) for each condition at the end of the task. (F) Average distance from each apex during the two-bottle choice task at 0 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine, for KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ and KO-GFP^{IPN} mice ($p_{\text{Sacc}} = 0.007$, $p_{\text{Nic}} = 0.008$, Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction). In all figure panels KO- $\beta 4^{\text{IPN}}$ mice are depicted in red and KO-GFP^{IPN} mice (controls) in green. $***p<0.001$, $**p<0.01$, $*p<0.05$.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 5:

Source data 1. Source data for **Figure 5**.

Figure supplement 1. Viral rescue of $\beta 4$ nAChR subunit expression in the IPN of *Chrb4*^{-/-} mice.

the specific role of IPN $\beta 4$ *nAChRs in signaling aversion to nicotine, and in the control of nicotine intake.

Discussion

We used a two-bottle choice paradigm to assess inter-individual differences in nicotine consumption in mice, and to evaluate how pre-exposure to nicotine modifies drug taking. In this paradigm, mice are given free access to two bottles, only one of which contains nicotine, and allowed to choose which one they drink. Because it does not involve active lever pressing, this method cannot provide as much information as intravenous self-administration about the reinforcing effects of the drug. Yet it remains a simple and classical test to measure the animal's preference (or lack thereof) for the drug, while minimizing stress from handling (Collins et al., 2012). In this test, WT mice showed on average no real preference for the nicotine-containing bottle at any of the concentrations tested, as is typically observed (Matta et al., 2006). However, it should be noted that, at the individual level, some mice actively tracked the nicotine-containing bottle and showed effective preference. On average, WT mice titrate to a nicotine dose of approximately 10 mg/kg/day, consistent with previous reports (Antolin-Fontes et al., 2020; Fowler et al., 2011; Tuesta et al., 2017), while mutant mice lacking the $\beta 4$ nAChR subunit did not, resulting in greater nicotine intake, notably at high nicotine concentrations. These results are consistent with the greater intracranial self-administration observed at high nicotine doses in these knock-out mice (Husson et al., 2020). Conversely, they are also consistent with the results obtained with transgenic TABAC mice overexpressing the $\beta 4$ subunit at endogenous sites, which avoid nicotine and consequently consume very little (Frahm et al., 2011). Nevertheless, it should be noted that conflicting results have also been reported regarding the role of $\beta 4$ nAChRs in nicotine consumption. Notably, another study reported that *Chrb4*^{-/-} mice exhibit lower intravenous self-administration of nicotine, even though their VTA is more sensitive to nicotine (Harrington et al., 2016). Conversely, self-administration is higher in TABAC mice despite reduced activation of the VTA by nicotine (Gallego et al., 2012). The increased consumption at high nicotine concentration reported here for *Chrb4*^{-/-} mice resembles what was observed in mutant mice either lacking the $\alpha 5$ subunit (Fowler et al., 2011) or with low levels of the $\alpha 3$ subunit (Elayouby et al., 2021), likely because the $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\beta 4$ nAChR subunits, which are encoded by the same gene cluster, co-assemble in brain structures, notably the MHB-IPN pathway, to produce functional heteromeric nAChRs.

It is increasingly acknowledged that in mice, as in humans, there is a substantial variability in the susceptibility for developing drug use disorders (Deroche-Gamonet et al., 2004; Dongelmans et al., 2021; Garcia-Rivas et al., 2017; Juarez et al., 2017; Nesil et al., 2011; Piazza et al., 1989; Siciliano et al., 2019). Yet, it is still unclear why some individuals are more susceptible than others to become regular users. We discovered important inter-individual differences in nicotine vulnerability: about half of the WT mice, the avoiders, durably quit nicotine at a certain concentration, whereas the other half, the non-avoiders, continued consumption even at high concentration of nicotine, classically described as aversive (Fowler et al., 2011). Avoiders displayed variable concentration thresholds required for triggering aversion, and some even developed aversion at the beginning of the two-bottle choice

task, when nicotine concentrations were still low. The nicotine concentration threshold required to trigger aversion differed among avoiders, and was likely not reached in non-avoiders and *Chrn4*^{-/-} mice. We conducted experiments with adult male mice only, so it remains an open question whether nicotine aversion varies with sex and age. Importantly, very few mice showed what might be considered titration (plateau consumption), emphasizing the needs to consider individual, as opposed to group, behavior in addiction research.

We also found that the functional expression level of β 4-containing nAChRs in the IPN underlies these different sensitivities to the aversive properties of nicotine. Indeed, nicotine aversion was nearly eliminated in *Chrn4*^{-/-} mice, none of which quit drinking nicotine, and was restored after selective re-expression of the β 4 subunit in the IPN. This local re-expression experiment, together with the absence of correlation between nicotine and quinine aversion, discards the possibility that different sensitivities to the bitter taste of nicotine solutions explain the different drinking profiles of avoiders and non-avoiders. We observed a negative correlation between nicotine consumption and the response of the IPN to the drug: mice consuming large amounts of nicotine displayed lower nicotine-evoked currents in the IPN than mice consuming small amounts of nicotine. Accordingly, *Chrn4*^{-/-} mice and nicotine-treated WT mice, both of which display reduced responses to nicotine, consume greater amounts of the drug. It should be noted that there is a variety of neuronal types in the IPN (Ables et al., 2017; García-Guillén et al., 2021) and our electrophysiological recordings did not address this genetic diversity. That said, we sampled similar populations of neurons across groups, and found little evidence of a relationship between anatomical localization and response to nicotine, allowing for comparisons across conditions. We also found that nAChRs that contain the β 4 subunit represent the vast majority of nicotinic receptors in the IPN. Taken together, these results indicate that the expression level of β 4-containing nAChRs in the IPN may determine the level of aversion to the drug, and consequently its intake.

We suggest that β 4-containing nAChRs, by engaging the IPN circuitry, initiate a primary response to nicotine that, if above a certain threshold, will trigger acute aversion to the drug, impacting the balance between drug reward and aversion to limit drug consumption. Consistent with this, pharmacological or optogenetic stimulation of the MHB-IPN pathway directly produces aversion (Morton et al., 2018; Tuesta et al., 2017; Wolfman et al., 2018), while pharmacological inactivation of this pathway increases nicotine intake (Fowler et al., 2011). We further found that aversion to nicotine is not just an acute adaptation to the dose, but can last for days. This is consistent with findings in humans, where an initial unpleasant reaction to cigarettes is associated with a reduced likelihood of continued smoking (DiFranza et al., 2004). Such a sustained aversive reaction to nicotine was conditioned, in mice, by nicotine itself, and required β 4-containing nAChRs of the IPN for its onset, but most likely involves other brain circuits for its long-term persistence. Identifying the molecular and cellular mechanism of long-term aversion to nicotine in mice will be instrumental to progress in our understanding of human dependence to tobacco.

We did not observe major differences in nicotine intake between avoiders and non-avoiders at the beginning of the two-bottle choice experiment, for low concentrations of nicotine (<100 μ g/ml), but we cannot completely rule out pre-existing inter-individual differences that could explain the opposite trajectories taken by the two groups. Indeed, the mice used in this study were isogenic, yet epigenetic changes during development or differences in social status, which are known to affect brain circuits and individual traits (Torquet et al., 2018), may affect the responses of the IPN to nicotine. It is indeed tempting to speculate that external factors (e.g. stress, social interactions...) that would affect either the expression level of β 4-containing nAChRs in the IPN or the availability of nicotine in the brain (through different metabolic activities for instance), will have a strong impact on nicotine consumption. In addition to pre-existing differences, history of nicotine use could produce long-lasting molecular and cellular adaptations in the IPN circuitry and consequently alter nicotine aversion and consumption. Indeed, we discovered that prolonged nicotine exposure downregulated and/or desensitized β 4-containing nAChRs of the IPN, as evidenced by the decreased response to nicotine both ex vivo and in vivo, and the absence of effect in *Chrn4*^{-/-} mice.

This observed functional downregulation of nAChR currents contrasts with previous findings. Chronic nicotine was shown to cause functional upregulation of nicotinic currents in MHB neurons of mice (Arvin et al., 2019; Banala et al., 2018; Pang et al., 2016; Shih et al., 2015; Jin et al., 2020) and rats (Jin et al., 2020), as well as in IPN neurons of mice (Zhao-Shea et al., 2013) and rats (Tapia

et al., 2022). However, it should be noted that upregulation is highly cell-type as well as receptor-subtype dependent (*Nashmi et al., 2007; Shih et al., 2015; Zhao-Shea et al., 2013*). For instance, in the mouse IPN, functional upregulation was shown only in SST-positive neurons, which constitute a small fraction of IPN neurons, and no increase in $\beta 4$ subunit expression was reported in SST-negative neurons (*Shih et al., 2015*). Moreover, in cell culture, it was found that $\beta 2$ -, but not $\beta 4$ -containing nAChRs were upregulated after nicotine treatment (*Wang et al., 1998*), which agrees with our findings. Upregulation is likely due to an increase in receptor number (*Banala et al., 2018*), yet it can be masked by receptor desensitization, which occurs during prolonged nicotine treatment. In some of the reports of nicotine-induced upregulation, currents were recorded only after nicotine withdrawal (*Pang et al., 2016*), leaving enough time for the receptors to recover from desensitization. Here, we recorded responses to nicotine *in vivo*, while nicotine was still present, and found that they were reduced in amplitude, which fits with the downregulation we observed in slices. Furthermore, our behavioral data in nicotine-treated WT and *Chrn4*^{-/-} mice are in complete agreement: both displayed reduced responses to nicotine (ex vivo and in vivo) in IPN neurons, as well as increased nicotine intake compared to naive, WT animals.

We suggest that long-term exposure to nicotine decreases the likelihood to reach the threshold at which mice develop aversion to the drug, which ultimately leads to increased drug consumption. In other words, nicotine intake history weakens the ability of nicotine to induce aversion in mice. In most nicotine replacement therapies, such as gums or patches, nicotine is slowly administered over prolonged periods of time, ostensibly to mitigate negative emotional reactions elicited by nicotine withdrawal (*Hartmann-Boyce et al., 2018*). However, our data indicate that mice under prolonged nicotine administration will also develop tolerance to the aversive effects of nicotine, underscoring the necessity to develop alternative medical approaches.

Materials and methods

Animals

Eight- to sixteen-week-old wild-type C57BL/6 J (Janvier labs, France) and *Chrn4* knock-out (*Chrn4*^{-/-}) male mice (Pasteur Institute, Paris) (*Xu et al., 1999*) were used for this study. *Chrn4*^{-/-} mice were backcrossed onto C57BL/6 J background for more than twenty generations. Mice were maintained on a 12 hr light-dark cycle. 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 Université.

Two-bottle choice experiment

Mice single-housed in a home cage were presented with two bottles of water (Volvic) for a habituation period of 4 days. After habituation, mice were presented with one bottle of saccharine solution (2%, Sigma Aldrich) and one bottle of nicotine (free base, Sigma Aldrich) plus saccharine (2%) solution diluted in water (adjusted to pH ~7.2 with NaOH). Unless otherwise noted, four different concentrations of nicotine were tested consecutively (10, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with changes in concentration occurring every 4 days. For the two-bottle aversion task, a single nicotine concentration (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used after the habituation period. Bottles were swapped every other day to control for side preference. The drinking volume was measured every minute with an automated acquisition system (TSE system, Germany). Nicotine intake was calculated in mg of nicotine per kilogram of mouse body weight per day (mg/kg/day). To minimize stress from handling, mice were weighed every other day, since we found their weight to be sufficiently stable over 2 days. Percent nicotine consumption was calculated as the volume of nicotine solution consumed as a percentage of the total fluid consumed. Mice showing a strong side bias (preference <20% or >80%) in the habituation period were not taken into account for the analyses.

For the pseudo-ternary plot analyses, we determined the percent nicotine consumption on the left-hand side (%c1) and the percent nicotine consumption on the right-hand side (%c2), for each nicotine concentration and each animal. We then calculated the nicotine consumption and side bias indexes, by plotting the minimum $\min(\%c1, \%c2)$ against the maximum $\max(\%c1, \%c2)$, and used a 90° rotation to obtain the pseudo-ternary plot. In this plot, the three apices represent mice that avoid nicotine

on both sides (0% nic.), mice that track nicotine on both sides (100% nic.), and finally mice that drink solely one side (side biased).

Prolonged treatment with nicotine

Osmotic minipumps (2004, Alzet minipump) were implanted subcutaneously in 8-week-old mice anesthetized with isoflurane (1%). Minipumps continuously delivered nicotine (10 mg/kg/day) or saline (control) solution with a rate of 0.25 μ l/hr during 4 weeks.

Brain slice preparation

Mice were weighed and then anaesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (150 mg/kg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (60 mg/kg, Rompun 2%, Bayer France, Lyon, France). Blood was then fluidized by an injection of an anticoagulant (0.1 mL, heparin 1000 U/mL, Sigma) into the left ventricle, and an intra-cardiac perfusion of ice-cold (0–4°C), oxygenated (95% O₂/5% CO₂) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (SB-aCSF) was performed. The SB-aCSF solution contained (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). After rapid brain sampling, slices (250 μ m thick) were cut in SB-aCSF at 0–4°C using a Compressstome slicer (VF-200, Precisionary Instruments Inc). Slices were then transferred to the same solution at 35 °C for 10 min, then moved and stored in an oxygenated aCSF solution at room temperature. The aCSF solution contained in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 15 sucrose, 10 glucose (pH 7.2). After minimum 1 hr of rest, slices were placed individually in a recording chamber at room temperature and infused continuously with aCSF recording solution at a constant flow rate of about 2 ml/min.

Ex vivo patch-clamp recordings of IPN neurons

Patch pipettes (5–8 M Ω) were stretched from borosilicate glass capillaries (G150TF-3, Warner instruments) using a pipette puller (Sutter Instruments, P-87, Novato, CA) and filled with a few microliters of an intracellular solution adjusted to pH 7.2, containing (in mM): 116 K-gluconate, 20 HEPES, 0.5 EGTA, 6 KCl, 2 NaCl, 4 ATP, 0.3 GTP and 2 mg/mL biocytin. Biocytin was used to label the recorded neurons. The slice of interest was placed in the recording chamber and viewed using a white light source and a upright microscope coupled to a Dodt contrast lens (Scientifica, Uckfield, UK). Neurons were recorded from the dorsal (IPDL) and rostral (IPR) parts on the IPN. Whole-cell configuration recordings of IPN neurons were performed using an amplifier (Axoclamp 200B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected to a digitizer (Digidata 1550 LowNoise acquisition system, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Signal acquisition was performed at 10 kHz, filtered with a lowpass (Bessel, 2 kHz) and collected by the acquisition software pClamp 10.5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Nicotine tartrate (30 μ M in aCSF) was locally and briefly applied (200ms puffs) using a puff pipette (glass pipette ~3 μ m diameter at the tip) positioned about 20–30 μ m from the soma of the neuron. The pipette was connected to a Picospritzer (PV-800 PicoPump, World Precision Instruments) controlled with pClamp to generate transient pressure in the pipette (~2 psi). Nicotine-evoked currents were recorded in voltage-clamp mode at a membrane potential of –60 mV. All electrophysiology traces were extracted and pre-processed using Clampfit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and analyzed with R.

In vivo electrophysiology

Mice were deeply anesthetized with chloral hydrate (8%, 400 mg/kg) and anesthesia was maintained throughout the experiment with supplements. Catheters were positioned in the saphenous veins of the mice to perform saline or nicotine intravenous injections. Nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.9% NaCl solution and pH was adjusted to 7.4. The nicotine solution was injected at a dose of 7.5, 15, and 30 μ g/kg. Borosilicate glass capillaries (1.5 mm O.D. / 1.17 mm I.D., Harvard Apparatus) were pulled using a vertical puller (Narishige). Glass pipettes were broken under a microscope to obtain a ~1 μ m diameter at the tip. Electrodes were filled with a 0.5% NaCl solution containing 1.5% of neurobiotin tracer (AbCys) yielding impedances of 6–9 M Ω . Electrical signals were amplified by a high-impedance amplifier (Axon Instruments) and supervised through an audio monitor (A.M. Systems Inc). The signal was digitized, sampled at 25 kHz and recorded on a computer using Spike2 (Cambridge Electronic Design) for later analysis. IPN neurons were recorded in an area corresponding to the following stereotaxic coordinates (4–5° angle): 3.3–3.6 mm posterior to

bregma, 0.2–0.45 mm from medial to lateral and 4.3–5 mm below the brain surface. A 5 min-baseline was recorded prior to saline or nicotine i.v. injection. For the dose-response experiments, successive randomized injections of nicotine (or saline) were performed, interspaced with sufficient amount of time (>10 min) to allow the neuron to return to its baseline.

Stereotaxic viral injections

8-week-old mice were injected in the IPN with a lentivirus that co-expresses the WT $\beta 4$ subunit together with eGFP (or only eGFP for control experiments) under the control of the PGK promoter. Lentiviruses were produced as previously described (*Maskos et al., 2005*). For viral transduction, mice were anaesthetized with a gas mixture containing 1–3% isoflurane (IsoVet, Pyramal Healthcare Ltd., Nothumberland, UK) and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Unilateral injections (0.1 μ l/min) of 1 μ l of a viral solution (Lenti.pGK. $\beta 4$.IRES.eGFP, titer 150 ng/ μ l of p24 protein; or Lenti.pGK.eGFP, titer 75 ng/ μ l of p24 protein) were performed using a cannula (diameter 36 G, Phymep, Paris, France). The cannula was connected to a 10 μ l Hamilton syringe (Model 1701, Hamilton Robotics, Bonaduz, Switzerland) placed in a syringe pump (QSI, Stoelting Co, Chicago, IL, USA). Injections were performed in the IPN at the following coordinates (5° angle): from bregma ML - 0.4 mm, AP - 3.5 mm, and DV: - 4.7 mm (according to Paxinos & Franklin). Electrophysiological recordings were made at least 4 weeks after viral injection, the time required for the expression of the transgene, and proper expression was subsequently checked using immunohistochemistry.

Immunocytochemical identification

Immunostaining was performed as described in *Durand-de Cuttoli et al., 2018*, with the following primary antibodies: anti-tyrosine hydroxylase 1:500 (anti-TH, Sigma, T1299) and chicken anti-eGFP 1:500 (Aveslab, AB_10000240). Briefly, serial 60 μ m-thick sections of the midbrain were cut with a vibratome. Slices were permeabilized for one hour in a solution of phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma; A4503). Sections were incubated with primary antibodies in a solution of 1.5% BSA and 0.2% Triton X-100 overnight at 4 °C, washed with PBS and then incubated with the secondary antibodies for 1 hr. The secondary antibodies were Cy3-conjugated anti-mouse (1:500 dilution) and alexa488-conjugated anti-chicken (1:1000 dilution; Jackson ImmunoResearch, 715-165-150 and 703-545-155, respectively). For the juxtacellular immunostaining, the recorded neurons were identified with the addition of AMCA-conjugated streptavidin (1:200 dilution) in the solution (Jackson ImmunoResearch). Slices were mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930). Microscopy was carried out either with a confocal microscope (Leica) or with an epifluorescence microscope (Leica), and images were captured using a camera and analyzed with ImageJ.

Statistical analysis

All statistical analyses were computed using R (The R Project, version 4.0.0). Results were plotted as a mean \pm s.e.m. The total number (n) of observations in each group and the statistics used are indicated in figure legends. Classical comparisons between means were performed using parametric tests (Student's T-test, or ANOVA for comparing more than two groups when parameters followed a normal distribution [Shapiro test $p > 0.05$]), and non-parametric tests (here, Mann-Whitney or Friedman) when the distribution was skewed. Multiple comparisons were corrected using a sequentially rejective multiple test procedure (Holm-Bonferroni correction). All statistical tests were two-sided. $p > 0.05$ was considered not to be statistically significant.

Acknowledgements

The authors thank Ines Centeno-Lemaire (Sorbonne Université, Paris, France) for her help with behavioral tests, Jean-Pierre Hardelin (ESPCI, Paris, France) for critical reading of the manuscript, and the animal facilities at Institut de Biologie Paris Seine (IBPS, Paris, France) and ESPCI Paris. Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE16-0012 CHOLHAB to AM, and ANR-17-CE16-0016 SNP-NIC to PF) Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU201903007961 to PF and a PhD Fellowship to JJ) Institut National du Cancer Grant TABAC-16-022, TABAC-19-02 and SPA-21-002 (to PF). Memolife labex starting package (to PF and AM). Fundamental research prize from the Fondation Médisite for neuroscience (AM). Fourth-year PhD fellowship from Fondation pour la Recherche

Médicale (FDT201904008060 to SM and FDT20170437427 to RDC). Fourth-year PhD fellowship from the Biopsy Labex (CN). Fourth-year PhD fellowship from the Memolife Labex (JJ).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-21-CE16-0012 CHOLHAB	Alexandre Mourot
Agence Nationale de la Recherche	ANR-17-CE16-0016 SNP-NIC	Philippe Faure
Fondation pour la Recherche Médicale	FRM EQU201903007961	Philippe Faure
Institut National Du Cancer	TABAC-16-022	Philippe Faure
Institut National Du Cancer	TABAC-19-02	Philippe Faure
Institut National Du Cancer	SPA-21-002	Philippe Faure
Fondation de France	Prix Médisite	Alexandre Mourot
Fondation pour la Recherche Médicale	FDT201904008060	Sarah Mondoloni
Fondation pour la Recherche Médicale	FDT20170437427	Romain Durand-de Cuttoli
Labex Biopsy		Claire Nguyen
Labex Memolife		Joachim Jehl Alexandre Mourot
Fondation pour la Recherche Médicale		Joachim Jehl

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Sarah Mondoloni, Conceptualization, Software, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing – review and editing; Claire Nguyen, Maria Piscato, Fabio Marti, Formal analysis, Investigation; Eléonore Vicq, Joachim Jehl, Romain Durand-de Cuttoli, Stefania Tolu, Investigation; Nicolas Torquet, Software; Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Resources; Philippe Faure, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Validation, Methodology, Writing – review and editing; Alexandre Mourot, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Validation, Visualization, Methodology, Writing - original draft, Writing – review and editing

Author ORCIDs

Sarah Mondoloni <http://orcid.org/0000-0002-6134-3715>

Claire Nguyen <http://orcid.org/0000-0002-0347-3626>

Joachim Jehl <http://orcid.org/0000-0001-9821-7619>

Nicolas Torquet <http://orcid.org/0000-0001-9032-193X>

Philippe Faure <http://orcid.org/0000-0003-3573-4971>

Alexandre Mourot <http://orcid.org/0000-0002-8839-7481>

Ethics

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 Université.

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.80767.sa1>

Additional files

Supplementary files

- MDAR checklist

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files. Source data have been provided for all the figures.

References

- Ables JL**, Görlich A, Antolin-Fontes B, Wang C, Lipford SM, Riad MH, Ren J, Hu F, Luo M, Kenny PJ, Heintz N, Ibañez-Tallon I. 2017. Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular $\alpha 5$ nicotinic neurons regulates nicotine preference. *PNAS* **114**:13012–13017. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1717506114>
- Antolin-Fontes B**, Li K, Ables JL, Riad MH, Görlich A, Williams M, Wang C, Lipford SM, Dao M, Liu J, Molina H, Heintz N, Kenny PJ, Ibañez-Tallon I. 2020. The habenular G-protein–coupled receptor 151 regulates synaptic plasticity and nicotine intake. *PNAS* **117**:5502–5509. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1916132117>
- Arvin MC**, Jin XT, Yan Y, Wang Y, Ramsey MD, Kim VJ, Beckley NA, Henry BA, Drenan RM. 2019. Chronic nicotine exposure alters the Neurophysiology of Habenulo-Interpeduncular circuitry. *The Journal of Neuroscience* **39**:4268–4281. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2816-18.2019>, PMID: 30867261
- Bagdas D**, Diester CM, Riley J, Carper M, Alkhlaif Y, AlOmari D, Alayoubi H, Poklis JL, Damaj MI. 2019. Assessing nicotine dependence using an oral nicotine free-choice paradigm in mice. *Neuropharmacology* **157**:107669. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107669>
- Banala S**, Arvin MC, Bannon NM, Jin XT, Macklin JJ, Wang Y, Peng C, Zhao G, Marshall JJ, Gee KR, Wokosin DL, Kim VJ, McIntosh JM, Contractor A, Lester HA, Kozorovitskiy Y, Drenan RM, Lavis LD. 2018. Photoactivatable drugs for nicotinic Optopharmacology. *Nature Methods* **15**:347–350. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4637>, PMID: 29578537
- Bierut LJ**, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, Horton WJ, Breslau N, Budde J, Cloninger CR, Dick DM, Foroud T, Hatsukami D, Hesselbrock V, Johnson EO, Kramer J, et al. 2008. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *The American Journal of Psychiatry* **165**:1163–1171. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111711>, PMID: 18519524
- Centers for Disease Control and Prevention**. 2010. *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease* Office of the Surgeon General.
- Collins AC**, Pogun S, Nesil T, Kanit L. 2012. Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of Addiction Research & Therapy* **S2**:004. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-6105.S2-004>, PMID: 23264883
- Deroche-Gamonet V**, Belin D, Piazza PV. 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**:1014–1017. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1099020>, PMID: 15310906
- DiFranza JR**, Savageau JA, Fletcher K, Ockene JK, Rigotti NA, McNeill AD, Coleman M, Wood C. 2004. Recollections and repercussions of the first inhaled cigarette. *Addictive Behaviors* **29**:261–272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2003.08.002>
- Dongelmans M**, Durand-de Cuttoli R, Nguyen C, Come M, Duranté EK, Lemoine D, Brito R, Ahmed Yahia T, Mondoloni S, Didienne S, Bousseynol E, Hanneke B, Reynolds LM, Torquet N, Dalkara D, Marti F, Mourrot 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**:6945. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27268-7>, PMID: 34836948
- Durand-de Cuttoli R**, Mondoloni S, Marti F, Lemoine D, Nguyen C, Naudé J, d’Izarny-Gargas T, Pons S, Maskos U, Trauner D, Kramer RH, Faure P, Mourrot A. 2018. Manipulating Midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. *eLife* **7**:37487. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.37487>
- Elayouby KS**, Ishikawa M, Dukes AJ, Smith ACW, Lu Q, Fowler CD, Kenny PJ. 2021. $\alpha 3^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the Habenula-Interpeduncular nucleus circuit regulate nicotine intake. *The Journal of Neuroscience* **41**:1779–1787. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0127-19.2020>, PMID: 33380469
- Fenster CP**, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA. 1997. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *The Journal of Neuroscience* **17**:5747–5759. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05747.1997>, PMID: 9221773
- Forget B**, Scholze P, Langa F, Morel C, Pons S, Mondoloni S, Besson M, Durand-de Cuttoli R, Hay A, Tricoire L, Lambolze B, Mourrot A, Faure P, Maskos U. 2018. A human polymorphism in Chrna5 is linked to relapse to nicotine seeking in transgenic rats. *Current Biology* **28**:3244–3253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.044>, PMID: 30293722
- Fowler CD**, Lu Q, Johnson PM, Marks MJ, Kenny PJ. 2011. Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* **471**:597–601. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09797>, PMID: 21278726

- Fowler CD**, Kenny PJ. 2014. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology* **76 Pt B**:533–544. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.008>, PMID: 24055497
- Frahm S**, Slimak MA, 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 Beta4 and Alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial Habenula. *Neuron* **70**:522–535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.013>, PMID: 21555077
- Gallego X**, Molas S, Amador-Arjona A, Marks MJ, Robles N, Murtra P, Armengol L, Fernández-Montes RD, Gratacòs M, Pumarola M, Cabrera R, Maldonado R, Sabrià J, Estivill X, Dierssen M. 2012. Overexpression of the Chrna5/A3/B4 Genomic cluster in mice increases the sensitivity to nicotine and modifies its reinforcing effects. *Amino Acids* **43**:897–909. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1149-y>, PMID: 22101982
- García-Guillén IM**, Alonso A, Puellas L, Marín F, Aroca P. 2021. Multiple regionalized genes and their putative networks in the Interpeduncular nucleus suggest complex mechanisms of neuron development and axon guidance. *Frontiers in Neuroanatomy* **15**:643320. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.643320>
- 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**:584–586. DOI: <https://doi.org/10.1038/npp.2016.176>, PMID: 27577600
- George O**, Koob GF. 2017. Individual differences in the Neuropsychopathology of addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **19**:217–229. DOI: <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.3/gkoob>, PMID: 29302219
- Grady SR**, Moretti M, Zoli M, Marks MJ, Zanardi A, Pucci L, Clementi F, Gotti C. 2009. Rodent Habenulo-Interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the Alpha3Beta4* and Alpha3Beta3Beta4* subtypes mediate acetylcholine release. *The Journal of Neuroscience* **29**:2272–2282. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5121-08.2009>
- Harrington L**, Viñals X, Herrera-Solís A, Flores A, Morel C, Tolu S, Faure P, Maldonado R, Maskos U, Robledo P. 2016. Role of B4* nicotinic acetylcholine receptors in the Habenulo-Interpeduncular pathway in nicotine reinforcement in mice. *Neuropsychopharmacology* **41**:1790–1802. DOI: <https://doi.org/10.1038/npp.2015.346>, PMID: 26585290
- Hartmann-Boyce J**, Chepkin SC, Ye W, Bullen C, Lancaster T. 2018. Nicotine replacement therapy versus control for smoking cessation. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* **5**:CD000146. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000146.pub5>, PMID: 29852054
- Heintz N**. 2004. Gene expression nervous system Atlas (GENSAT). *Nature Neuroscience* **7**:483– . DOI: <https://doi.org/10.1038/nn0504-483>, PMID: 15114362
- Hsu YWA**, Tempest L, Quina LA, Wei AD, Zeng H, Turner EE. 2013. Medial Habenula output circuit mediated by A5 nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the Interpeduncular nucleus. *The Journal of Neuroscience* **33**:18022–18035. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2927-13.2013>
- Husson M**, Harrington L, Tochon L, Cho Y, Ibañez-Tallon I, Maskos U, David V. 2020. B4-nicotinic receptors are critically involved in reward-related behaviors and self-regulation of nicotine reinforcement. *The Journal of Neuroscience* **40**:3465–3477. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0356-19.2020>, PMID: 32184221
- Jin X-T**, Tucker BR, Drenan RM. 2020. Nicotine self-administration induces plastic changes to nicotinic receptors in medial Habenula. *ENeuro* **7**:ENEURO.0197-20.2020. DOI: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0197-20.2020>, PMID: 32675176
- Juarez B**, Morel C, Ku SM, Liu Y, Zhang H, Montgomery S, Gregoire H, Ribeiro E, Crumiller M, Roman-Ortiz C, Walsh JJ, Jackson K, Croote DE, Zhu Y, Zhang S, Vendruscolo LF, Edwards S, Roberts A, Hodes GE, Lu Y, et al. 2017. Midbrain circuit regulation of individual alcohol drinking behaviors in mice. *Nature Communications* **8**:2220. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02365-8>, PMID: 29263389
- Lassi G**, Taylor AE, Timpson NJ, Kenny PJ, Mather RJ, Eisen T, Munafò MR. 2016. The Chrna5–A3–B4 Gene cluster and smoking: from discovery to Therapeutics. *Trends in Neurosciences* **39**:851–861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.005>, PMID: 27871728
- Maskos U**, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP. 2005. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* **436**:103–107. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03694>, PMID: 16001069
- Matta SG**, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, Craig CR, Collins AC, Damaj MI, Donny EC, Gardiner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Levin ED, Lukas RJ, Markou A, Marks MJ, McCallum SE, Parameswaran N, et al. 2006. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* **190**:269–319. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>
- McLaughlin I**, Dani JA, De Biasi M. 2017. The medial Habenula and Interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *Journal of Neurochemistry* **142 Suppl 2**:130–143. DOI: <https://doi.org/10.1111/jnc.14008>, PMID: 28791703
- Molas S**, DeGroot SR, Zhao-Shea R, Tapper AR. 2017. Anxiety and nicotine dependence: emerging role of the Habenulo-Interpeduncular axis. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**:169–180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.001>
- Morton G**, Nasirova N, Sparks DW, Brodsky M, Sivakumaran S, Lambe EK, Turner EE. 2018. Chrna5-expressing neurons in the Interpeduncular nucleus mediate aversion primed by prior stimulation or nicotine exposure. *The Journal of Neuroscience* **38**:6900–6920. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0023-18.2018>, PMID: 29954848

- Nashmi R**, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ, Lester HA. 2007. Chronic nicotine cell specifically Upregulates functional 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in Midbrain and enhanced long-term potentiation in Perforant path. *The Journal of Neuroscience* **27**:8202–8218. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-07.2007>
- Nesil T**, Kanit L, Collins AC, Pogun S. 2011. Individual differences in oral nicotine intake in rats. *Neuropharmacology* **61**:189–201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.027>
- 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 J-F, Pons S, Maskos U, Deroche-Gamonet V, Dalkara D, Hardelin J-P, Mourot A, et al. 2021. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron* **109**:2604–2615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>, PMID: 34242565
- Otsu Y**, Darcq E, Pietrajtis K, Mátyás F, Schwartz E, Bessaih T, Abi Gerges S, Rousseau CV, Grand T, Dieudonné S, Paoletti P, Acsády L, Agulhon C, Kieffer BL, Diana MA. 2019. Control of aversion by glycine-Gated Glun1/ Glun3A NMDA receptors in the adult medial Habenula. *Science* **366**:250–254. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax1522>, PMID: 31601771
- Pang X**, Liu L, Ngolab J, Zhao-Shea R, McIntosh JM, Gardner PD, Tapper AR. 2016. Habenula cholinergic neurons regulate anxiety during nicotine withdrawal via nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **107**:294–304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.039>, PMID: 27020042
- Pascoli V**, Hiver A, Van Zessen R, Loureiro M, Achargui R, Harada M, Flakowski J, Lüscher C. 2018. Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* **564**:366–371. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0789-4>, PMID: 30568192
- Piazza PV**, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* **245**:1511–1513. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2781295>, PMID: 2781295
- Quina LA**, Harris J, Zeng H, Turner EE. 2017. Specific connections of the Interpeduncular Subnuclei reveal distinct components of the Habenulopeduncular pathway. *The Journal of Comparative Neurology* **525**:2632–2656. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.24221>, PMID: 28387937
- Salas R**, Sturm R, Boulter J, De Biasi M. 2009. Nicotinic receptors in the Habenulo-Interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *The Journal of Neuroscience* **29**:3014–3018. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4934-08.2009>, PMID: 19279237
- Shih PY**, Engle SE, Oh G, Deshpande P, Puskar NL, Lester HA, Drenan RM. 2014. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial Habenula. *The Journal of Neuroscience* **34**:9789–9802. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0476-14.2014>, PMID: 25031416
- Shih PY**, McIntosh JM, Drenan RM. 2015. Nicotine dependence reveals distinct responses from neurons and their resident nicotinic receptors in medial Habenula. *Molecular Pharmacology* **88**:1035–1044. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.115.101444>, PMID: 26429939
- Siciliano CA**, Noamany H, Chang C-J, Brown AR, Chen X, Leible D, Lee JJ, Wang J, Vernon AN, Vander Weele CM, Kimchi EY, Heiman M, Tye KM. 2019. A cortical-brainstem circuit predicts and governs compulsive alcohol drinking. *Science* **366**:1008–1012. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aay1186>, PMID: 31754002
- Taly A**, Corringier PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews. Drug Discovery* **8**:733–750. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2927>, PMID: 19721446
- Tapia MA**, Jin X-T, Tucker BR, Thomas LN, Walker NB, Kim VJ, Albertson SE, Damuka N, Krizan I, Edassery S, Savas JN, Solingapuram Sai KK, Jones SR, Drenan RM. 2022. Relapse-like behavior and nAChR sensitization following intermittent access nicotine self-administration. *Neuropharmacology* **212**:109066. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109066>
- Tapper AR**, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA. 2004. Nicotine activation of Alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* **306**:1029–1032. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1099420>, PMID: 15528443
- 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 YAH, Lambalez B, Caboche J, Gutkin B, Gardier AM, Changeux JP, Faure P, Maskos U. 2013. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular Psychiatry* **18**:382–393. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>, PMID: 22751493
- Torquet N**, Marti F, Compart C, Tolu S, Nguyen C, Oberto V, Benallaoua M, Naudé J, Didienne S, Debray N, Jezequel S, Le Gouestre L, Hanneke B, Mariani J, Mourot A, Faure P. 2018. Social interactions impact on the dopaminergic system and drive individuality. *Nature Communications* **9**:3081. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05526-5>, PMID: 30082725
- Tuesta LM**, Chen Z, Duncan A, Fowler CD, Ishikawa M, Lee BR, Liu X-A, Lu Q, Cameron M, Hayes MR, Kamenecka TM, Pletcher M, Kenny PJ. 2017. GLP-1 acts on Habenular avoidance circuits to control nicotine intake. *Nature Neuroscience* **20**:708–716. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.4540>
- Verendeev A**, Riley AL. 2013. The role of the Aversive effects of drugs in self-administration. *Behavioural Pharmacology* **24**:363–374. DOI: <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32836413d5>
- Wang F**, Nelson ME, Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Keyser K, Lindstrom J. 1998. Chronic nicotine treatment up-regulates human $\alpha 3 \beta 2$ but not $\alpha 3 \beta 4$ acetylcholine receptors Stably Transfected in human embryonic kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**:28721–28732. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28721>
- WHO**. 2021. WHO report on the global tobacco epidemic, 2021: addressing new and emerging products. World Health Organization.

- Wills L**, Ables JL, Braunscheidel KM, Caligiuri SPB, Elayouby KS, Fillinger C, Ishikawa M, Moen JK, Kenny PJ. 2022. Neurobiological mechanisms of nicotine reward and aversion. *Pharmacological Reviews* **74**:271–310. DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299>, PMID: 35017179
- Wolfman SL**, Gill DF, Bogdanic F, Long K, Al-Hasani R, McCall JG, Bruchas MR, McGehee DS. 2018. Nicotine aversion is mediated by GABAergic Interpeduncular nucleus inputs to Laterodorsal Tegmentum. *Nature Communications* **9**:2710. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04654-2>, PMID: 30006624
- Xu W**, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, Patrick JW, Role LW, Beaudet AL, De Biasi M. 1999. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the Beta2 and the Beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Neuroscience* **19**:9298–9305. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09298.1999>, PMID: 10531434
- Yamaguchi T**, Danjo T, Pastan I, Hikida T, Nakanishi S. 2013. Distinct roles of segregated transmission of the Septo-Habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* **78**:537–544. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.035>, PMID: 23602500
- Zhang J**, Tan L, Ren Y, Liang J, Lin R, Feng Q, Zhou J, Hu F, Ren J, Wei C, Yu T, Zhuang Y, Bettler B, Wang F, Luo M. 2016. Presynaptic Excitation via GABAB receptors in Habenula cholinergic neurons regulates fear memory expression. *Cell* **166**:716–728. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.026>, PMID: 27426949
- Zhao-Shea R**, Liu L, Pang X, Gardner PD, Tapper AR. 2013. Activation of GABAergic neurons in the Interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. *Current Biology* **23**:2327–2335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.041>, PMID: 24239118
- Zhao-Shea R**, DeGroot SR, Liu L, Vallaster M, Pang X, Su Q, Gao G, Rando OJ, Martin GE, George O, Gardner PD, Tapper AR. 2015. Increased CRF signalling in a ventral Tegmental area-Interpeduncular nucleus-medial Habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. *Nature Communications* **6**:1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms7770>
- Zoli M**, Pistillo F, Gotti C. 2015. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* **96**:302–311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>, PMID: 25460185

