# Renforcement et aversion à la nicotine : interactions des circuits dopaminergique et interpédonculaire

Joachim Jehl

▶ **To cite this version:**

Joachim Jehl. Renforcement et aversion à la nicotine : interactions des circuits dopaminergique et interpédonculaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS403 . tel-04757480

**HAL Id: tel-04757480**

**https://theses.hal.science/tel-04757480v1**

Submitted on 29 Oct 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.

*École doctorale Cerveau, cognition, comportement*
*Spécialité Neurosciences*

Thèse de doctorat

---

# Renforcement et aversion à la nicotine : interactions des circuits dopaminergique et interpédonculaire


Présentée par

Joachim JEHL


Soutenance du 28 octobre 2022

Devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Dr Jocelyne CABOCHE | Présidente du jury |
| Dr Vincent DAVID | Rapporteur |
| Dr Sebastian FERNANDEZ | Rapporteur |
| Dr Guillaume DUGUÉ | Examinateur |
| Dr Catherine LE MOINE | Examinatrice |
| Dr Alexandre MOUROT | Directeur de thèse |
| Dr Philippe FAURE | Invité |

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jocelyne Caboche, Vincent David, Guillaume Dugué, Sebastian Fernandez et Catherine Le Moine d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mes travaux de recherche.

Exercice redouté à juste titre, introduction qui ne dit pas son nom, première et souvent unique partie lue dans une thèse, les remerciements. Il m'apparaît comme un exercice d'extrême équilibrisme de naviguer un réseau de sentiments profonds et de relations longues de plusieurs années en une ou deux phrases maladroites. Si je m'écoutais, j'adresserais un (comprendre « des ») paragraphe à chacun d'entre vous, mais le temps et la place me manquent. Quelques pensées sont esquissées là, babioles témoignant d'histoires bien plus grandes qu'elles.

En premier lieu, cette aventure de recherche n'est pas que la mienne, elle a été portée par toute une équipe. J'ai beaucoup appris, et grandi, à vos côtés.

Alex, tu as été le catalyseur (blague de biochimiste) de ma transformation d'un jeune étudiant à un (moins) jeune scientifique. Tu m'as donné l'opportunité de me lancer dans cette thèse, et comme un pont au-dessus de l'océan c'est une fois de l'autre côté que je réalise la valeur du chemin parcouru. Pour cela, tu as ma gratitude et ma reconnaissance les plus sincères.

Philippe, j'ai eu envie de rejoindre ton équipe en te voyant démolir les remarques d'un de mes condisciples qui pensait avoir résolu la science en lisant un Science d'un quelconque gros labo américain. Je n'ai jamais regretté mon choix, même quand je me suis retrouvé à la place dudit condisciple. Ton honnêteté, ton exigence et ta bienveillance m'impressionneront toujours.

Éléonore, bosser avec toi, « c'est de toute beauté ». A jamais liés par nos combats communs et par un brin d'accent marseillais (« Mais si, dans tes intonations on entend les cigales »).

Élise, alias Muskatnuss, alliée au goût sûr pour la gastronomie, le style et la chute de la bourgeoisie, je te souhaite le meilleur et bien plus encore pour la suite de tes aventures.

Maria, the best of luck for the rest of your PhD journey, you have everything you need to succeed.

Maxime, le gars déterminé et probablement sans complexe, je n'atteindrai pas ton niveau en jeu de mot (est-ce un mal ?) mais j'espère égaler ton niveau de gars sûr.

Nicolas, tu as donné un nouvel élan à ma thèse (qui a fini par traverser la rivière) pour le modeste prix d'un approvisionnement régulier en gâteaux. Partager un bureau, une clim senteur mouches fermentées, un TRec de Thomas et tant d'autres choses aura été un plaisir.

Tinaïg, tu as été d'une excellente influence sur moi : j'ai absorbé l'ensemble de tes expressions (« On n'a **pas le temps** ») mais j'espère aussi un peu de ta persévérance, de ton énergie et de ton dévouement, qui semblent inépuisables.

Une pensée également pour Romain, Claire et Sarah, qui ont accueilli et accompagné mes premiers pas au labo.

Un immense merci à tous les NPCiens (ou serait-ce NPCistes ?) actuels et émérites, pour avoir accompagné de près ou d'un tout petit peu moins près mon voyage de doctorat : Sophie, Robin, Clément, Lauren, Fabio, Jérémie, Steve, Nicolas Torquet et Debray, Bernadette, Damien, Aylin, Jean-Pierre, Jamilé.

Mes proches, mon socle inébranlable, toujours là pour me relever. Le monde pourrait s'écrouler qu'avec vous il serait encore entier. Ce qu'on partage ne s'embarrasse pas de mots, c'est la douce chaleur qui nous enveloppe pour nous dire « ça va aller ». Maman, Papa, Annabelle, Suzanne, Salim, Baptiste, Marie(s), Joanna, Marianne et les autres, ma main par vos mains amarrée.

A ma famille et mes amis, proches et lointains, pour leur soutien indéfectible.

Et merci à vous, qui lisez ces lignes. Si vous parcourez ce manuscrit, c'est que vous avez un lien avec son contenu, ou peut-être même avec son auteur, et pour avoir passé bien du temps avec l'un et l'autre je peux vous assurer qu'ils vous en sont reconnaissants.

# Sommaire


Résumé 1

Abstract 3

Liste des publications 5

Liste des abréviations 7

Avant-propos 9

Chapitre 1 : La transmission nicotinique dans le système nerveux central 11

1.1. L'acétylcholine 11

1.2. Les récepteurs nicotiniques 13
1.2.1. Structure générale et allostérie des récepteurs nicotiniques 13
1.2.2. Diversité des sous-unités nicotiniques et implications fonctionnelles 15
1.2.3. Distribution cellulaire et anatomique des récepteurs nicotiniques 16

Chapitre 2 : Neurophysiologie de la réponse à la nicotine 19

2.1. L'addiction à la nicotine 19

2.2. Action aiguë de la nicotine 20

2.3. Conséquences d'une exposition chronique à la nicotine 21

2.4. La balance des effets renforçants et aversifs de la nicotine dans sa consommation 22

2.5. Modéliser l'addiction à la nicotine chez le rongeur : paradigmes comportementaux 24

Chapitre 3 : Circuits dopaminergiques et renforcement à la nicotine 27

3.1. La dopamine 27

3.2. Anatomie des voies dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale 28

3.3. Caractéristiques de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques 29

3.4. Modulation nicotinique de l'aire tegmentale ventrale 30

3.5. Renforcement naturel et renforcement induit par la nicotine 31

3.6. Transmission des propriétés aversives de la nicotine par l'aire tegmentale ventrale 34

Chapitre 4 : La voie habénulo-interpédonculaire dans l'aversion et la consommation de nicotine 37

4.1. Anatomie de la voie habénulo-interpédonculaire 37

4.2. Transmission nicotinique dans la voie habénulo-interpédonculaire 38

4.3. Rôles endogènes de la voie habénulo-interpédonculaire 39

4.4. Implication de la voie habénulo-interpédonculaire dans l'addiction à la nicotine 41

**Chapitre 5 : Le circuit IPN - VTA dans la consommation de drogue** 43

5.1. Connexions anatomiques entre la VTA et l'IPN 43
5.1.1. Connexion de la VTA vers l'IPN 43
5.1.2. Connexion de l'IPN vers la VTA 43

5.2. Communication fonctionnelle entre la VTA et l'IPN 44

5.3. Développement d'outils pour manipuler les récepteurs nicotiniques 46

**Première publication scientifique** 51

**Seconde publication scientifique** 85

**Discussion** 121

1. Développement d'outils pour manipuler la transmission nicotinique *in vivo* 121
1.1. Contrôle optique des nAChR β4* dans l'IPN 121
1.2. Modulation cholinergique endogène de l'activité de l'IPN 123
1.3. Antagonisme irréversible des récepteurs nicotiniques 124

2. La réponse de l'IPN à la nicotine 125

3. Contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques par l'IPN dans le renforcement 127

4. Le circuit IPN – VTA dans l'addiction à la nicotine 129

**Bibliographie** 133

**Annexe** 157

# Résumé

Le tabagisme concerne un milliard de personnes à travers le monde et est à l'origine de plus de 8 millions de décès par an. La nicotine, principal composé actif du tabac, agit sur le système nerveux par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). Il existe dans le cerveau 12 gènes (α2 à 10 et β2 à 4) codant les sous-unités des nAChR. Celles-ci s'assemblent en un répertoire très riche de récepteurs aux propriétés et fonctions variées. En se liant sur ces différents nAChR, la nicotine génère à la fois des effets récompensants, qui vont promouvoir la consommation de drogue, et des effets aversifs qui vont à l'inverse la limiter. Cette compétition entre propriétés antagonistes semble distribuée au sein de deux régions cérébrales séparées : l'aire tegmentale ventrale (VTA), contenant des neurones dopaminergiques moteurs dans le renforcement à la drogue, et le noyau interpédonculaire (IPN), une structure présentant une grande variété de nAChR et impliquée dans l'aversion. Bien que le rôle de la VTA dans l'addiction soit bien établi, l'action de la nicotine sur l'IPN et les éventuelles interactions entre ces deux acteurs restent à élucider. L'objectif de ce travail a ainsi été d'interroger le rôle de l'IPN, des nAChR qu'il exprime et de leur impact sur la VTA dans l'émergence des effets renforçants et aversifs de la nicotine.

J'ai dans un premier temps étudié l'implication de ces circuits neuronaux dans le déclenchement d'un renforcement à la drogue, première étape menant l'individu à la dépendance. Pour cela, j'ai développé des outils permettant de contrôler *in vivo* l'activité de nAChR spécifiques. Ces nouvelles technologies m'ont permis de démontrer une hétérogénéité dans les réponses de l'IPN à la nicotine, qui est sous-tendue par des populations distinctes de nAChR. Mes résultats montrent en outre que l'IPN est engagé dès les faibles doses de nicotine et en atténue les effets neurophysiologiques sur la VTA et sur le renforcement à la drogue par l'intermédiaire des récepteurs β4.

L'addiction induite par le renforcement est caractérisée par une perte de contrôle de la consommation, participant à une exposition répétée du système nerveux à la nicotine. La seconde partie de mon travail fut consacrée à étudier la manière dont l'IPN intervient dans ces comportements de consommation ainsi que les adaptations neurophysiologiques en résultant. Nous avons analysé les stratégies individuelles de consommation et isolé une population de souris développant une aversion à la drogue. Nos résultats montrent que l'efficacité de la transmission nicotinique dans l'IPN, dépendante des récepteurs β4, participe au déclenchement de cette aversion. Une exposition chronique à la nicotine, quant à elle, réduit à la fois la réponse à la nicotine dans l'IPN et le niveau d'aversion à la drogue, favorisant ainsi sa consommation.

Ces travaux font émerger l'IPN et les récepteurs β4 qu'il exprime comme des acteurs majeurs dans l'addiction, jouant le rôle de frein à la consommation de nicotine et à la mise en place du renforcement. Ils mettent également en lumière la communication entre les circuits de la récompense et de l'aversion dans l'émergence d'une balance entre ces propriétés antagonistes de la nicotine.

# Abstract

Tobacco use affects one billion people worldwide and results in over 8 million deaths every year. Nicotine, the main active compound in tobacco, acts on the nervous system through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). There are 12 genes in the brain (α2 to 10 and β2 to 4) encoding nAChR subunits. These subunits assemble into a wide array of receptors with diverse properties and functions. Upon binding to these different nAChRs, nicotine produces both rewarding and aversive effects, which promote and reduce drug intake, respectively. Such competition between antagonistic properties appears to be distributed within two separate brain regions: the ventral tegmental area (VTA), home to dopaminergic neurons driving drug reinforcement, and the interpeduncular nucleus (IPN), a structure containing a large variety of nAChRs which is involved in aversion. While the relevance of the VTA in addictive behavior is well established, the action of nicotine on the IPN and the potential interactions between these two structures remain to be elucidated. The aim of the present study was to investigate the role of the IPN, its nAChRs and their impact on the VTA in the emergence of the reinforcing and aversive effects of nicotine.

I first examined the involvement of these neural circuits in the onset of drug reinforcement, the first step towards addiction. To this end, I developed new tools for controlling the activity of specific nAChRs *in vivo*. These novel technologies revealed heterogeneous responses of the IPN to nicotine, driven by distinct nAChR populations. Our findings further reveal that the IPN is engaged at low doses of nicotine and blunts the neurophysiological effects on the VTA and on drug reinforcement through β4 receptors.

Addiction driven by reinforcement is characterized by the loss of control over drug consumption, contributing to repeated exposure of the nervous system to nicotine. A second part of my work was devoted to studying the role of the IPN in intake behavior and the resulting neurophysiological adaptations. We analyzed individual consumption strategies and identified a population of mice developing aversion to the drug. Our results show that the efficiency of nicotinic transmission in the IPN, mediated by β4 receptors, is involved in triggering this aversion. Chronic exposure to nicotine reduces both the response to nicotine in the IPN and the level of aversion to the drug, thus facilitating its use.

This work points to the IPN and its β4 receptors as key players in nicotine addiction, acting as a brake on intake and the development of drug reinforcement. Our results highlight how reward and aversion circuits interact in the emergence of a balance between the antagonistic properties of nicotine.

# Liste des publications

Ce travail a été effectué dans l'équipe Neurophysiologie et Comportements dirigée par les Drs Philippe Faure et Alexandre Mourot. Il s'est déroulé à Sorbonne Université (Campus Pierre et Marie Curie), au sein du laboratoire Neuroscience Paris Seine-IBPS (UMR 8246) dirigé par le Dr Hervé Chneiweiss, et 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 quatre publications, dont deux en premier ou co-premier auteur :

*The interpeduncular nucleus blunts the rewarding effect of low-dose nicotine*

**Joachim Jehl**, Éléonore Vicq, Maria Ciscato, Jacinthe Frangier, Nicolas Guyon, Sarah Mondoloni, Claire Nguyen, Jean-Pierre Hardelin, Fabio Marti, Pierre-Jean Corringer, Philippe Faure** et Alexandre Mourot**
*En préparation*

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

Sarah Mondoloni, Claire Nguyen, Éléonore Vicq, **Joachim Jehl**, Romain Durand-de Cuttoli, Nicolas Torquet, Stefania Tolu, Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Fabio Marti, Philippe Faure** et Alexandre Mourot**
*En revue à eLife*

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

Claire Nguyen, Sarah Mondoloni, Tinaïg Le Borgne, Ines Centeno, Maxime Come**, Joachim Jehl**, Clément Solié, Lauren M. Reynolds, Romain Durand-de Cuttoli, Stefania Tolu, Sébastien Valverde, Steve Didienne, Bernadette Hannesse, Jean-Francois Fiancette, Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Véronique Deroche-Gamonet, Deniz Dalkara, Jean-Pierre Hardelin, Alexandre Mourot, Fabio Marti** et Philippe Faure**
*Neuron, 2021.*

*A rare variant of VGLUT3 (p.T8I) identified in patients with psychiatric disorders induces excessive habits, cocaine misuse and maladaptive eating in a mouse model*

Mathieu Favier*, Elena Martin Garcia*, Romain Icick*, Camille de Almeida*, **Joachim Jehl*,** Mazarine Desplanque, Johannes Zimmermann, Annabelle Henrion, Nina Mansouri-Guilani, Coline Mounier, Svethna Ribeiro, Fiona Henderson, Andrea Geoffroy, Odile Poirel, Véronique Bernard, Véronique Fabre, Howard Steiger, Yulong Li, Christian Rosenmund, Rafael Maldonado, Stéphane Jamain, Florence Vorspan, Alexandre Mourot, Nicolas Pietrancosta**, Stéphanie Daumas** et Salah El Mestikawy**
*En préparation*

* co-premiers auteurs ** co-derniers auteurs

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ACh | Acétylcholine |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| BLA | Amygdale basolatérale |
| CeA | Amygdale centrale |
| ChT | Transporteur de la choline |
| ChAT | Choline Acétyltransférase |
| CPP | Préférence de Place Conditionnée |
| Cre | Cre-recombinase |
| DA | Dopamine |
| DAT | Transporteur de la dopamine |
| DOPA | Dihydroxyphénylalalanine |
| DTg | Tegmentum dorsal |
| GFP | *Green Fluorescent Protein* |
| EPSC | Courants post-synaptiques excitateurs |
| FR | *Fasciculus retroflexus* |
| GABA | Acide γ-aminobutyrique |
| $GABA_A$ | Récepteur du GABA de type A |
| IPA | IPN apical |
| IPC | IPN caudal |
| IPDL | IPN dorsolatéral |
| IPDM | IPN dorsomédial |
| IPI | IPN intermédiaire |
| IPL | IPN latéral |
| IPN | Noyau interpédonculaire |
| IPR | IPN rostral |
| IPSC | Courants post-synaptiques inhibiteurs |
| KI | *Knock-in* |
| KO | *Knock-out* |
| LDTg | Tegmentum latérodorsal |
| LHb | Habénula latérale |
| LinAChR | Récepteur nicotinique photo-contrôlable |
| LTP | Potentialisation à long terme |
| MAHoCh | Maléimide - Azobenzène - Homocholine |
| MHb | Habénula médiale |
| MHbD | MHb dorsale |
| MHbV | MHb ventrale |
| NAcc | *Noyau accumbens* (striatum ventral) |
| nAChR | Récepteur nicotinique de l'acétylcholine |
| NOS | Oxyde nitrique synthase |
| PFC | Cortex préfrontal |
| PPTg | Noyau pédonculopontin |
| RMTg | Tegmentum rostromédial |
| RPE | Erreur de prédiction de récompense |
| SNC | Système nerveux central |
| SST | Somatostatine |
| TH | Tyrosine hydroxylase |
| VAChT | Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine |
| VGLUT | Transporteur vésiculaire du glutamate |
| VTA | Aire tegmentale ventrale |
| WT | Souris de type sauvage (*Wild type*) |
| 5HT | Sérotonine (5-hydroxy tryptamine) |
| $5HT_3$ | Récepteur de la sérotonine |

# Avant-propos

Le tabagisme concerne un milliard de personnes à travers le monde et est à l'origine de plus de 8 millions de décès par an selon l'Organisation Mondiale de la Santé, parmi lesquels on compte des fumeurs actifs et passifs. Bien que la consommation mondiale de cigarettes tende à diminuer, l'utilisation de nouveaux moyens de consommation de nicotine, comme les cigarettes électroniques, a quant à elle connu une hausse spectaculaire ces dernières années, tout particulièrement chez les adolescents (*WHO report on the global tobacco epidemic*, 2021). Les cigarettes électroniques constituent en outre un produit d'appel : le risque de devenir fumeur est plus élevé chez les jeunes qui utilisent ce type de produits (Leventhal et al., 2015). La nicotine et ses effets à long terme restent ainsi des questions essentielles de santé publique et un enjeu économique majeur.

La nicotine agit sur le système nerveux via les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). Il existe dans le cerveau 12 gènes (α2 à 10 et β2 à 4) codant les sous-unités des nAChR. Celles-ci s'assemblent en un répertoire très riche de récepteurs aux propriétés (biophysiques, pharmacologiques…) et fonctions variées. Ces récepteurs sont largement distribués dans le système nerveux central. La nicotine, une fois inhalée, va rapidement activer ces différents nAChR et ainsi perturber l'activité de nombreuses structures neuronales, conduisant à l'addiction.

Son mécanisme d'action le mieux décrit passe par l'activation des nAChR contenant la sous-unité β2 exprimés par les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA). La VTA est un noyau clé du circuit de la récompense, et sa mise en jeu favorise le renforcement à la drogue et le maintien de la consommation. Mais la nicotine est également une molécule nocive, aux effets désagréables qui peuvent entraîner des réactions aversives, surtout à forte dose, et ainsi limiter la quantité de drogue consommée. Des travaux récents suggèrent un rôle important du noyau interpédonculaire (IPN) dans le contrôle de cette aversion à la nicotine. Il exprime notamment une forte densité de nAChR, dont des sous-types rares contenant la sous-unité β4. Ces propriétés antagonistes (renforçantes et aversives) entrent en compétition pour sous-tendre la dynamique de consommation, et interrogent sur une possible concertation des circuits impliqués.

L'objectif de ma thèse a été de comprendre le rôle de l'IPN dans la balance entre effets renforçants et aversifs de la nicotine et d'évaluer sa sensibilité et son action, de la première prise de drogue jusqu'à un contexte de consommation chronique. J'ai ainsi cherché à caractériser l'action *in vivo* de la nicotine dans l'IPN et les types de nAChR impliqués dans cette réponse, pour comprendre comment l'activité de l'IPN influencerait celle la VTA et pourrait *in fine* moduler le renforcement à la nicotine. Je me suis également intéressé à la manière dont l'IPN intervient dans les stratégies individuelles de consommation et dans l'émergence d'une aversion à la drogue. Cette étude physiologique a été possible grâce à de nouveaux outils que j'ai pu implémenter afin de contrôler *in vivo* l'activité de sous-types de nAChR spécifiques.

Cette introduction présentera les acteurs endogènes de la modulation nicotinique dans le cerveau, à savoir l'acétylcholine et les nAChR (Chapitre 1) avant d'étudier la façon dont la nicotine détourne leur fonctionnement pour induire des modifications de l'échelle moléculaire jusqu'au comportement de l'individu (Chapitre 2). J'examinerai ensuite les bases neurales de l'addiction à la nicotine à travers les deux voies majeures sous-tendant cette maladie : la VTA et le rôle de la dopamine dans le renforcement (Chapitre 3), et la voie habénulo-interpédonculaire dans le contrôle de l'aversion et de la consommation (Chapitre 4). La dernière partie de l'introduction présentera les données et théories existantes sur les liens entre ces deux circuits et les propriétés antagonistes de la nicotine qu'ils traduisent, pour aboutir à une réponse comportementale concertée de l'individu dans sa consommation (Chapitre 5). Elle sera également l'occasion de présenter les techniques développées pendant ce travail de doctorat, permettant de manipuler l'activité des récepteurs nicotiniques afin d'en évaluer le rôle causal dans la prise de drogue.

# Chapitre 1

# La transmission nicotinique dans le système nerveux central

## 1.1. L'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) occupe une place particulière dans l'histoire des neurosciences, les expériences depuis sa découverte ayant permis de révéler l'existence d'une communication chimique entre les neurones. Elle est synthétisée pour la première fois dans les années 1860 par le chimiste allemand Adolf van Baeyer (Baeyer, 1867). Ce n'est que 47 ans plus tard, en 1914, qu'Henry Dale et son collègue Arthur Ewins isolent l'acétylcholine à partir d'un organisme vivant par ce qu'ils qualifieront eux-mêmes être un « heureux hasard » (Ewins, 1914 ; Dale, 1954). L'échantillon, un ergot de seigle contaminé, provenait d'un groupe pharmaceutique et devait être testé pour une utilisation en clinique obstétrique, mais révéla des propriétés parasympathomimétiques inattendues. L'effet hypotenseur (baisse de la pression sanguine) de l'ACh avait déjà été identifiée par Hunt et Taveau quelques années plus tôt, mais un éventuel rôle neurophysiologique de l'ACh n'était toujours pas déterminé. Otto Loewi apportera cette dernière pièce au puzzle par une série d'expériences dans les années 1920, démontrant l'existence d'une neurotransmission chimique dans le système nerveux, quand il observa que le nerf vague pouvait sécréter une substance induisant une diminution de la contraction d'un cœur isolé de grenouille (Tansey, 2006). Il identifiera ensuite que cette *vagusstoff*, ou substance du vagus, est en réalité l'ACh, ouvrant la voie à de nouvelles recherches (dont la purification d'ACh à partir d'un tissu de mammifère par Dale et Dudley en 1929) qui trouveront en cette molécule le premier neurotransmetteur endogène jamais découvert. Leurs travaux vaudront à Dale et Loewi le prix Nobel de physiologie en 1936.

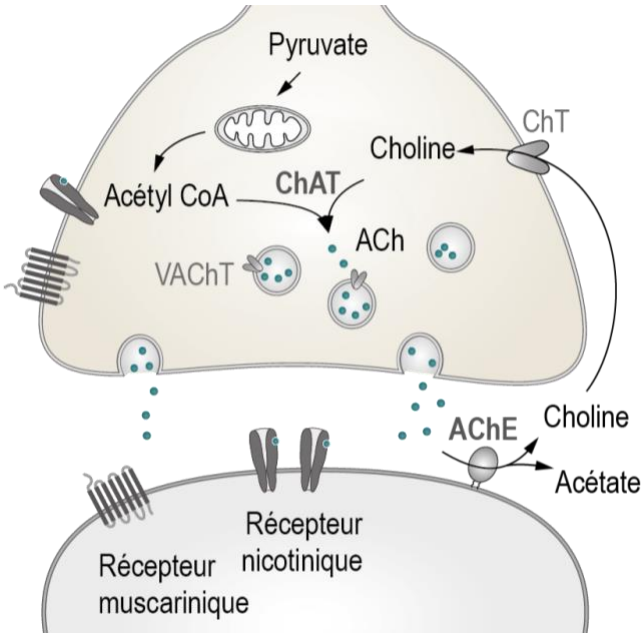



**Figure 1.1 - Cycle biochimique de synthèse, libération et dégradation de l'acétylcholine (ACh) :** AChE : acétylcholinestérase, ChAT : choline acétyltransférase, ChT : transporteur de la choline, CoA = co-enzyme A, VAChT : transporteur vésiculaire de l'ACh. *Illustration par Sarah Mondoloni.*

L'ACh est synthétisée dans le cytosol des neurones cholinergiques par transfert du groupement acétyl de l'acétyl-coenzyme A sur la choline, catalysé par la choline acétyltransférase (ChAT) (Figure 1.1) (Sarter et Parikh, 2005). L'ACh ainsi produite est acheminée et stockée dans des vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire de l'ACh (VAChT). La dépolarisation des terminaisons cholinergiques entraîne la libération de l'ACh par exocytose vésiculaire. L'ACh va diffuser dans le milieu extracellulaire, interagir avec ses récepteurs aux niveaux pré- et post-synaptiques avant d'être dégradée sous l'action de l'acétylcholinestérase (AChE) en choline, permettant sa recapture dans la terminaison cholinergique grâce à son transporteur (ChT). Bien que cette voie de synthèse soit bien caractérisée et que les effets de l'ACh sur ses neurones cibles soient indéniables, les modalités de la transmission cholinergique au sein du système nerveux central sont toujours débattues. Généralement, un neurotransmetteur est libéré soit au niveau des structures membranaires spécialisées que constituent les synapses (transmission synaptique), soit par diffusion dans le compartiment extracellulaire (transmission volumique). L'ACh, elle, semble agir de façon diffuse dans le système nerveux central (SNC), et non localisée comme dans le cas d'une transmission synaptique. Les arguments dans ce sens sont que les récepteurs cholinergiques peuvent être exprimés à distance du site de relargage (Houser, 1990 ; Kawai et al., 2007) et que le niveau d'ACh extracellulaire varie avec une dynamique différente d'un mécanisme de clairance synaptique classique (Mark et al., 1996 ; Hajnal et al., 1998 ; Laplante et al., 2004). Pour autant, on peut observer une transmission cholinergique phasique et rapide, de type synaptique, dans plusieurs régions du cerveau comme le cortex et l'habénula médiale (MHb) (Parikh et al., 2007 ; Zhang et al, 2016). De plus, l'importante activité d'hydrolyse de l'AChE interroge sur la concentration effective d'ACh qui peut diffuser dans le compartiment extracellulaire. Cependant, contrairement aux synapses glutamatergiques, il n'y a toujours pas d'évidence de spécialisation post-synaptique pour les synapses cholinergiques. Dans tous les cas, la signalisation cholinergique cérébrale va moduler l'excitabilité neuronale, la transmission et la plasticité synaptiques ainsi que la synchronisation de certains réseaux, à la manière d'un neuromodulateur (Picciotto et al., 2012).

Les neurones cholinergiques sont majoritairement regroupés au sein de structures sous-corticales innervant largement le système nerveux central, même s'il existe des interneurones cholinergiques locaux dans le cortex et le striatum (Woolf, 1991 ; Li, Yu et al., 2018). Parmi les centres cholinergiques, on compte les noyaux du pons (PPTg et LDTg pour noyau pédonculopontin et tegmentum latérodorsal, respectivement), la MHb et le télencéphale basal (*basal forebrain*). Cette riche innervation cholinergique endogène est impliquée dans la modulation de nombreuses fonctions physiologiques et cognitives comme les processus attentionnels, le sommeil et les niveaux d'éveil ou l'intégration de la récompense (Picciotto et al., 2012). Son dysfonctionnement a été associé à des troubles psychiatriques tels que l'addiction, la schizophrénie ou la dépression, ainsi que dans les maladies neurodégénératives d'Alzheimer et de Parkinson (Taly 2009 ; Anand et Singh, 2013). Elle constitue ainsi une cible prometteuse pour de nombreuses nouvelles thérapies.

Les fonctions de l'ACh reposent sur les deux types de récepteurs cholinergiques : les récepteurs nicotiniques (nAChR) et les récepteurs muscariniques, du nom de leurs agonistes identifiés comme tels par Dale en 1914 (Dale, 1914 ; Zhou et al., 2003). Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs à sept

domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Cette protéine G peut être excitatrice ($G_q$) ou inhibitrice ($G_i$) et permet ainsi de moduler de manière bidirectionnelle les activités neuronale et synaptique ainsi que la plasticité (Wess, 2003). Les nAChR sont des récepteurs ionotropes cationiques non-sélectifs avec lesquels la nicotine interagit. Ce sont ces récepteurs que j'ai spécifiquement étudiés durant mon travail de recherche.

## 1.2. Les récepteurs nicotiniques

### 1.2.1. Structure générale et allostérie des récepteurs nicotiniques

Les nAChR sont des récepteurs ionotropes (ou récepteurs canaux) de la famille des récepteurs à boucle cystéine (*cys-loop*), qui comprend également certains récepteurs de la sérotonine ($5\text{-}HT_3$), de la glycine et de l'acide γ-aminobutyrique (GABA et son récepteur $GABA_A$) (Changeux, 2010 ; Dani, 2015). Ils sont composés de 5 sous-unités dont l'architecture en rosette façonne un pore dans la membrane cellulaire, permettant le passage de cations (Hucho et Changeux, 1973 ; Morales-Perez et al., 2016). Chaque sous-unité nicotinique est composée de plus de 400 acides aminés, et comprend un large domaine amino-terminal extracellulaire où sont situés le site de liaison de l'agoniste et la boucle cystéine, 4 domaines transmembranaires et une boucle intracellulaire (Figure 1.2.A).

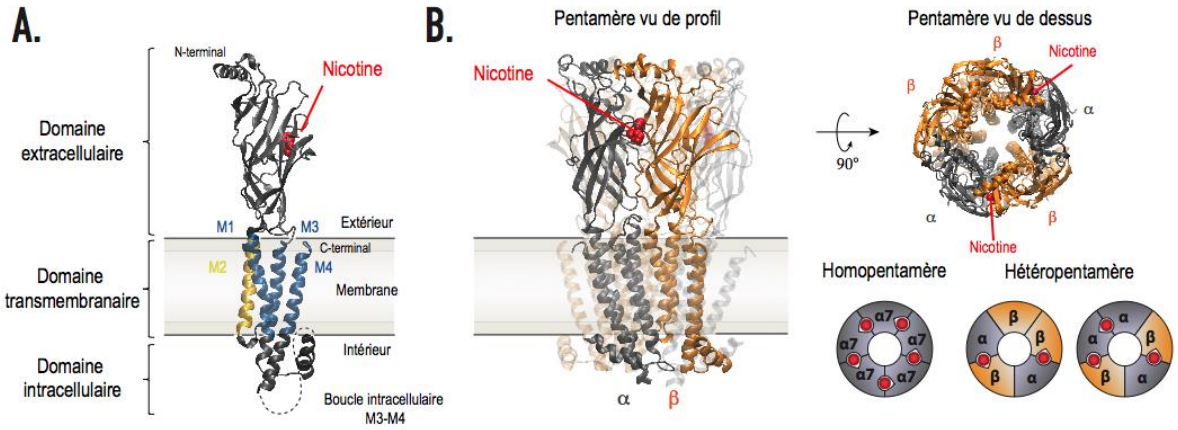



**Figure 1.2 – Structure des récepteurs nicotiniques :** (**A**) Structure d'une sous-unité de récepteur nicotinique (nAChR). Le segment transmembranaire M2 forme une paroi du canal. La structure de la boucle intracellulaire M3-M4 n'est pas résolue. (**B**) Structure tridimensionnelle aux rayons X du nAChR α4β2 (PDB ID 5KXI) vue de profil (gauche) et de dessus (haut droite) (issue de Morales-Perez et al., 2016). (Bas droite) Schéma de l'arrangement des sous-unités chez les nAChR homopentamériques (5 sous-unités α) et hétéropentamériques (assemblage de sous-unités α et β). Le site de liaison de l'agoniste se situe entre une sous-unité principale et une sous-unité complémentaire. *Figure adaptée de Durand-de Cuttoli et al., 2017.*

Il existe 17 gènes codant les sous-unités de nAChR chez les mammifères : 5 codant les sous-unités des nAChR présents à la jonction neuromusculaire et 12 codant les nAChR neuronaux (Deneris et al., 1991 ; Le Novère et Changeux, 1995). Les sous-unités exprimées dans le SNC sont réparties en 2 groupes : sous-unités α et sous-unités β. Le site de liaison de l'agoniste (ACh ou nicotine) est formé à la jonction entre une sous-unité α (dite « principale ») et une sous-unité « complémentaire » (α ou β) (Corringer et al., 2000 ; Gotti et al., 2007) (Figure 1.2.B). Les sous-unités principales et complémentaires portent chacune une partie du site de liaison de l'agoniste. L'exception concerne les sous-unités α7 et α9

qui portent les deux parties en même temps et peuvent donc former des homopentamères. Par ailleurs, α5 et β3 ne participent pas directement à la liaison des agonistes, mais peuvent modifier les propriétés du récepteur : ce sont des sous-unités dites « accessoires ».

Les nAChR sont des protéines allostériques qui existent sous différentes conformations (Changeux et Taly, 2008) (Figure 1.3). En l'absence d'agoniste, le récepteur est dans un état de repos où le canal est fermé et non conducteur. La liaison de l'agoniste sur le récepteur provoque l'ouverture du canal et permet le passage d'ions grâce à une réorganisation structurale au niveau de la lumière du canal (état activé). La présence prolongée d'agonistes entraîne une désensibilisation du récepteur (Katz et Thesleff, 1957 ; Quick et Lester, 2002) : l'agoniste reste lié au récepteur, mais le canal est fermé et le récepteur inactif. Selon le modèle allostérique de Monod-Wyman-Changeux, cette désensibilisation est liée à l'affinité préférentielle des agonistes nicotiniques pour l'état désensibilisé (Taly et al., 2009 ; Changeux, 2018). Leur présence en excès va donc activer le récepteur (cinétique rapide) puis tendre à le stabiliser dans l'état désensibilisé (cinétique lente). Dans leur état de repos, les nAChR ont en effet une affinité de l'ordre du micromolaire pour leurs agonistes, alors que dans l'état désensibilisé cette affinité est 1000 fois plus forte, de l'ordre du nanomolaire (Weber et al., 1975 ; Changeux, 2018). Une consommation forte et/ou prolongée de nicotine va ainsi participer à désensibiliser les nAChR neuronaux et perturber la signalisation cholinergique endogène (Chapitre 2).

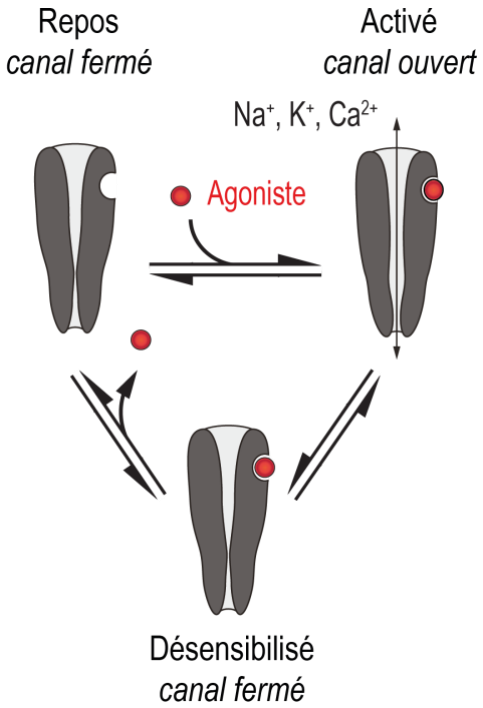



**Figure 1.3 – Transition allostérique des récepteurs nicotiniques :**
Le récepteur existe sous trois états à l'équilibre : repos, activé et désensibilisé.
*Figure adaptée de Durand-de Cuttoli et al., 2017*

1.2.2. Diversité des sous-unités nicotiniques et implications fonctionnelles

Le SNC compte 12 sous-unités nicotiniques : 9 sous-unités α (α2 à α10) et 3 β (β2 à β4) (Zoli et al., 2015), lesquelles s'assemblent en homopentamères (5 sous-unités α identiques) ou en hétéropentamères (combinaison d'α et β) et déterminent les propriétés biophysiques et pharmacologiques du récepteur mature. Il en résulte un grand nombre de combinaisons théoriques possibles, dont la majorité s'est révélée fonctionnelle en système hétérologue (Millar et Gotti, 2009). Au sein de cette diversité, certaines stœchiométries sont favorisées dans le SNC par la co-expression de leurs sous-unités dans les mêmes neurones, principalement les homopentamères α7 et les hétéropentamères α4β2* et α3β4* (l'astérisque signifiant que d'autres sous-unités peuvent entrer dans la composition du récepteur). Les hétéropentamères sont composés de deux paires α-β identiques (par exemple $(\alpha3\beta4)_2$) ou différentes (α6β2α4β2) et d'une sous-unité parmi α3, α4, α5, β2, β3 ou β4, permettant la formation de 2 ou 3 sites de liaison de l'agoniste sur le récepteur mature et une grande variabilité en termes de propriétés pharmacologiques (Figure 1.4.A). D'un point de vue phylogénétique, les sous-unités nicotiniques sont bien conservées. Notamment, on estime à environ 90% l'homologie de séquence entre le rongeur et l'humain pour une sous-unité donnée, favorisant l'aspect translationnel avec ce modèle (Le Novère et Changeux, 1995 ; Le Novère et al., 2002 ; Albuquerque et al., 2009).

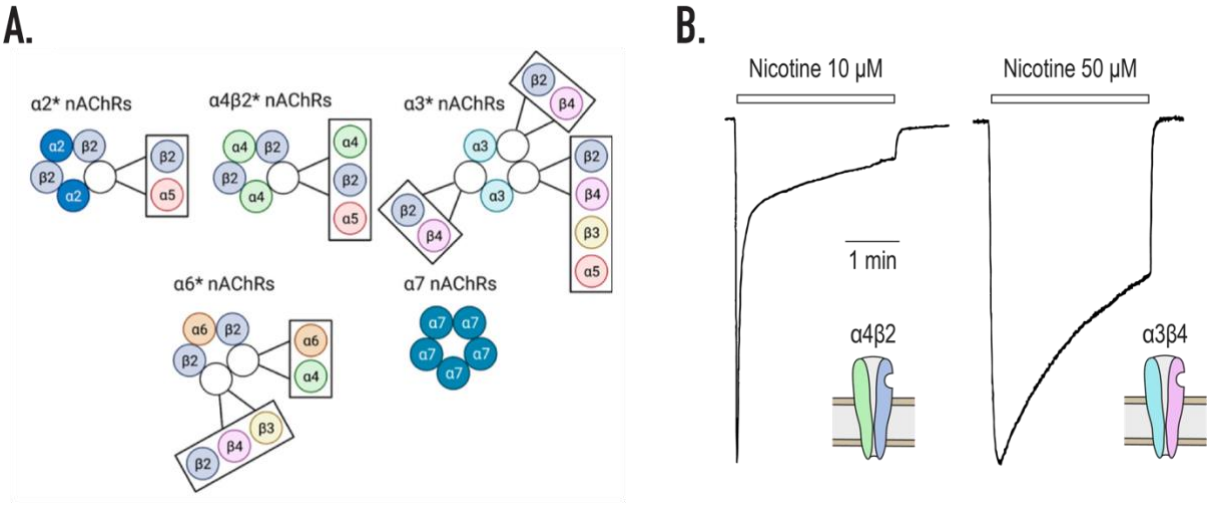



**Figure 1.4 Combinatoire des récepteurs nicotiniques :** (**A**) Principales stœchiométries connues des récepteurs nicotiniques dans le cerveau des mammifères. (**B**) Courants évoqués dans des oocytes exprimant les sous-unités nicotiniques α4 et β2 (gauche) ou α3 et β4 (droite) suite à l'application de nicotine. *Figure adaptée de Wills et al., 2022 et de Fenster et al., 1997.*

En fonction de la composition en sous-unités, les nAChR présenteront des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes en termes de cinétiques de réponse, de sensibilité aux différents agonistes endogène (ACh) et exogènes (dont la nicotine) et de perméabilité calcique (Fenster et al., 1997). A titre d'exemple, les homopentamères α7 présentent une faible affinité pour la nicotine, une forte perméabilité calcique et une cinétique de désensibilisation plus rapide que les autres sous-types. Parmi les hétéropentamères, on constate que les récepteurs α4* ont une plus forte affinité pour l'agoniste que les α3*, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une quantité plus faible de nicotine pour

déclencher l'ouverture de canal. La sous-unité β joue un rôle important dans la cinétique de désensibilisation : les récepteurs β2* désensibilisent plus rapidement que les β4* (Figure 1.4.B).

Ces propriétés distinctes sous-tendent des fonctions physiologiques propres à chaque sous-type de nAChR en fonction des circuits où ils sont exprimés. Notamment, la sensibilité à la nicotine et la localisation spatiale des nAChR β2* et β4* constituent des données déterminantes dans l'interprétation de leurs rôles respectifs au cours de la consommation de nicotine (Chapitre 5). Ces éléments mettent l'accent sur la nécessité d'étudier le rôle de sous-unités précises exprimées dans des structures définies, sur différentes échelles de temps (réponse aiguë, impact des cinétiques de désensibilisation longue…). Cette perspective se heurte à la spécificité relativement faible de la pharmacologie existante pour cibler les différents sous-types de nAChR. En effet, il existe une forte homologie de séquence entre les sous-unités nicotiniques : les ligands spécifiques de certains récepteurs (hétéropentamériques principalement) pourront générer des effets *off-target* en-dehors de fenêtres de concentration précises. Cette difficulté est exacerbée dans les études *in vivo*, où connaître les concentrations effectives des agents pharmacologiques administrés au niveau des structures cibles ainsi que leur propension à diffuser hors de ces structures, demeure d'une complexité notable. L'un des objectifs de mes travaux a consisté à développer des outils pharmacologiques permettant de cibler spécifiquement ces nAChR dans des structures précises (Chapitre 5, Première publication).

### 1.2.3. Distribution cellulaire et anatomique des récepteurs nicotiniques

Au niveau cellulaire, les nAChR peuvent être exprimés dans tous les compartiments du neurone : aux niveaux pré-synaptique, somato-dendritique et post-synaptique (Wonnacott, 1997 ; Laviolette et van der Koy, 2004). Ils peuvent être localement présents au niveau des axones, tels ceux de la MHb vers le noyau interpédonculaire (Passlick et al., 2018). La localisation cellulaire impacte le rôle fonctionnel du récepteur (Dani, 2001 ; Dajas-Bailador et Wonnacott, 2004). Les nAChR pré-synaptiques sont par exemple impliqués dans la régulation du relargage d'autres neurotransmetteurs et dans la plasticité synaptique. Les nAChR somato-dendritiques et post-synaptiques vont par leur activation entrainer un flux entrant de cations, dont du calcium, et ainsi augmenter l'excitabilité du neurone et participer au développement de plasticité neuronale.

Les nAChR sont présents dans la majorité des circuits neuronaux, mais leurs densité et composition sont variables d'une structure à l'autre. (Gotti et al., 2006 ; Zoli et al, 2015). Les nAChR α4β2* représentent le sous-type le plus exprimé dans le SNC, notamment dans le système mésocortico-limbique (Chapitre 3). Les nAChR α3β4* sont particulièrement nombreux dans le système nerveux périphérique (on les surnomme parfois « nAChR ganglionnaires ») et ont une distribution très restreinte dans le SNC (Kemp et Morley, 1986). Ils sont notamment fortement exprimés dans la voie MHb-IPN, qui présente par ailleurs l'une des plus fortes diversité et densité de nAChR du cerveau, mais sont quasi absents dans le reste du cerveau (Chapitre 4).

Au final, le rôle physiologique d'une sous-unité nicotinique dépend donc de son expression moléculaire (autres sous-unités avec lesquelles elle s'associe), cellulaire (présence sur des neurones activateurs, inhibiteurs, de projection, etc.) et de son compartiment neuronal (pré- ou post-synaptique). La complexité de la transmission nicotinique dans le cerveau se traduit ainsi à plusieurs échelles. La nicotine peut engager l'ensemble de circuits exprimant des nAChR et détourner leurs fonctions endogènes, participant à la mise en place de l'addiction.

# Chapitre 2

# Neurophysiologie de la réponse à la nicotine

La nicotine est l'une des substances addictives les plus largement utilisées dans le monde (GBD 2015 Tobacco Collaborators, 2017). De la première prise (action aiguë) au contexte de consommation chronique, la nicotine va perturber l'activité de nombreux circuits et induire des modifications à long terme du niveau moléculaire et cellulaire, jusqu'au comportement de l'individu. L'ensemble de ces effets va permettre la mise en place, puis le maintien, de la dépendance tabagique.

## 2.1. L'addiction à la nicotine

L'addiction est une maladie psychiatrique complexe (Benowitz, 2010). Dans la 5ème édition du DSM (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders* : DSM-5, 2013), elle est qualifiée par l'appellation substance use disorder et recoupe une large gamme de symptômes dont l'expression est variable en fonction de l'individu, de son patrimoine génétique, de son environnement, de la substance concernée, etc. L'addiction est une pathologie évolutive comportant plusieurs phases. La première prise a souvent une portée déterminante dans l'évolution de la maladie. Plusieurs études tendent à montrer que des réactions aversives fortes lors des premières consommations de nicotine seraient inversement corrélées au développement d'un usage habituel de tabac, même si la question reste débattue (Sartor et al., 2010 ; de Wit et Phillips, 2012). Si cette prise est répétée, l'individu évoluera vers un usage contrôlé dit « récréationnel », c'est-à-dire une consommation occasionnelle n'entraînant pas un besoin de prises rapprochées. Cette période s'accompagne d'une motivation accrue dans la recherche et la prise de la substance concernée, le plus souvent dans des contextes spécifiques (période de stress ou d'anxiété, évènement social…). L'escalade d'un usage récréationnel vers la perte de contrôle ne va s'opérer que chez une partie des consommateurs. La consommation devient régulière et compulsive, c'est-à-dire caractérisée par l'incapacité à s'arrêter en dépit de la connaissance des conséquences négatives pour sa santé, son entourage et le coût financier associé. Plus celle-ci dure, plus le phénomène de tolérance ou d'accoutumance se développe : l'individu doit consommer davantage pour obtenir des effets équivalents à ceux de ses premières prises. Des périodes d'abstinence prolongées (volontaires ou contraintes) vont induire des symptômes de manque désagréables et dont l'arrêt constitue une source de motivation pour la reprise de la consommation. Dans le cas de la nicotine, ces symptômes peuvent aussi bien être d'ordre physique (bradycardie, gêne intestinale…) qu'émotionnel, se traduisant entre autres par de l'irritabilité, de l'anxiété ou des troubles de la concentration (Hughes et Hatsukami, 1986 ; Antolin-Fontes et al., 2015). En cas d'arrêt du tabac, le fumeur peut aussi entrer dans un cycle l'entraînant entre tentatives de sevrage et rechutes (reprise de la consommation après une période d'abstinence). Ainsi, 80% des fumeurs qui tentent de décrocher sans aide rechutent dans le premier mois suivant l'arrêt (Benowitz, 2010).

La prise de nicotine entraîne un sentiment subjectif de « plaisir » évalué positivement par l'individu et constituant une récompense. Cette récompense augmente la probabilité de réitération du

comportement qui en a permis l'obtention, ce qui caractérise le renforcement. Paradoxalement, les effets psychoactifs de la nicotine, qui participent à son aspect récompensant, sont assez faibles. Cependant, l'effet immédiat via la prise orale, ajouté à la puissance des symptômes de manque associés à une période d'abstinence, constituent une forte source de motivation pour continuer à fumer et représentent ainsi un facteur important de renforcement (renforcement primaire). Plusieurs études ont également montré que la nicotine agit comme un « activateur » de renforcement d'autres stimuli dans l'environnement, participant à consolider le phénomène d'association avec la drogue (« *je fume toujours en buvant mon café le matin, et j'ai donc autant envie de boire mon café que de fumer pendant* ») (Caggiula et al., 2002a et b ; Palmatier et al., 2006 ; Garcia-Rivas et Deroche-Gamonet, 2019). De même, un stimulus associé à la nicotine peut devenir un indice renforçant en tant que prédicteur d'une prise de drogue, et ainsi inciter à consommer (« *je sens l'odeur du café, j'ai envie de fumer* ») (Cohen et al., 2005 ; Benowitz, 2010). Ces stimuli « conditionnés », c'est-à-dire associés à la nicotine, constituent de puissants facteurs de rechute, même après la dissipation des symptômes de manque (Kauer et Malenka, 2007). En outre, la nicotine est commercialisée légalement et son utilisation n'est pas sujette au même degré de stigmatisation sociale que d'autres drogues d'abus, ce qui en facilite l'accès et la consommation. Il y a ainsi une convergence de différentes formes de renforcement induites par la nicotine qui précipite l'entrée dans l'addiction.

## 2.2. Action aiguë de la nicotine

La nicotine dans ses différentes formes (cigarettes classiques ou électroniques, gomme…) est absorbée dans le sang puis va rapidement passer la barrière hémato-encéphalique et interagir avec les nombreux nAChR neuronaux (Figure 2.1). La liaison de la nicotine sur son récepteur entraîne l'ouverture du canal et permet une entrée de cations ($Na^+$, $Ca^{2+}$) dans le neurone, modulant une variété d'effets. Le premier et le plus direct est la dépolarisation du neurone, entraînant une modulation de son excitabilité et une augmentation transitoire de sa fréquence de décharge (Pidoplichko et al., 1997 ; Tolu et al., 2013). Cette activation au niveau somatique augmente la libération de neurotransmetteurs, potentiellement amplifiée par la liaison directe de la nicotine sur les nAChR présents sur les terminaisons axonales. La potentialisation de la transmission dopaminergique par la nicotine constitue le substrat neurobiologique majeur des processus de renforcement à cette drogue (Chapitre 3). De manière indirecte, la nicotine peut également engager plusieurs cascades intracellulaires liées à des kinases sensibles au calcium (Dajas-Bailador et al., 2002 ; Steiner et al., 2007). Cet effet passe par l'entrée directe de calcium via les nAChR et/ou par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants due à la dépolarisation entraînée par les nAChR (Shen et Yakel, 2009). La signalisation calcique ainsi induite participe à la mise en place d'une plasticité synaptique liée à la drogue (Grundey et al., 2018).

Une prise de nicotine équivalente à une cigarette entraînerait également une désensibilisation des récepteurs, déjà mise en évidence chez le rat (Pidoplichko et al., 2004). Comme nous l'avons vu plus tôt, la présence en excès d'agonistes dans le milieu extracellulaire stabilise les nAChR dans un état désensibilisé (Chapitre 1.2.). Ce phénomène est favorisé par la perturbation exogène induite par la nicotine par rapport à la seule signalisation cholinergique endogène. L'ACh une fois libérée est

rapidement et localement dégradée par l'AChE en choline, qui sera recapturée dans le neurone cholinergique. Son action est donc relativement transitoire. La nicotine, quant à elle, a une demi-vie plus longue, d'environ deux heures chez l'homme et un peu plus de six minutes chez la souris (Matta et al., 2006), et est métabolisée hors du cerveau par le foie. Ainsi, comparée à l'ACh, la nicotine persiste davantage dans le milieu extracellulaire et favorise une désensibilisation des nAChR pouvant durer plusieurs dizaines de minutes *in vitro* (Pidoplichko et al., 1997 ; Gentry et al., 2003). Malgré le manque de preuves directes de la dynamique de ce phénomène *in vivo*, une désensibilisation des récepteurs perturberait ainsi la signalisation cholinergique endogène même après le moment de la prise.

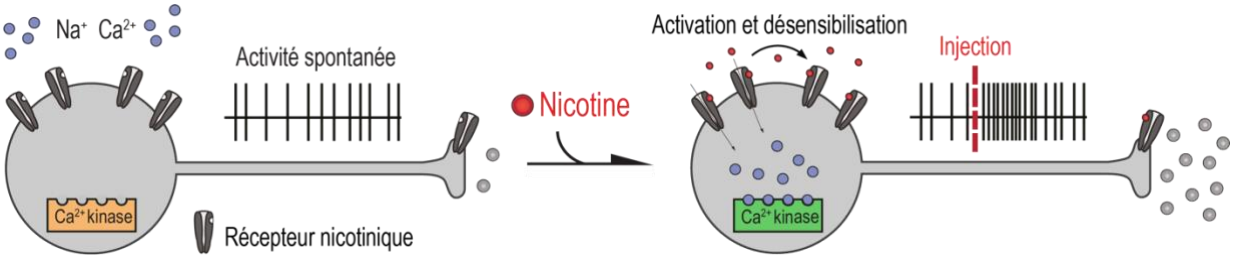



**Figure 2.1 Effets aigus de la nicotine sur un neurone :** La nicotine se lie aux récepteurs nicotiniques pour induire une entrée de cations dans le neurone, permettant sa dépolarisation, l'engagement de cascades intracellulaires ainsi qu'une augmentation de son activité et de la libération de neurotransmetteurs.

## 2.3. Conséquences d'une exposition chronique à la nicotine

Outre les effets liés à une prise aiguë, l'exposition prolongée à la nicotine induit de nombreuses régulations homéostatiques à différentes échelles de temps (Lester et al., 2009). La désensibilisation des nAChR sera d'autant plus prononcée et stabilisée que la prise de nicotine est répétée. En parallèle, on observe la mise en place d'un mécanisme d'*upregulation*, c'est-à-dire une augmentation du nombre de nAChR de haute affinité (α4β2*) adressés à la membrane, lors d'une exposition chronique. L'*upregulation*, dans un cadre d'homéostasie, constituerait ainsi un mécanisme permettant d'assurer une fonction cholinergique normale, en augmentant le nombre de récepteurs quand la plupart sont désensibilisés. Les premières études chez le rat et la souris ont ainsi montré qu'une administration chronique de nicotine conduisait à une augmentation du marquage à l'acétylcholine et la nicotine tritiées (Schwartz et Kellar, 1983 ; Marks et al., 1983). Ces résultats ont été confirmés chez l'humain, où des marquages post-mortem ont révélé une quantité supérieure de nAChR dans plusieurs zones du cerveau de fumeurs, comparés à une population contrôle (Benwell et al., 1988 ; Perry et al., 1999). L'un des mécanismes qui pourraient expliquer ce phénomène serait une action intracellulaire de la nicotine pour stabiliser les nAChR et aider à leur maturation (Corringer et al., 2006, Srinivasan et al., 2011). La nicotine peut en effet traverser les membranes plasmiques lorsqu'elle est non chargée et ainsi agir comme molécule chaperonne sur les nAChR de haute affinité, augmentant leur présence à la membrane et diminuant leur taux de *turnover* (Corringer et al., 2006 ; Govind et al., 2009 ; Melroy-Greif et al., 2016). Ce mécanisme favorise particulièrement les récepteurs de stœchiométries $(\alpha4)_2(\beta2)_3$, environ cent fois plus affins pour les agonistes que $(\alpha4)_3(\beta2)_2$ (Nelson et al., 2003 ; Colombo et al., 2013). Cette augmentation du nombre de récepteurs peut se maintenir jusqu'à trois mois après le sevrage tabagique

(Cosgrove et al., 2009). L'exposition chronique à la nicotine provoque donc une désensibilisation, une *upregulation* et une modification de la stœchiométrie des nAChR à long terme.

Ces mécanismes seraient concomitants chez le fumeur. Au cours de la journée, un individu fume régulièrement afin de maintenir son taux de nicotine sanguin à un plateau et éviter ainsi les effets de manque liés à sa diminution. Ce taux, d'environ 10 à 50 ng/mL, est au moins dix fois supérieur à la dose associée à une occupation de 50% des nAChR α4β2* (Brody et al., 2006 ; Matta et al., 2007). On peut ainsi estimer que la concentration de nicotine circulante chez un fumeur maintient les nAChR dans un état désensibilisé. Lorsqu'elle diminue après une période d'abstinence, par exemple pendant la nuit ou lors d'une tentative d'arrêt du tabac, les nAChR sortent de l'état désensibilisé, mais l'*upregulation* induite par l'exposition chronique n'est pas résorbée. Le fumeur se retrouve dans une situation « d'hypercholinergie » : la forte augmentation du nombre de nAChR disponibles à la membrane provoquerait une sur-activation de la transmission nicotinique (Le Houezec, 2003). Cette surstimulation pourrait en partie expliquer l'émergence de symptômes de manque suite à un sevrage tabagique. Ce cycle *upregulation* / désensibilisation des nAChR serait ainsi un acteur clé dans la régulation de consommation de nicotine.

### 2.4. La balance des effets renforçants et aversifs de la nicotine dans sa consommation

Comme nous l'avons vu, la nicotine présente des propriétés récompensantes qui vont promouvoir le renforcement à la drogue et la mise en place de l'addiction. Cependant, la nicotine induit également des effets « négatifs » ou aversifs qui tendent à limiter sa consommation. La nicotine a un goût amer et la fumée de cigarette a des propriétés irritantes (Carpenter et al., 2007 ; Mangold et al., 2008). Contrebalancer ces aspects sensoriels négatifs est un enjeu crucial pour l'industrie du tabac. La modification de la composition de la cigarette (mélange de tabac, papier) et l'ajout d'additifs concourent au développement d'un sentiment plaisant par le fumeur et à son adhésion au produit, passée la réaction initiale souvent désagréable (Carpenter et al., 2007 ; D'Silva et al., 2018 ; Harris et al., 2019). L'administration de fortes doses de nicotine peut induire des états dysphoriques incluant nausées et vertiges chez l'homme ainsi que des comportements d'évitement chez l'animal (Henningfield et al., 1983 ; Risinger et Oakes, 1995 ; Jensen et al., 2015). Ces effets aversifs déclenchés lors de la consommation vont exercer un contrôle négatif sur celle-ci afin de la limiter et s'opposer au renforcement. Ils constituent ainsi un axe de recherche prometteur pour le développement de stratégies contre le tabagisme. Au sein des effets aversifs, il faut distinguer ceux évoqués ci-avant liés à une prise aiguë, qui vont s'opposer à la consommation, de ceux liés au manque. L'aversion liée au manque aura plutôt tendance à promouvoir la consommation afin d'atténuer les effets négatifs ressentis. Aussi dans ce manuscrit, quand on parlera d'effets aversifs, on se réfèrera à ceux liés à une prise aiguë sans considérer les états de manque, sauf mention contraire.

La dose de nicotine administrée joue un rôle capital dans la balance entre ces deux effets. Ainsi, un animal préfèrera ou évitera un compartiment associé à de la nicotine en fonction de la dose utilisée

pour le conditionnement (Risinger et Oakes, 1995 ; Jackson et al., 2010 ; Liu et al., 2022a). La nicotine exercera également un effet anxiolytique aux faibles doses (0,1 mg/kg ou moins) et un effet anxiogène à une dose supérieure (File et al., 1998 ; Picciotto et al., 2002 ; Kutlu et Gould, 2015). Ces effets antagonistes sont concomitants. Ainsi, une unique dose de nicotine administrée de manière identique (0,5 mg/kg injecté en intrapéritonéal) se montre selon le test à la fois renforçante (Tapper et al., 2004 ; Durand-de Cuttoli et al., 2018) et anxiogène (Ouagazzal et al., 1999 ; Nguyen et al., 2021). On ne peut donc pas considérer qu'une dose soit renforçante ou aversive dans l'absolu : elle peut induire des effets mixtes selon les conditions de la prise de nicotine.

Quand on propose à un sujet de s'auto-administrer différentes doses de nicotine en réponse à une action répétable, comme par exemple un appui sur un levier, on peut représenter son comportement de consommation par une courbe dose-réponse « en U inversé » (Figure 2.2) (Ashton et al., 1980 ; Picciotto, 2003).

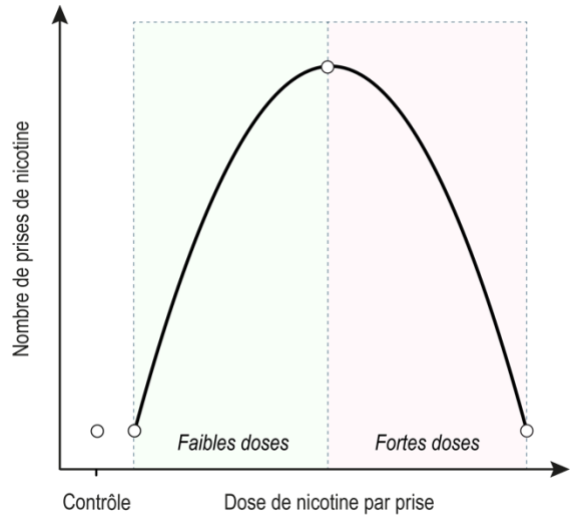



**Figure 2.2 – Comportement d'auto-administration à la nicotine :** Le nombre de prises de nicotine en fonction de la dose proposée par prise décrit une courbe en forme de « U inversé ». Le point contrôle représente le nombre de prises quand on propose au sujet une solution contrôle sans drogue.

Celle-ci mesure le nombre d'appuis de levier (équivalent au nombre de prises de nicotine) en fonction de la dose proposée, et non la quantité effectivement consommée par l'individu. Ce modèle repose sur l'idée d'une balance entre effets renforçants et aversifs de la nicotine en fonction de la dose. Jusqu'à un certain seuil, la quantité de nicotine est trop faible pour induire une réponse et ne semble donc ni renforçante ni aversive : l'individu n'est pas motivé à s'auto-administrer (comportement similaire à la situation avec une solution contrôle). Une fois le seuil franchi, l'aspect récompensant de la nicotine motive l'individu à s'auto-administrer de plus en plus pour en amplifier l'effet. Quand la dose de nicotine devient élevée, le délai entre deux prises va augmenter tandis que leur nombre global va diminuer. Ce comportement met potentiellement en jeu deux mécanismes, à savoir une aversion lors de prises trop importantes de nicotine que l'individu évite par une titration de sa consommation et une forme de satiété : quand la dose visée dans l'organisme est atteinte, l'individu ne consomme plus que pour la maintenir au même niveau. Les doses délimitant les différentes parties de la courbe vont dépendre de

l'individu, du mode d'administration de la drogue et de l'historique d'exposition à celle-ci. Cette représentation véhicule la notion d'une dichotomie dans les doses de nicotines : les « faibles » doses seraient renforçantes, alors que les « fortes » doses seraient aversives (Fowler et Kenny, 2014 ; Wills et al., 2022). Cette conception, qui doit être nuancée, influence néanmoins l'interprétation des expériences de préférence et de consommation chez les modèles animaux ainsi que leurs bases neurales. Ainsi, un modèle explicatif (Wills et al., 2022) soutient que les récepteurs de haute affinité contenant la sous-unité β2, fortement exprimés dans la voie mésocortico-limbique (Chapitre 3) vont répondre aux faibles doses et induire le renforcement à la drogue. Les plus fortes doses activeraient en outre les récepteurs contenant β4, quasi-exclusivement exprimés dans la voie MHb-IPN, pour induire l'aversion (Chapitre 4). Cette théorie sera discutée et remise en question dans le chapitre 5.

## 2.5. Modéliser l'addiction à la nicotine chez le rongeur : paradigmes comportementaux

Les addictions sont l'une des premières causes de mort évitables dans le monde, justifiant un intérêt précoce à les modéliser chez l'animal afin d'en approfondir l'étude. Les modèles animaux sont un outil crucial pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent la vulnérabilité et les mécanismes des addictions, car ils permettent des études longitudinales standardisées pouvant distinguer les phénotypes préexistants et les adaptations induites par les drogues. Leur intérêt tient également dans les techniques expérimentales qu'ils permettent de déployer par rapport à la clinique, où les patients sont par définition déjà à un stade avancé de la maladie. Ces derniers ont en outre souvent des historiques variables en termes de période d'initiation et de durée de consommation, de quantité et de type de drogues utilisées (par ex. fumeurs consommant de l'alcool), rendant plus difficile encore d'isoler les mécanismes séquentiels et les adaptations induites dès la première prise. Chez le rongeur, une multitude de modèles et paradigmes comportementaux complémentaires ont été développés afin d'étudier plus précisément les étapes de l'addiction telles qu'exprimées chez l'humain (Venniro et al., 2020). Les modèles classiquement utilisés dans le cas de la nicotine et qui sont évoqués dans l'introduction et/ou les résultats comportent l'auto-administration intraveineuse, la préférence de place conditionnée (CPP : C*onditioned Place Preference*) et les paradigmes de choix à deux bouteilles (*two-bottle choice*) (Figure 2.3).

L'auto-administration est un paradigme puissant et adaptable pouvant modéliser plusieurs aspects de l'addiction (motivation, prise de drogue malgré des conséquences négatives, etc.) (Thomsen et Caine, 2007) (Figure 2.3.A). On installe sur le sujet un cathéter intraveineux temporaire ou permanent, ou alternativement un système d'injection intra-crânial, puis on le place dans un environnement où une action (par exemple, appuyer sur un levier ou se rendre à un endroit donné d'un open field) va déclencher l'administration de drogue. Les modalités du test peuvent être modifiées en fonction de la question posée. Par exemple, la drogue peut être administrée après un nombre croissant d'appuis sur le levier afin de tester la motivation des sujets. Ce paradigme a permis de montrer que de nombreuses espèces peuvent s'auto-administrer de la nicotine, dont les souris (Stolerman et al., 1999), les rats (Corrigall et Coen, 1989 ; DeNoble et Mele, 2006), les chiens (Risner and Goldberg, 1983), les primates (Goodwin et al., 2015)

et les humains (Henningfield et al., 1983 ; Harvey et al., 2004 ; Jensen et al., 2015). Cependant, ce modèle comporte de nombreuses difficultés d'un point de vue technique, dont l'implantation et le maintien dans le temps d'un cathéter chez un petit animal comme la souris, ainsi qu'une durée où l'animal peut être relié au système d'injection souvent limitée. Pour répondre aux questions au centre de ma thèse, j'ai utilisé les deux autres paradigmes, à savoir la CPP pour modéliser l'aspect renforçant de la nicotine chez une souris naïve, et le *two-bottle choice* pour étudier les stratégies de consommation chez des individus exposés en continu à la drogue.

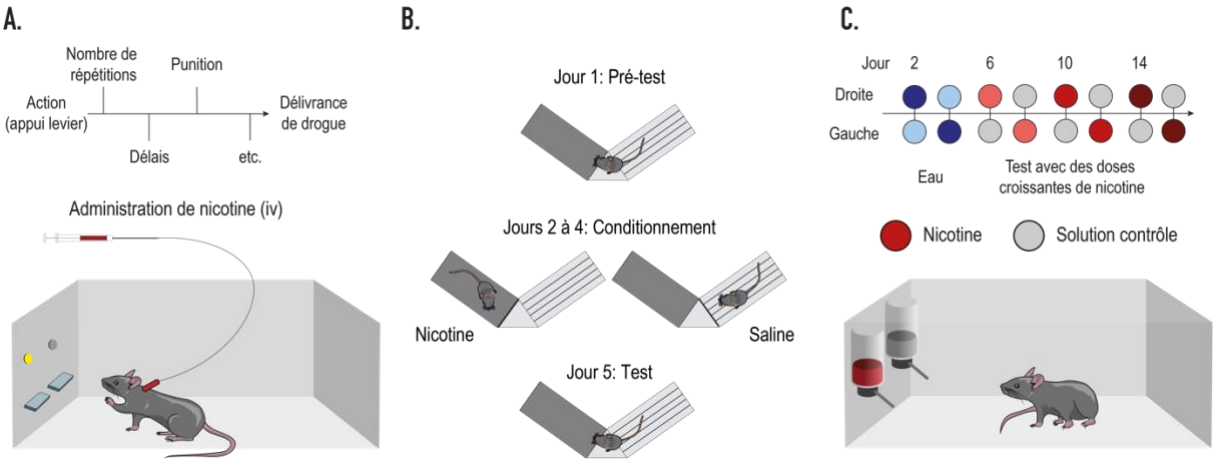



**Figure 2.3 - Paradigmes comportementaux pour modéliser l'addiction :** (**A**) Exemple de cage d'auto-administration. L'animal appuie sur un levier pour obtenir une injection intraveineuse de nicotine. Les règles déterminant la délivrance de drogue peuvent être adaptées selon la question posée (augmenter le nombre de répétitions nécessaires pour tester la motivation du sujet, administrer une punition de type choc électrique en même temps que la drogue pour étudier le comportement de consommation compulsive, etc.). (**B**) Paradigme de préférence/d'aversion de place conditionnée. (**C**) Paradigme de choix à deux bouteilles.

Le test de CPP sert à évaluer le renforcement en mesurant l'association entre une drogue d'abus (ou autre stimulus récompensant) et le contexte dans lequel elle a été administrée (Grabus et al., 2006, McKendrick et Graziane, 2020) (Figure 2.3.B). Le paradigme utilise un environnement à deux compartiments que l'animal peut distinguer (différence de texture au sol et d'indices visuels). L'un de ces compartiments est associé pendant un ou plusieurs essais à la nicotine et l'autre, à une injection contrôle. Lors du test, après le conditionnement, l'animal est libre d'explorer l'intégralité de l'environnement et le temps qu'il passe dans chacun des compartiments est mesuré. Si la drogue a eu un effet renforçant, l'association pavlovienne implique qu'il ait en mémoire l'effet récompensant de la drogue lorsqu'il se trouve dans le compartiment (contexte) apparié, se traduisant par une augmentation du temps qu'il y passe. Une variante existe pour mesurer l'effet aversif d'un stimulus (CPA *: Conditioned Place Aversion*), où l'on teste si l'animal passe moins de temps dans le contexte lié au stimulus. Il faut noter que dans ce paradigme l'animal n'a pas le choix du moment ou de la quantité de drogue qu'il reçoit. Le protocole de CPP nous a permis d'interroger le seuil de renforcement à la nicotine et le rôle de l'IPN et de la sous-unité nicotinique β4 dans cette sensibilité à la drogue (Première publication).

Dans le paradigme de choix à deux bouteilles, les souris isolées ont accès en continu à deux biberons, l'un contenant de la nicotine à des concentrations variables dans une solution contrôle et l'autre uniquement la solution contrôle (Pogun et Collins, 2012) (Figure 2.3.C). Le contrôle peut être soit

de l'eau, soit une solution comportant de la saccharine afin de masquer le goût amer de la nicotine. La quantité consommée dans chaque biberon est mesurée au cours du temps, et la position des biberons est inversée régulièrement afin de limiter l'impact d'éventuels biais de côté. Ce design permet un accès libre (choix de consommer ou d'éviter la drogue), illimité et en continu à la drogue, bien qu'il faille garder à l'esprit les facteurs confondants liés à la prise orale de drogue (délais entre la prise et les effets sur le SNC et donc mise en place d'un renforcement). Parmi les paramètres analysables, on compte la préférence individuelle pour l'un des biberons, ainsi que la quantité totale de nicotine consommée en fonction de la dose présentée à l'animal et de son historique de consommation. Ce paradigme nous a permis de faire le lien entre stratégie de consommation et altérations moléculaires et cellulaires dans l'IPN (Seconde publication).

Nous avons vu dans ce chapitre que la consommation de nicotine a de nombreuses conséquences à différentes échelles de temps. Ses effets sont dépendants du contexte et de l'historique de la prise de drogue. Nous nous intéresserons, dans la suite de l'introduction, aux bases neurales des mécanismes endogènes détournés par la nicotine, et aux nAChR impliqués. Nous aborderons d'abord les circuits mésocortico-limbiques et leurs rôles dans le renforcement aux drogues (Chapitre 3). Puis nous étudierons la voie habénulo-interpédonculaire et son action dans l'aversion et la régulation de la consommation de nicotine (Chapitre 4). Nous discuterons enfin des liens existants entre ces voies dans la réponse et l'émergence d'effets antagonistes de la nicotine (Chapitre 5).

# Chapitre 3

# Circuits dopaminergiques et renforcement à la nicotine

## 3.1. La dopamine

La dopamine (DA) est un neuromodulateur dont la présence au sein du cerveau a été identifiée pour la première fois dans les années 1950 (Carlsson et al., 1957 ; Montagu, 1957). La DA fait partie de la famille des catécholamines, qui comporte également l'adrénaline et la noradrénaline. Elle est synthétisée à partir de la L-tyrosine, précurseur commun des catécholamines, par l'action successive des enzymes tyrosine hydroxylase (TH) et dihydroxyphénylalanine (DOPA) décarboxylase (Meiser et al., 2013). Une fois libérée, la DA va interagir avec ses récepteurs avant d'être recapturée au niveau des terminaisons dopaminergiques grâce à son transporteur (DAT). Les marqueurs TH et DAT peuvent ainsi servir au ciblage génétique des neurones catécholaminergiques et dopaminergiques, respectivement. La DA agit sur deux familles de récepteurs métabotropes, les récepteurs de type D1 et ceux de type D2, qui ont une action respectivement excitatrice et inhibitrice sur les neurones (Girault et Greengard, 2004 ; Beaulieu et Gainetdinov, 2011). Les récepteurs de type D1 (récepteurs D1 et D5) sont couplés à une protéine $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha Olf}$ et activent l'adénylate cyclase et la cascade intracellulaire associée. A l'inverse, les récepteurs de type D2 (récepteurs D2, D3 et D4) sont couplés à une protéine $G_{\alpha i/o}$ et vont inhiber l'adénylate cyclase.

Parmi les foyers de neurones dopaminergiques, on distingue deux centres majeurs, situés dans le mésencéphale, qui innervent une grande variété de structures cérébrales : la substance noire *pars compacta* (SNc) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Björklund et Dunnett, 2007). La SNc projette principalement sur le striatum dorsal et les cortex, et appartient plus largement aux circuits des ganglions de la base (Yetnikoff et al., 2014). Elle participe notamment au contrôle de la motricité et de la mémoire procédurale, ainsi qu'à la formation d'habitudes (Lanciego et al., 2012 ; Lipton et al., 2019). La dégénérescence des neurones DA dans la SNc est, avec la formation d'agrégats intracellulaires d'α-synucléine, la caractéristique principale de la maladie de Parkinson (Poewe et al., 2017). La VTA quant à elle innerve plusieurs structures du cerveau antérieur dont le striatum ventral ou *nucleus accumbens* (NAc), les cortex frontaux et l'amygdale (Fuxe, 1965 ; Beier et al., 2015). Elle est impliquée dans la gestion de la récompense et de la motivation, les processus de renforcement et la prise de décision (Bromberg-Martin et al., 2010). Cette dichotomie n'est cependant pas absolue : une partie des neurones dopaminergiques de la SNc répond aux récompenses (Coddington et Dudman, 2018), et une population dans la VTA joue un rôle dans la motricité (Fischbach-Weiss et al., 2018). La VTA joue un rôle central dans l'initiation et le maintien de la prise de drogue. Elle a donc constitué l'une des structures auxquelles je me suis particulièrement intéressé.

## 3.2. Anatomie des voies dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale

La VTA est une structure hétérogène qui comporte trois populations de neurones : une majorité de neurones dopaminergiques (60 à 70%), des neurones GABAergiques répartis en interneurones et neurones de projection (30% environ) et une faible population de neurones glutamatergiques (moins de 5%) (Yamaguchi et al., 2007 ; Nair-Roberts et al., 2008 ; Morales et Margolis, 2017). Cette ségrégation n'est cependant pas absolue et plusieurs expériences ont démontré une co-expression de ces neurotransmetteurs dans certains neurones (Trudeau et al., 2014). Par exemple, une fraction des neurones dopaminergiques exprime aussi un transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT2) et peut ainsi co-libérer du glutamate (Dal Bo et al., 2004 ; Stuber et al., 2010). De même, certains neurones dopaminergiques co-relarguent du GABA et de la DA (Tritsch et al., 2012 et 2014). Ces mécanismes mettent en évidence la signalisation complexe induite par une activation de neurones dopaminergiques dans la VTA.

La diversité des rôles aussi bien cognitifs qu'émotionnels de la VTA est sous-tendue par une architecture complexe (Beier et al., 2015 ; Poulin et al., 2018). La VTA cible principalement des structures du système limbique (on parle de circuit mésolimbique) et des structures corticales (circuit mésocortical) (Laviolette, 2007 ; Schultz, 2007) (Figure 3.1.A). La voie mésolimbique VTA-NAc opère un contrôle bidirectionnel dans le renforcement et l'anticipation des récompenses. En effet, les neurones projetant vers le NAc présentent un gradient médio-latéral d'un point de vue anatomique et fonctionnel : les neurones de la VTA médiale projettent préférentiellement vers le NAc médial et ceux de la VTA latérale vers le NAc latéral (Lammel et al., 2008, 2012, 2014). Ces sous-réseaux participent à signaler respectivement les stimuli aversifs et récompensants. Comme nous le verrons par la suite, cette transmission dopaminergique complexe dans le NAc est fondamentale dans la transmission des propriétés antagonistes de la nicotine et la mise en place des addictions.

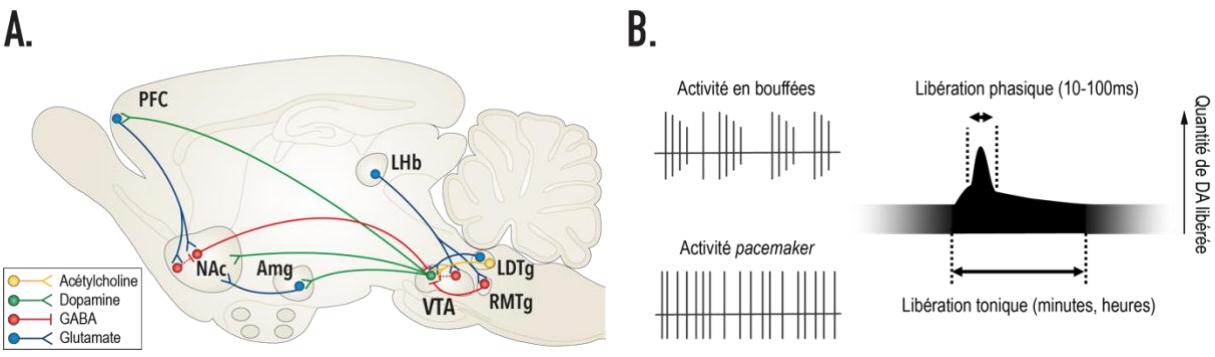



**Figure 3.1 – Anatomie et activité du système dopaminergique de la VTA :** (**A**) Représentation schématique des principales afférences et efférences de la VTA. Amg : amygdale, LDTg : tegmentum latérodorsal, LHb : habénula latérale, PFC : cortex préfrontal, NAc : noyau Accumbens, RMTg : tegmentum rostromédial, VTA : aire tegmentale ventrale. *Figure adaptée de Russo et Nestler, 2013.* (**B**) Schéma des patrons de décharge spontanée des neurones dopaminergiques *in vivo* et des différents modes de libération de la dopamine.

Une partie importante des fibres dopaminergiques innerve également l'amygdale basolatérale (BLA) et centrale (CeA) (Lammel et al., 2008 ; Stamatakis et al., 2014). Cette connexion est particulièrement impliquée dans la mémoire émotionnelle, et une étude récente de notre équipe a également montré qu'elle jouait un rôle majeur dans la transmission des propriétés anxiogènes de la nicotine (Nguyen et al., 2021, voir Annexe). Les projections vers les cortex, notamment le cortex préfrontal (PFC), sous-tendent quant à elles les fonctions exécutives et la mémoire de travail, ainsi que dans les comportements auto-générés et le caractère incertain des récompenses (Seamans et Yang, 2004 ; Bousseyrol et al., 2022).

## 3.3. Caractéristiques de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques

L'activité des neurones dopaminergiques a été caractérisée pour la première fois *in vivo* chez le rat anesthésié (Grace et Bunney, 1984a et b). De ces études ont émergé des caractéristiques robustes, globalement conservées à l'état vigile chez le rongeur et le primate, qui constituent les critères électrophysiologiques participant à l'identification des neurones dopaminergiques *in vivo* (Schultz, 1986 ; Hyland et al., 2002 ; Ungless et Grace, 2012). Parmi ces caractéristiques, on distingue un potentiel d'action assez large (supérieur à 2,2 ms) ainsi que deux types de patrons de décharge spontanée : l'un régulier et l'autre plus irrégulier, en bouffées de potentiels d'action (Figure 3.1.B). L'activité régulière est globalement lente (majoritairement entre 1 et 10 Hz) et de type *pacemaker*, c'est-à-dire générée uniquement par les propriétés intrinsèques du neurone (Grace et Bunney, 1984a ; Roeper, 2013). Le patron de décharge irrégulier est caractérisé par la présence de brèves bouffées de potentiels d'action (ou *bursts*) à haute fréquence (supérieure à 15 Hz) (Grace et Bunney, 1984b). Plus précisément, Grace et Bunney définissent une période de burst par un ou plusieurs intervalles entre deux potentiels d'actions successifs (ISI pour *inter-spike interval*) inférieurs à 80 ms, suivis d'une longue pause avec un ISI supérieur à 160 ms. Le taux de décharge en bouffées d'un neurone dopaminergique peut aller de 0 (absence de bouffées) à près de 100% (la quasi-totalité de ses potentiels d'action sont regroupés dans des bouffées). L'activité en bouffées n'est pas retrouvée lors d'enregistrements *ex vivo*, impliquant un rôle clé des afférences de la VTA dans l'émergence de ce phénomène (Grace et Onn, 1989).

Ces patrons de décharges correspondent à deux grands modes de relargage de dopamine, désignés comme tonique et phasique (Gonon, 1988) (Figure 3.1.B). L'activité *pacemaker* à l'échelle populationnelle résulte en une libération faible et constante au niveau des structures cibles, mais également localement au sein de la VTA : c'est le mode tonique (Tsai et al., 2009). En agissant préférentiellement sur les récepteurs de type D2 de haute affinité exprimés par une majorité de neurones dopaminergiques dans la VTA, ce tonus dopaminergique génère une auto-inhibition qui participe à la régulation de l'activité de ces neurones. A l'inverse, une activité en bouffées synchrones entraîne un relargage massif et transitoire de DA, dit phasique, associé aux rôles de la VTA dans l'apprentissage par renforcement et la prédiction de la récompense (Schultz et al., 1997 ; Tsai et al., 2009 ; Mohebi et al., 2019 ; Schultz, 2019).

## 3.4. Modulation nicotinique de l'aire tegmentale ventrale

L'ACh joue un rôle clé dans la modulation de l'activité de la VTA (Faure et al., 2014). Nous discuterons ici principalement des données se rapportant à la composante nicotinique de cette modulation. Les nAChR de la VTA sont les acteurs essentiels de la réponse de cette structure à l'ACh et à la nicotine. Ils y sont largement exprimés : localement sur les neurones dopaminergiques et GABAergiques et leurs afférences, ainsi qu'au niveau de leurs terminaisons (Figure 3.2).

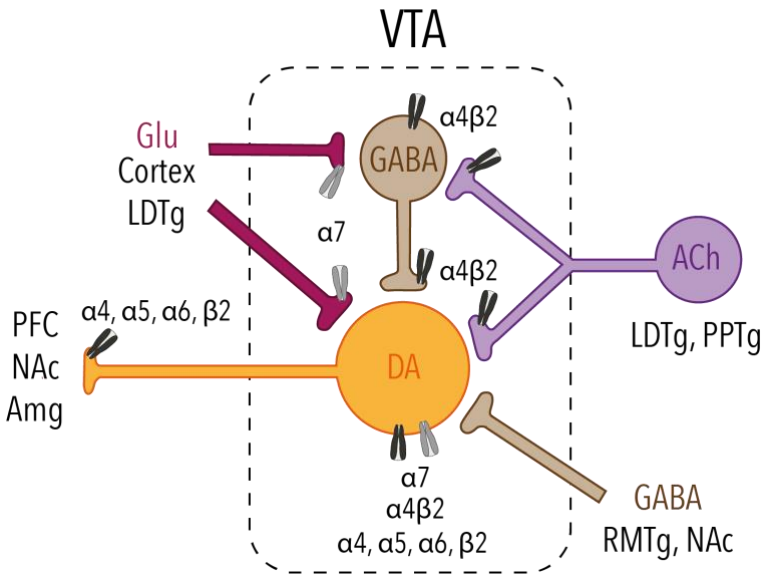



**Figure 3.2 – Répartition des récepteurs nicotiniques au sein de la VTA :** Les neurones dopaminergiques (DA), leurs projections, leurs afférences excitatrices (glutamate (Glu), acétylcholine (ACh)) et inhibitrices (GABA) sont sous contrôle nicotinique. *Figure adaptée de Changeux, 2010.*

Le sous-type de nAChR majoritairement exprimé par la VTA contient principalement les sous-unités α4 et β2 (α4β2*), et peut également contenir les sous-unités α5 et α6. Il présente une forte affinité pour ses agonistes et joue un rôle essentiel dans les effets de la transmission nicotinique au sein de la VTA. Chez la souris *knock-out* (KO) pour la sous-unité β2, les neurones dopaminergiques enregistrés pendant l'anesthésie présentent une fréquence de décharge plus faible et aucune activité en bouffées (Maskos et al., 2005 ; Mameli-Engvall et al., 2006). La réexpression de β2 dans la VTA restaure une activité normale (Mameli-Engvall et al., 2006 ; Tolu et al., 2013). Ces résultats ont également été confirmés grâce à la manipulation directe des nAChR β2* dans la VTA par photopharmacologie (Durand-de Cuttoli et al., 2018) (Chapitre 5). Dans le même sens, les souris KO pour la sous-unité α4 présentent une altération de l'activité en bouffées, partiellement rétablie par une réexpression locale dans la VTA (Exley et al., 2011). Les nAChR sont également impliqués dans le relargage de dopamine. Par exemple, l'activation des hétéropentamères β2 portés par les terminaisons dopaminergiques entraîne l'augmentation de la libération de ce neuromodulateur (Rapier et al., 1990 ; Wonnacott et al., 2000 ; Liu et al., 2022b) et peut même induire directement des potentiels d'action (Liu et al., 2022b).

La principale source d'ACh endogène sur la VTA, activant récepteurs nicotiniques et muscariniques, provient des noyaux du pons, notamment du LDTg (Cornwall et al., 1990 ; Watabe-Uchida et al., 2012 ; Dautan et al., 2016). Les projections cholinergiques et glutamatergiques du LDTg régulent l'activité tonique et phasique des neurones dopaminergiques dans la VTA. Ainsi, l'inhibition chémogénétique du LDTg réduit la fréquence spontanée de ces neurones (Fernandez et al., 2018). L'inactivation du LDTg provoque une diminution de la décharge en bouffées des neurones dopaminergiques, alors que l'activation de ses fibres cholinergiques la favorise (Lodge and Grace, 2006 ; Dautan et al., 2016 ; Fernandez et al., 2018). On observe une augmentation du relargage de DA dans le NAc en inhibant l'AChE dans la VTA, effet qui est atténué chez des souris où l'on provoque une lésion du LDTg (Blaha et al., 1996). De même, la stimulation électrique du LDTg couplée à l'administration d'antagonistes nicotiniques dans la VTA provoque une diminution du relargage de DA dans le NAc (Forster et Blaha, 2000). Les projections du LDTg ciblent en effet principalement les neurones DA qui projettent vers le NAc (Lammel et al., 2012). En aval, le LDTg contacte également directement le NAc, permettant une modulation directe de cette structure et de ses rôles dans la motivation et le renforcement (Dautan et al., 2014 ; Coimbra et al., 2019). La modulation induite par le LDTg joue ainsi un rôle critique dans l'activité des neurones DA de la VTA et le relargage de dopamine dans les structures qu'elle contacte. Les afférences issues du LDTg sur la VTA et le NAC sont essentielles dans le contrôle de comportements liés à la récompense et donc dans l'émergence de l'addiction. Les rats sont capables de travailler pour des stimulations optogénétiques des terminaisons du LDTg dans la VTA par un mécanisme dépendant du relargage de DA dans le NAc (Steidl et Veverka, 2015 ; Steidl et al., 2017a). Stimuler les afférences cholinergiques du LDTg est également suffisant pour induire une préférence de place dans un paradigme de CPP (Lammel et al., 2012 ; Xiao et al., 2016 ; Steidl et al., 2017b). Il faut noter que l'IPN innerve massivement le LDTg, qui peut donc servir de relais entre la signalisation issue de l'IPN et le circuit de la récompense (Chapitre 5).

On observe ainsi le rôle clé de la transmission nicotinique dans le fonctionnement des circuits dopaminergiques. L'ensemble des acteurs de cette importante architecture nicotinique endogène peut être déstabilisé par la nicotine dont l'action mène à la dépendance.

## 3.5. Renforcement naturel et renforcement induit par la nicotine

Un des rôles essentiels des neurones dopaminergiques de la VTA est l'apprentissage par renforcement. Comme évoqué lors du chapitre 2, un stimulus considéré comme récompensant va être renforcé, augmentant la probabilité de réitérer le comportement qui a mené à son obtention. Au niveau neurophysiologique, les premières expériences menées par Olds et Milner dans les années 50 ont montré que les rats étaient capables d'acquérir un comportement d'auto-administration de stimulation intracrâniale (Olds et Milner, 1954). Plus précisément, en implantant une électrode de stimulation électrique au niveau des fibres dopaminergiques regroupées dans le faisceau médian du télencéphale, on observe que les rats sont capables de faire l'association entre l'appui sur un levier et l'administration d'une stimulation, et de travailler vigoureusement pour l'obtenir. Ces expériences ont permis de définir le circuit de la récompense regroupant les zones cérébrales, dont les circuits dopaminergiques, dans

lesquelles une stimulation électrique est récompensante et peut être renforcée (générer le comportement d'auto-administration). L'encodage de ce mécanisme au niveau neuronal a été pour la première fois formalisé grâce aux expériences de Wolfram Schultz et ses collaborateurs, grâce à des enregistrements de neurones dopaminergiques dans la VTA et la SNc chez le primate en comportement (Schultz et al., 1997). Leurs expériences ont démontré que les neurones dopaminergiques répondent par une augmentation de leur activité en bouffées à une récompense inattendue, ou à un indice conditionné comme annonçant la délivrance d'une récompense. Si l'indice est présenté mais que la récompense n'est pas proposée, on observe alors une diminution de l'activité des neurones. Cette activité a été interprétée comme un calcul d'erreur de prédiction de récompense (RPE), formulée comme la différence entre valeur attendue et valeur obtenue. La RPE permettrait une mise à jour permanente des valeurs associées à des actions ou des choix influençant décisions futures. La variation phasique de dopamine, notamment dans le NAc, fonctionnerait donc comme un signal d'apprentissage modulant la plasticité synaptique pour construire des représentations neuronales de la valeur des actions et permettre leur mise à jour continue. L'augmentation de la dopamine dans le NAc constitue ainsi un substrat biologique du renforcement. La dopamine joue aussi un rôle dans la motivation, c'est-à-dire dans les prises de décision en cours (Berke, 2018 ; Naudé et al., 2022), question que nous n'aborderons pas ici.

Les drogues d'abus, dont la nicotine fait partie, détournent le fonctionnement normal du système dopaminergique pour induire un renforcement, première étape dans la mise en place de l'addiction. Elles provoquent une importante augmentation du niveau de dopamine dans le cerveau, notamment au niveau du NAc, conduisant à un renforcement aberrant et artificiel de leur consommation (Di Chiara et Imperato, 1988 ; Di Chiara et al., 2004). Cet effet repose principalement sur la VTA. Dans le cas de la nicotine, les comportements d'auto-administration observés par délivrance systémique sont en effet reproduits lorsque la drogue est délivrée localement dans la VTA (Maskos et al., 2005 ; Exley et al., 2011 ; Tolu et al., 2013 ; Husson et al. 2020). La préférence à la nicotine est abolie lorsque la transmission nicotinique dans la VTA est bloquée (Durand-de Cuttoli et al., 2018). La nicotine va agir directement sur la VTA et indirectement, via ses afférences, pour augmenter la libération de dopamine (Imperato et al., 1986 ; Brody et al., 2004 ; Faure et al., 2014).

La nicotine se lie directement sur les nAChR somatiques exprimés par les neurones de la VTA et provoque une augmentation de leur fréquence de décharge pendant plusieurs minutes, ainsi qu'une hausse de l'activité en bouffées des neurones dopaminergiques (Grenhoff et al., 1986 ; Mameli-Engvall et al., 2006 ; Tolu et al., 2013) (Figure 3.3.A). Elle va également interagir avec les nAChR pré-synaptiques situés sur les terminaisons dopaminergiques et augmenter ainsi la libération de DA dans les structures cibles de la VTA (Schwartz et al., 1984 ; Rice et Cragg, 2004). L'action de la nicotine sur le système dopaminergique, à l'image de celle de l'ACh endogène, dépend principalement des récepteurs contenant la sous-unité β2. Chez les souris KO pour cette sous-unité, la réponse des neurones dopaminergiques à la nicotine, la potentialisation du relargage et le renforcement à la drogue sont abolis (Picciotto et al., 1998 ; Maskos et al., 2005 ; Tolu et al., 2013) (Figure 3.3.A et B). L'ensemble de ces phénotypes est restauré lorsque la sous-unité β2 est réexprimée spécifiquement dans la VTA par un vecteur lentiviral (Maskos et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par notre équipe via une stratégie photopharmacologique

ciblant spécifiquement les nAChR β2* dans la VTA *in vivo* (Durand-de Cuttoli et al., 2018). Ces données mettent en exergue la place prépondérante de la sous-unité β2 dans la traduction des propriétés renforçantes de la nicotine par la VTA, expliquant le rôle qui lui est attribué au sein des théories sur la balance des effets antagonistes de la nicotine (Chapitre 5).

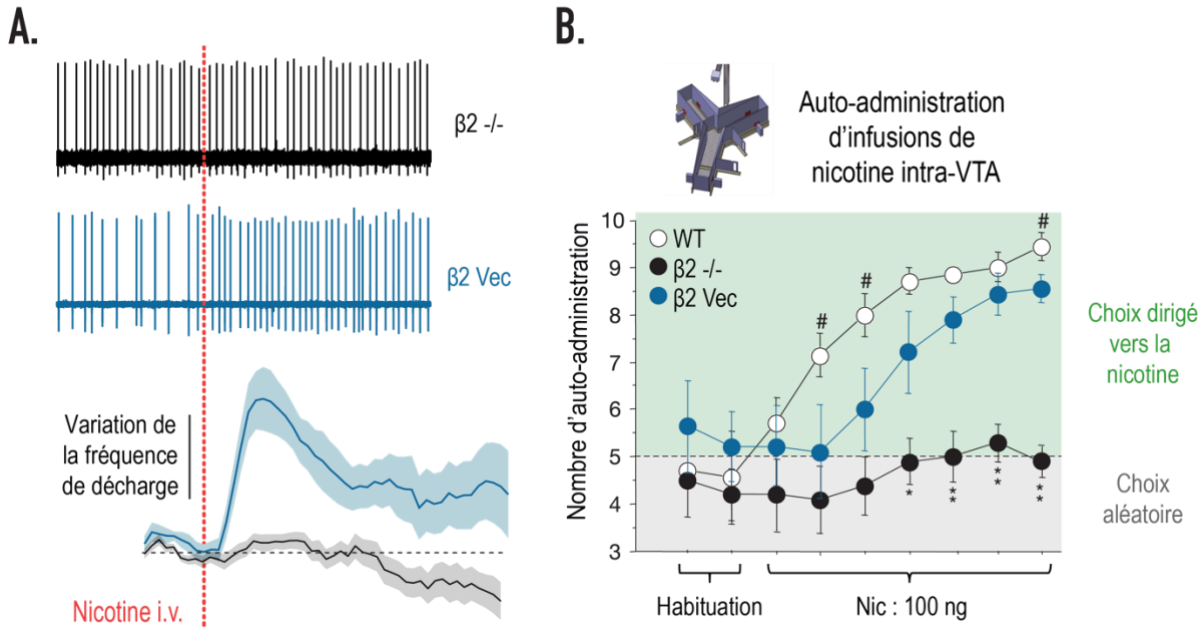



**Figure 3.3 – Réponse à la nicotine des neurones dopaminergiques et implication de la sous-unité β2 :** (**A**) Enregistrements juxtacellulaires *in vivo* de neurones dopaminergiques chez deux souris $\beta2^{-/-}$ (noir) dont une où la sous-unité a été réexprimée dans la VTA (β2 Vec, bleu). La réponse à la nicotine est abolie chez les souris $\beta2^{-/-}$ et est restaurée chez les β2 Vec. *Données issues de Nguyen et al., 2021 en annexe*. (**B**) Auto-administration intra-VTA de nicotine : dans un labyrinthe en Y, la souris a le choix entre un bras où elle reçoit de la nicotine et un autre où elle ne reçoit aucune injection. *Figure adaptée de Maskos et al., 2005*.

Au-delà de son action directe, la nicotine module également la VTA par une action indirecte sur ses afférences (Maskos, 2008). Les entrées glutamatergiques, issues principalement du cortex, présentent des nAChR α7*. La nicotine stimule ces nAChR pour induire à court terme une augmentation du relargage de glutamate sur les neurones dopaminergiques et une potentialisation à long terme (LTP) de ces entrées excitatrices (Mansvelder et McGehee, 2000 ; Mansvelder et al., 2002). La nicotine a par ailleurs un effet excitateur direct sur les neurones du LDTg et sur le relargage local de neurotransmetteurs de ses afférences (Ishibashi et al., 2009). Les effets synergiques directs et indirects de la nicotine sur la VTA génèrent l'augmentation du relargage de dopamine évoquée plus haut et induisent un renforcement pharmacologique à la drogue (Blaha et al., 1996 ; Pidoplichko et al., 2004 ; De Biasi et Dani, 2011).

Un aspect critique pour comprendre l'action de la nicotine est le seuil de réponse des neurones dopaminergiques, c'est-à-dire la dose à partir de laquelle ces neurones répondent à la drogue. En effet, la nicotine présente un effet dose-dépendant : plus la dose administrée est forte, plus la variation de la décharge des neurones dopaminergiques est importante (Morel et al., 2014 ; Eddine et al., 2015 ; Nguyen et al., 2021). Cependant, comme pour tout agent pharmacologique, l'administration de nicotine ne

provoque pas un effet différent de celle d'une solution contrôle en deçà d'une certaine concentration. Cette dose, que l'on peut définir comme une dose seuil, a des répercussions importantes sur le comportement de consommation. Par exemple, les souris et les rats KO pour la sous-unité α5 ne s'auto-administrent pas à la dose de nicotine induisant par ailleurs l'acquisition de ce comportement chez les souris de type sauvage (WT) (Morel et al., 2014 ; Forget et al., 2018). Les souris α5 KO s'auto-administrent seulement quand on leur propose des doses plus importantes par injection, et elles vont consommer significativement plus que les WT à ces doses (Fowler et al., 2011 ; Morel et al., 2014). Des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* ont confirmé que les doses consommées par les WT provoquent une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques dans la VTA chez les WT mais pas chez les α5 KO, qui ne répondent qu'à de plus fortes doses (Morel et al., 2014 ; Forget et al., 2018). La régulation de la dose de nicotine permettant un engagement de la VTA constitue donc un aspect majeur de la mise en place de l'addiction. Définir ce seuil de réponse de la VTA, notamment par rapport à celui de l'IPN, dans la balance des propriétés renforçantes et aversives a été l'une des questions au centre de mon travail de recherche.

### 3.6. Transmission des propriétés aversives de la nicotine par l'aire tegmentale ventrale

Nous avons vu que la nicotine stimule les neurones dopaminergiques de la VTA, contribuant aux effets récompensant de la drogue qui motivent la consommation de tabac. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que la modulation nicotinique dans la VTA pouvait également induire des effets aversifs et anxiogènes.

Les neurones dopaminergiques de la VTA sont sous contrôle inhibiteurs via des interneurones GABAergiques locaux et des afférences inhibitrices. Chez les souris β2 KO, qui ne s'auto-administrent pas de nicotine, la réexpression spécifique de la sous-unité β2 dans les neurones GABAergiques de la VTA provoque une inhibition des neurones dopaminergiques en réponse à la nicotine et un évitement du bras associé à l'administration intra-crâniale de nicotine (Tolu et al., 2013). Cette inhibition provient également des afférences issues de l'habénula latérale (LHb), qui ont été caractérisées dans l'encodage des valences négatives comme un « *anti-reward system* » (Hikosaka, 2010 ; Velasquez et al., 2014). En effet, la LHb inhibe le système dopaminergique via des projections glutamatergiques directes sur les neurones GABergiques de la VTA, et indirectes via le noyau tegmental rostromédial (RMTg), une afférence inhibitrice de la VTA (Lammel et al., 2012 ; Meye et al., 2013). L'activation optogénétique de ces projections induit une aversion de place dans un paradigme de CPA dépendante du relargage de DA dans le PFC, vers lequel projettent les neurones dopaminergiques sous contrôle de la LHb (Lammel et al., 2012). L'administration de nicotine induit également un relargage de DA dans le PFC, posant ainsi la question d'un mécanisme commun entre aversion et transmission dopaminergique dans le PFC (Rossi et al., 2005). Une étude récente montre également par des enregistrements en photométrie fibrée que l'injection répétée et rapprochée de fortes doses de nicotine, associées à des comportements d'aversion, induit une transition de l'activité populationnelle des neurones dopaminergiques d'une excitation globale à une inhibition dépendante des récepteurs β2 (Liu et al., 2022a). Cette réponse évolutive induit

une diminution du relargage de DA, notamment dans le NAc médial, et semble sous contrôle des afférences GABAergiques issues du LDTg sur les neurones dopaminergiques (Liu et al., 2022a). Ces données suggèrent ainsi que l'inhibition de l'activité dopaminergique via ses entrées GABAergiques promeut les comportements d'aversion. Ce contrôle GABAergique est dépendant de la modulation nicotinique, notamment par les nAChR β2, à l'instar des mécanismes de renforcement évoqués plus tôt.

L'inhibition de l'activité dopaminergique joue également un rôle dans l'émergence des propriétés anxiogènes de la nicotine. Des expériences réalisées par notre équipe ont ainsi montré qu'une injection de nicotine pouvait induire une diminution de la fréquence de décharge d'une sous-population de neurones dopaminergiques dans la VTA (Eddine et al., 2015 ; Nguyen et al., 2021, voir Annexe). Ces neurones inhibés par la nicotine sont situés dans la VTA médiale et projettent vers l'amygdale. L'activation optogénétique de ces projections dopaminergiques réduit l'anxiété naturelle ou induite par la nicotine dans une tâche de labyrinthe surélevé, tandis que leur inhibition, mimant l'effet de la nicotine, induit de l'anxiété et un comportement d'évitement dans un protocole de CPA (Nguyen et al., 2021). L'inhibition à la nicotine est abolie en bloquant les récepteurs de la dopamine de type D2 dans la VTA et chez la souris KO pour la sous-unité nicotinique β2, alors qu'elle est restaurée par la réexpression locale de β2 dans la VTA (Eddine et al., 2015 ; Nguyen et al., 2021). Ces résultats impliquent un contrôle à la fois dopaminergique et nicotinique de l'inhibition à la nicotine et dans la traduction de ses propriétés anxiogènes par la VTA.

L'ensemble de ces données tend à montrer que l'inhibition de l'activité dopaminergique permet de signaler les propriétés aversives de la nicotine. Cet effet semble distribué au sein de circuits avec des projections distinctes (amygdale, PFC, Nac médial) et parallèles aux voies caractérisées du renforcement, qui seront activées par la nicotine (NAc latéral).

# Chapitre 4

# La voie habénulo-interpédonculaire dans l'aversion et la consommation de nicotine

## 4.1. Anatomie de la voie habénulo-interpédonculaire

L'habénula est une structure épithalamique du diencéphale très conservée chez les vertébrés, et constitue avec ses projections vers le noyau interpédonculaire (IPN) l'un des premiers faisceaux de fibres formés pendant le développement chez l'Homme (Cho et al., 2014). Chez les mammifères et les oiseaux, elle est divisée selon des critères anatomiques, transcriptomiques et connectomiques en deux parties latérale (LHb) et médiale (MHb) (Hikosaka, 2010 ; Aizawa et al., 2011). Elle reçoit des afférences de plusieurs structures antérieures du système limbique via la stria medullaris et projette majoritairement vers le mésencéphale à travers le fasciculus retroflexus (FR) (Figure 4.1.A). Cette organisation la place en relais entre structures frontales et profondes, notamment par ses projections sur les systèmes de neuromodulation monoaminergiques (Klemm, 2004 ; Lecourtier et Kelly, 2007).

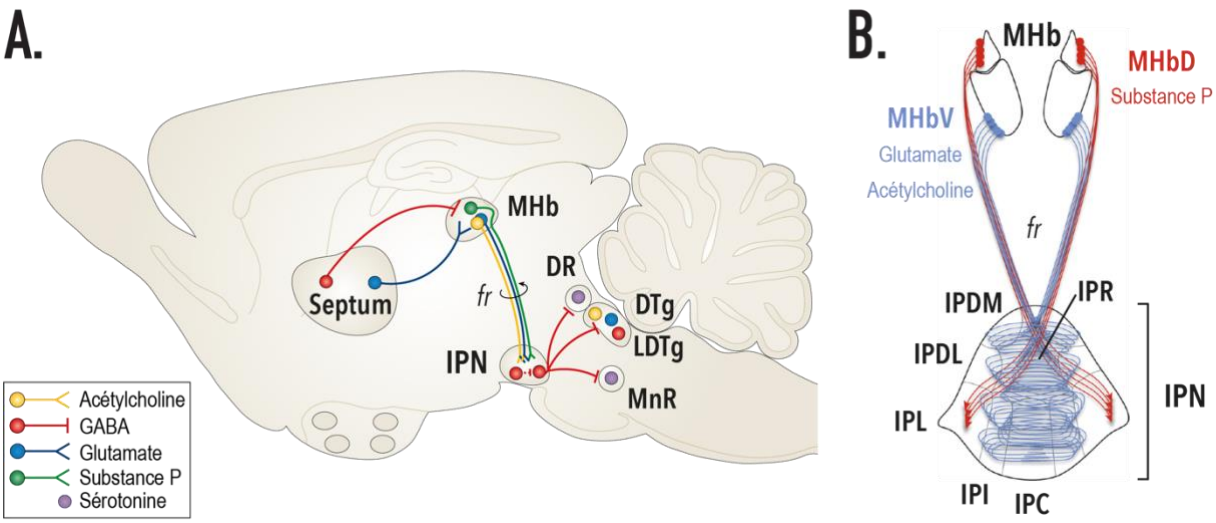



**Figure 4.1 – Organisation anatomique de la voie habénulo-interpédonculaire :** (**A**) Représentation schématique des principales afférences et efférences de l'habénula médiale (MHb) et du noyau interpédonculaire (IPN). DR : raphé dorsal, DTg : tegmentum dorsal, fr : fasciculus retroflexus, LDTg : tegmentum latérodorsal, MnR : raphé médian. (**B**) Les neurones de la MHb dorsale (MHbD) projettent sur l'IPN latéral (IPL) et relarguent de la substance P, alors que les neurones de la MHb ventrale (MHbV) co-relarguent du glutamate et de l'acétylcholine sur l'IPN médial (noyaux rostral (IPR), dorsomédial (IPDM), dorsolatéral (IPDL), intermédiaire (IPI) et caudal (IPC)). *Figure adaptée de Molas et al., 2017b.*

La MHb est composée de neurones excitateurs qui projettent via le FR sur l'IPN, leur cible quasi-exclusive. La MHb est sous-divisée en cinq noyaux chez le rongeur, deux dorsaux et trois ventraux, définis notamment par leur profil de projections vers les différents sous-noyaux de l'IPN (Aizawa et al., 2012 ; Wagner et al., 2014). Cette ségrégation porte également sur le type de neurotransmetteur produit. Ainsi, alors que les neurones glutamatergiques sont ubiquitaires dans la MHb, sa partie dorsale (MHbD) synthétise de la substance P et va contacter les parties latérales de l'IPN tandis que sa partie ventrale

(MHbV) innerve densément les noyaux centraux de l'IPN en co-relarguant de l'ACh et du glutamate (Ren et al., 2011 ; Aizawa et al., 2012 ; Frahm et al., 2015) (Figure 4.1.B). Ses afférences principales proviennent du septum qui constitue la seule source excitatrice sur cette structure (Herkenham et Nauta, 1977 ; Otsu et al., 2018).

L'IPN est un noyau mésencéphalique impair composé majoritairement de neurones GABAergiques, répartis en neurones de projections et interneurones locaux, ainsi que d'une population de neurones glutamatergiques (Kawaja et al., 1989 ; Quina et al., 2017). Sa division en sous-noyaux (Figure 4.1.B) est fondée majoritairement sur des critères cyto-architecturaux et subsidiairement à l'expression de certains marqueurs moléculaires et à une ségrégation de leurs efférences (Hemmendinger et Moore, 1984 ; Lenn et Hamill, 1984 ; Quina et al., 2017 ; Wang et al., 2020).

L'IPN est la cible principale des efférences de la MHb via le FR et va donc jouer un rôle de pivot pour traiter et transmettre les informations intégrées au niveau de la MHb vers le cerveau postérieur. Les projections les plus robustes de l'IPN ciblent deux centres neuromodulateurs, à savoir les noyaux cholinergiques du pons, au niveau du tegmentum dorsal (DTg) et du LDTg, et le système sérotoninergique via le raphé médian (MnR) et dorsal (DR) (Hsu et al., 2013 ; Lima et al., 2017 ; Quina et al., 2017) (Figure 4.1.A). Ces noyaux contactent également l'IPN en retour : le LDTg envoie des projections GABAergiques et cholinergiques dans l'IPN (Bueno et al., 2019) tandis que les connexions réciproques avec MnR et le DR sont GABAergiques (Hsu et al., 2013 ; Lima et al., 2017 ; Quina et al., 2017). Outre les afférences massives de la MHb, des entrées, certaines réciproques, ont également été décrites avec le *nucleus incertus* et le *nucleus tractus solitarus*. Dans l'ensemble, la caractérisation du connectome anatomique et surtout fonctionnel de l'IPN reste préliminaire. Par exemple, des études ont décrit des projections de l'IPN vers des structures antérieures, dont le septum, laissant supposer l'existence d'une boucle de rétro-contrôle entre voie MHb-IPN et télencéphale (Groenewegen et al., 1986 ; Shibata et Suzuki, 1984). Cependant, une récente revue anatomique semble indiquer que ces projections issues de la partie apicale de l'IPN sont en réalité un prolongement du raphé médian (Quina et al., 2017).

## 4.2. Transmission nicotinique dans la voie habénulo-interpédonculaire

L'une des caractéristiques les plus saillantes de la voie MHb-IPN est la présence de l'une des plus fortes densités et d'une grande diversité de nAChRs dans le cerveau, la quasi-totalité des sous-unités nicotiniques du SNC (α2-α7 et β2-β4) y étant exprimée (Sheffield et al., 2000 ; Perry et al., 2002 ; Zoli et al., 2015). Elle présente notamment une forte densité de sous-unités nicotiniques par ailleurs peu exprimées dans le reste du système nerveux central, à savoir les sous-unités α5, α3 et β4 encodées par le cluster de gène CHRNA5-A3-B4 (Clarke et al., 1985 ; De Biasi et Salas, 2008 ; Grady et al., 2009). Ce regroupement sur un seul locus génique favorise leur co-expression par les mêmes neurones, et elles ont ainsi tendance à s'associer pour former des récepteurs α3β4* ou α3β4α5*. Des polymorphismes nucléotidiques dans ce cluster de gènes ont été associés par de nombreuses études génétiques chez l'humain à une consommation plus élevée de nicotine ainsi qu'à une vulnérabilité accrue face à l'addiction à cette substance (Bierut et al., 2008 ; Berrettini et al., 2008 ; Chen et al., 2015 ; Saccone et al.,

2007 ; Gallego et al., 2013 ; Forget et al., 2018 ; Pérez-Morales et al., 2018). Ces données suggèrent ainsi l'existence d'un lien entre la forte expression de ces sous-unités dans la voie MHb-IPN et le développement de l'addiction à la nicotine.

La source principale d'ACh endogène au sein de l'IPN provient de la MHb. Son mode de libération semble complexe, présentant à la fois les caractéristiques d'une transmission volumique et synaptique. La stimulation à haute fréquence des afférences cholinergiques de la MHb entraîne ainsi des courants entrants lents et abolis en présence d'antagonistes des nAChR, suggérant une transmission de type volumique (Ren et al., 2011). A l'inverse, une stimulation à plus faible fréquence évoque des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) nicotiniques rapides dans les neurones de l'IPN, à l'image d'une transmission de type synaptique (Soria-Gómez et al., 2015 ; Zhang et al., 2016). Il semble ainsi que les deux types de neurotransmissions cholinergiques coexistent au sein de la voie MHb-IPN et dépendent de l'activité de la MHb. L'action de l'ACh dans l'IPN est double : sa libération dépolarise les neurones de l'IPN par une action directe sur leurs nAChR (Mulle et al., 1991 ; Ren et al., 2011) et facilite son propre relargage en plus de celui du glutamate en activant les nAChR exprimés au niveau des terminaisons de la MHb dans l'IPN (Grady et al., 2009 ; Frahm et al., 2015). Cette action pré-synaptique sur la libération d'ACh dépendrait uniquement des récepteurs α3β4* (Grady et al., 2009). De même, une étude a montré que la nicotine induit un relargage d'ACh dans l'IPN par un mécanisme β4-dépendant (Beiranvand et al., 2014). L'impact de cette transmission cholinergique sur l'activité spontanée des neurones de l'IPN *in vivo* reste cependant inconnu, et a constitué l'une des questions auxquelles je me suis intéressé (Discussion).

## 4.3. Rôles endogènes de la voie habénulo-interpédonculaire

Les données existantes autour des rôles endogènes de la voie mHb-IPN tendent à l'associer à la traduction d'états émotionnels négatifs. Les premières études de lésions des différentes parties de ce circuit ont ainsi révélé des altérations de l'anxiété, des comportements d'évitement et d'aversion ainsi que de la rétention de mémoires aversives (Thompson, 1960 ; Donovick et al., 1970 ; Thornton et al., 1994 ; Murphy et al., 1996). Cependant, ces études ne faisaient pas la distinction entre LHb et MHb. L'utilisation de techniques modernes a permis un découpage plus précis des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces réponses comportementales. Ainsi, deux voies anatomiques distinctes reliant septum, MHb et IPN ont pu être identifiées dans l'émergence de l'anxiété et de la peur grâce à des ablations ciblées via immunotoxine de populations neuronales (Yamaguchi et al., 2013). Une étude récente a également révélé un mécanisme de signalisation unique dans le cerveau adulte, à savoir l'excitation via un type de récepteur au glutamate (NMDAR) activé uniquement par la glycine, qui participe à la formation d'associations aversives dans la MHb (Otsu et al., 2019). Une activation optogénétique de l'IPN ou de ses terminaisons dans le LDTg induit un évitement du compartiment stimulé dans un protocole de CPA (Wolfman et al., 2018). Lorsque celle-ci est spécifique aux neurones de l'IPN exprimant la sous-unité α5, l'aversion se met en place seulement lorsque la tâche est répétée le lendemain, ou suite à une pré-stimulation optogénétique (Morton et al., 2018). La transmission cholinergique joue également un rôle dans l'émergence de ces fonctions. Ainsi, une étude a montré que les entrées cholinergiques de la MHb au sein de l'IPN et que les nAChR exprimés à cette synapse étaient

nécessaires à l'expression de mémoires aversives, leur activation atténuant les phénotypes de peur chez la souris (Soria-Gómez et al., 2015). Dans le même sens, une autre étude a montré que l'activation des neurones cholinergiques de la MHb permet de réduire les réponses de peur chez la souris par un mécanisme d'excitation pré-synaptique via les récepteurs $GABA_B$ (Zhang et al., 2016). L'émergence de comportements liés aux émotions négatives au sein de la voie MHb-IPN interroge un possible rôle de ce circuit dans les troubles psychiatriques associés à un dérèglement de ces réponses physiologiques. Une étude post-mortem dans une population atteinte de dépression a par exemple révélé une réduction significative du volume de leur habénula, ce qui a été ensuite confirmé par imagerie chez des patients souffrant de dépression ou de troubles bipolaires (Ranft et al., 2010 ; Savitz et al., 2011). De même, une ablation de la partie dorsale de la MHb induit une anhédonie associée aux phénotypes dépressifs chez le rongeur (Hsu et al., 2014). On observe également une augmentation de l'activité métabolique enregistrée par imagerie fonctionnelle dans le septum et la MHb chez les rats soumis à un stress chronique (Mirrione et al., 2014).

L'ensemble de ces données permet ainsi d'envisager un lien entre la transmission par la voie MHb-IPN d'émotions de valence négative et leurs pendants pathologiques d'une part, et son implication dans la dépendance tabagique d'autre part (Molas et al., 2017b ; McLaughlin et al., 2017). D'un point de vue épidémiologique, la relation entre les troubles psychiatriques associés à ces états émotionnels négatifs avec une consommation accrue de nicotine est bien caractérisée (Lasser et al., 2000 ; Leventhal et Zvolensky, 2015). Ainsi, les addictions, notamment au tabac, sont parmi les comorbidités les plus importantes chez les personnes souffrant de troubles anxieux généralisés (Wittchen, 1994 ; Tidey et Miller, 2015). L'incidence de l'addiction au tabac est deux fois plus élevée chez les patients dépressifs que dans la population générale, et leur taux de rechute est également plus important (Glassman et al., 1990 ; Covey et al., 1998). Plus généralement, les troubles anxieux et de l'humeur représentent des facteurs de risque pour le développement de l'addiction à plusieurs drogues, dont la nicotine, et sont associés à une progression plus rapide entre la première prise et la dépendance (Conway et al., 2006 ; Vorspan et al., 2015). D'un point de vue neurobiologique, ces associations suggèrent l'existence d'une relation entre ces troubles et la transmission nicotinique. Les nAChR jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs circuits contrôlant l'humeur, l'anxiété ou l'agression (Picciotto et al., 2015). Les souris KO pour la sous-unité β4, très exprimée dans la voie MHb-IPN, présentent des altérations au niveau de l'anxiété, des mémoires de peur et des comportements de type dépressifs (Salas et al., 2003 ; Semenova et al., 2012). La voie MHb-IPN et les nAChR qu'elle exprime, étant impliqués à la fois dans la traduction d'états émotionnels négatifs et l'addiction à la nicotine, pourraient donc constituer un substrat biologique commun entre les deux phénomènes.

## 4.4. Implication de la voie habénulo-interpédonculaire dans l'addiction à la nicotine

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'axe MHb-IPN émerge de plus en plus comme un acteur majeur impliqué des aspects aversifs et désagréables de la nicotine (Fowler et al., 2011 ; Antolin-Fontes et al., 2015 ; Wills et al., 2022). Son rôle est intimement lié aux fortes densité et diversité des nAChR qui y sont exprimés, notamment ceux contenant les sous-unités α3, β4 et α5. Je détaillerai ici principalement les données concernant la sous-unité β4, que j'ai étudiée pendant mon travail de recherche.

Les propriétés aversives de la nicotine représentent une forte source de motivation pour l'individu à adapter ses comportements : contrôler sa consommation afin d'éviter les états dysphoriques induits par la prise aiguë de drogue tout en continuant à consommer pour faire cesser les symptômes liés au manque (renforcement négatif) (Koob et Le Moal, 2008 ; Wills et al., 2022) (Chapitre 2). Les effets négatifs liés à la prise de nicotine ont été majoritairement décrits en réponse à de fortes doses de nicotine. Dans les modèles animaux, cela se traduit par un comportement d'évitement dose-dépendant. Dans un paradigme de CPP/CPA, réaliser le conditionnement avec des doses de nicotine élevées, typiquement au-dessus de 1 à 1.5 mg/kg, va induire un évitement du compartiment apparié avec la nicotine (Grieder et al., 2017 ; Wolfman et al., 2018). Quand on présente à l'animal de fortes doses à chaque injection ou une forte concentration dans l'eau de boisson, on observe une diminution de sa préférence apparente pour la nicotine : l'animal s'administre moins fréquemment ou consomme une quantité inférieure d'eau contenant la nicotine (Fowler et al., 2011 ; Morel et al., 2014). La voie MHb-IPN joue un rôle essentiel dans la transmission de cet évitement et du contrôle de la consommation. L'infusion locale de lidocaïne dans la MHb ou l'IPN pour inhiber l'activité de ces structures provoque une augmentation de l'auto-administration (Fowler et al., 2011). Une inhibition des terminaisons de l'IPN dans le LDTg pendant le conditionnement va abolir le comportement d'évitement des fortes doses de nicotine (Wolfman et al., 2018). Chez des souris transgéniques où la sous-unité β4 est surexprimée au niveau de ses sites endogènes, c'est-à-dire principalement dans la voie MHb-IPN (mutant Tabac), la dose-seuil de déclenchement de l'aversion est abaissée et l'auto-administration de fortes doses réduite (Frahm et al., 2011 ; Husson et al., 2020). Les souris KO pour la sous-unité β4 s'auto-administrent moins que les WT quand on leur présente de faibles doses mais davantage avec de fortes doses (Harrington et al., 2016 ; Husson et al., 2020). De façon surprenante, le KO β4 est associé à une sensibilité accrue des neurones dopaminergiques pour les faibles doses de nicotine, qui est restaurée à son niveau normal par réexpression de la sous-unité β4 dans l'IPN (Harrington et al., 2016). Ces données suggèrent ainsi un lien entre le niveau d'expression des nAChR β4* dans l'IPN et la réponse de la VTA à la nicotine. L'ensemble de ces phénotypes est récapitulé chez les variants alléliques humains de β4 : ceux associés à un gain de fonction (augmentation des courants nicotiniques) entraînent une augmentation de l'aversion quand ils sont exprimés dans la MHb, tandis que ceux associés à une perte de fonction diminuent l'aversion à la nicotine (Ślimak et al., 2014). Globalement, ces études montrent une relation directe entre activation de la voie MHb-IPN et diminution de la consommation.

L'axe MHb-IPN a également été impliqué dans l'expression du manque suite à une période d'abstinence tabagique. L'infusion de mécamylamine, un antagoniste non-spécifique des nAChR, dans la MHb ou l'IPN précipite des symptômes physiques et affectifs (anxiété) de manque après une exposition chronique à la nicotine chez la souris et le rat (Salas et al., 2009 ; Zhao-Shea et al., 2013 ; Correa et al., 2019). Cet effet comportemental n'est pas retrouvé quand l'infusion est réalisée dans le cortex, la VTA ou l'hippocampe, d'autres régions cérébrales comportant de nombreux nAChR (Salas et al., 2009). De plus, le manque induit une augmentation du marquage c-fos dans les neurones de l'IPN, indiquant une augmentation d'activité dans cette structure, ainsi que de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs spontanés dans l'IPN (Shih et al., 2014 ; Zhao-Sheah et al., 2013 et 2015). Ces résultats ont été confirmés par une étude *in vivo* en photométrie fibrée, où l'activité GCaMP dans l'IPN augmente après une injection de mécamylamine chez les souris exposées à la nicotine mais diminue localement lors de comportements d'expression somatique du manque, supposés permettre d'atténuer l'effet désagréable ressenti (Klenowski et al., 2022). Enfin, l'activation optogénétique des neurones GABAergiques dans l'IPN précipite également des symptômes de manque, alors que leur inhibition pendant la période de manque en atténue les symptômes (Zhao-Shea et al., 2013 ; Klenowski et al., 2022). Ce rôle dans l'expression du manque semble aussi impliquer la sous-unité β4. En effet, les souris KO pour β4 présentent une diminution des symptômes physiques de manque après une période d'abstinence forcée ou suite à une injection systémique de mécamylamine (Salas et al., 2004 ; Stoker et al., 2012). L'infusion d'un antagoniste spécifique de nAChR α3β4* dans l'IPN suite à cette exposition provoque des symptômes de manque (Zhao-Shea et al., 2013). Dans la MHb, il a été observé que la nicotine induit une augmentation de l'activité des neurones plus importante durant le manque que lors de l'exposition chronique, et que cet effet est bloqué par l'application d'un antagoniste des nAChR α3β4* (Görlich et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère que la voie MHb-IPN et les récepteurs β4* qu'elle exprime jouent un rôle majeur dans l'expression des états de manque, qui vont à leur tour influencer la physiologie de ce circuit.

# Chapitre 5

# Le circuit IPN-VTA dans la consommation de drogue

Au cours des deux chapitres précédents, nous avons étudié de façon isolée deux acteurs majeurs, la VTA et l'IPN, dans la traduction des propriétés renforçantes et aversives de la nicotine. La consommation de drogue est un comportement qui met en jeu ces deux effets antagonistes et ces deux structures, ce qui pose la question d'une éventuelle communication entre ces circuits et d'une convergence de leurs messages. Dans le prochain chapitre, nous exposerons les liens connus entre l'IPN et la VTA d'un point de vue anatomique et fonctionnel, puis nous détaillerons les outils que nous avons mis en place pour l'étude de la relation entre ces deux structures dans la réponse à la nicotine.

## 5.1. Connexions anatomiques entre la VTA et l'IPN

L'existence de voies anatomiques fonctionnelles reliant la VTA et l'IPN n'est pas bien établie. La grande proximité anatomique entre ces deux structures représente un obstacle majeur à leur ciblage spécifique, bien que l'utilisation de techniques génétiques ait permis de révéler certaines voies de projection.

### 5.1.1. Connexion de la VTA vers l'IPN

Une potentielle modulation de la VTA sur l'IPN a été récemment discutée dans plusieurs études. En effet, le *knock-down* dans la VTA du facteur de libération de corticotrophine (*corticotropin releasing factor*, ou CRF, en anglais), un neuropeptide impliqué dans la modulation du stress, réduit l'expression du marquage c-fos dans l'IPN lors du manque à la nicotine, impliquant une voie de communication de la VTA vers l'IPN (Grieder et al., 2014 ; Zhao-Shea et al., 2015). Des études ultérieures ont mis en lumière l'existence de fibres dopaminergiques issues de la VTA au sein de l'IPN par traçage antérograde sur souris DAT-Cre (Molas et al., 2017a ; De Groot et al., 2020). L'utilisation d'un senseur de dopamine dans des expériences sur tranches *ex vivo* a permis de détecter la libération de DA endogène dans l'IPN suite à une stimulation pharmacologique (De Groot et al., 2020). L'IPN exprime également des récepteurs à la dopamine de type D1 (Molas et al., 2017a ; De Groot et al., 2020). Ces projections semblent impliquées dans la modulation de l'anxiété et des stimuli nouveaux, mais leur rôle dans la balance des propriétés renforçantes et aversives de la nicotine n'a pas été étudié.

### 5.1.2. Connexion de l'IPN vers la VTA

Les différentes études anatomiques sur les efférences de l'IPN n'ont pas détecté de projection directe vers la VTA (Quina et al., 2017 ; Lima et al., 2017 ; Metzger et al., 2021). Cependant, ce noyau peut exercer une modulation indirecte sur le système dopaminergique en contactant des structures qui innervent la VTA. Le LDTg apparait comme le candidat le plus probable dans ce rôle de relais anatomique entre l'IPN et la VTA. En effet, l'IPN envoie des projections majoritairement GABAergiques sur les

neurones du LDTg qui contactent la VTA (Wolfman et al., 2018). Ces projections peuvent être modulées par la nicotine via les nAChR β2* exprimés au niveau des terminaisons de l'IPN (Ishibashi et al., 2009 ; Wolfman et al., 2018) et induisent un évitement lorsqu'elles sont activées lors d'un protocole de CPA. Comme nous l'avons vu précédemment, le LDTg exerce un contrôle de l'activité électrophysiologique des neurones de la VTA et module ainsi le renforcement naturel et induit par la nicotine (Chapitre 3).

Très peu d'informations existent pour caractériser ces voies de sortie de l'IPN d'un point de vue moléculaire. Certains marqueurs semblent toutefois plus particulièrement exprimés dans les neurones de projection de l'IPN. Par exemple, une population de neurones de projection GABAergiques exprimant le marqueur Amigo1 et la sous-unité nicotinique α5 semble enrichie dans l'expression des marqueurs NOS (oxyde nitrique synthase) et SST (somatostatine) (Ables et al., 2017). Un traçage antérograde chez les souris NOS-Cre révèle également des projections vers le raphé et le LDTg (Quina et al., 2017). Les neurones SST positifs dans l'IPN semblent eux-aussi exprimer les sous-unité β4 et α5 et projeter vers les noyaux du raphé (Hsu et al., 2013 ; Zhao-Shea et al., 2013 ; Quina et al., 2017). D'un point de vue fonctionnel, l'inhibition des neurones NOS et Amigo1 réduit la préférence pour la nicotine dans des paradigmes de CPP et de consommation (Ables et al., 2017). Ces premières évidences attestent la potentialité anatomique d'un circuit reliant l'IPN et la VTA via une structure intermédiaire. La nature du message de sortie de l'IPN en réponse à la nicotine et la modulation qui en résulte en aval restent cependant à déterminer.

## 5.2. Communication fonctionnelle entre la VTA et l'IPN

Nous avons précédemment évoqué la représentation en forme de U inversé pour représenter le comportement d'auto-administration de nicotine (Chapitre 2), souvent reprise dans la littérature (Risner et Goldberg, 1983 ; Corrigall et Coen, 1989 ; Harvey et al., 2004 ; DeNoble et Mele, 2006 ; de Wit et Phillips, 2012 ; Fowler et Kenny, 2014 ; Liu et al., 2022a ; Wills et al., 2022). Cette courbe mesure un nombre de prises de drogue en fonction de la dose de nicotine proposée, et non la quantité effectivement consommée par l'individu. Pour expliquer cette représentation, il est fait appel aux deux effets opposés de la nicotine. Les faibles doses de nicotine induiraient des effets récompensants qui encouragent la consommation (partie ascendante de la courbe), tandis que les fortes doses provoqueraient des effets aversifs qui s'opposent à la consommation (partie descendante de la courbe). De cette vision, qui comporte de nombreuses limites, émergent plusieurs hypothèses afin de résoudre les mécanismes sous-tendant cette dichotomie apparente des doses et des effets de la nicotine (Wills et al., 2022). Nous résumerons ici celle qui envisage les rôles respectifs de la VTA et de l'IPN, puis nous discuterons les raisons qui nous poussent à vouloir l'éprouver (Figure 5.1).

Selon cette théorie, les propriétés antagonistes de la nicotine sont portées par des populations de récepteurs différentes, β2 et β4, exprimés respectivement par la VTA et l'IPN. Comme nous l'avons vu, les neurones dopaminergiques au sein de la VTA expriment principalement des nAChR β2 de haute affinité et sont essentiels pour induire le renforcement à la nicotine. Comme la majeure partie du SNC, la VTA ne présente quasiment pas de récepteurs contenant la sous-unité β4. La voie MHb-IPN contient une

forte densité de nAChR β4* (Klink et al., 2001 ; Azam et al., 2002 ; Salas et al., 2003) qui ont une plus faible affinité pour la nicotine que les nAChR β2* (Grady et al., 2009) et qui y jouent un rôle clé dans la traduction des propriétés aversives de la nicotine (Chapitre 4). Ainsi, les faibles doses de nicotine activeraient en priorité les récepteurs de haute affinité β2* concentrés dans la VTA pour encourager la prise de drogue. Quand la dose de nicotine devient forte, elle atteint le seuil d'activation des récepteurs β4* dans la MHb et l'IPN, induisant un signal aversif face à la drogue. L'objectif pour le fumeur serait donc de maintenir un niveau de nicotine permettant de maximiser l'activation des nAChR β2* dans la VTA tout en évitant de solliciter les nAChR β4* dans les circuits aversifs (MHb-IPN). La littérature croissante autour du rôle de la voie MHb-IPN dans la traduction d'un signal aversif lié à la nicotine ainsi que la forte implication de la sous-unité β4 dans ces phénomènes tendent à renforcer cette hypothèse.

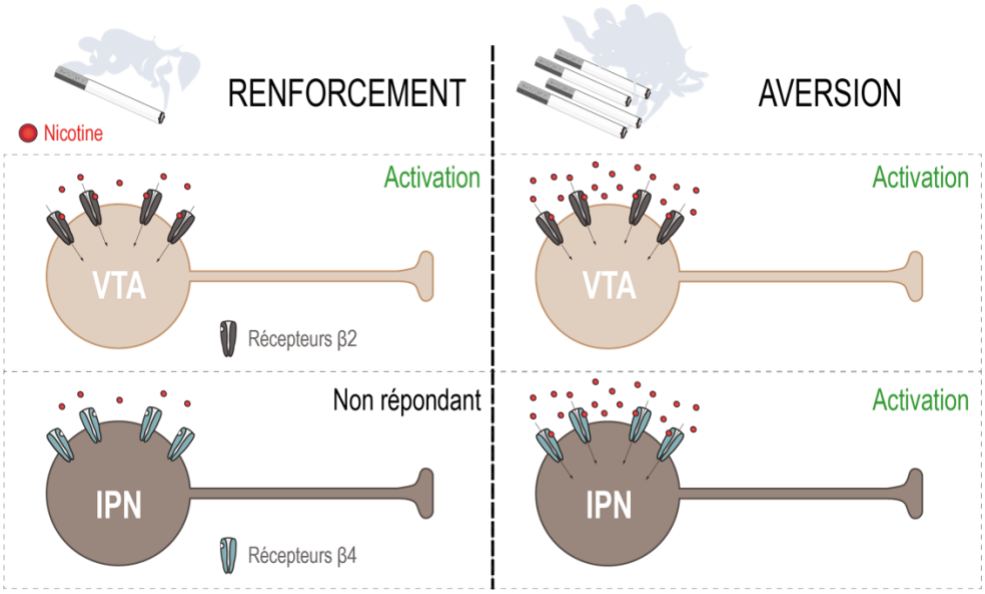



**Figure 5.1 – Hypothèse de la dichotomie entre faibles et fortes doses :** Les faibles doses de nicotine activeraient les nAChR β2* de haute affinité dans la VTA pour induire le renforcement mais n'auraient pas d'effet sur les nAChR β4* dans l'IPN. A de plus fortes doses, les récepteurs β2* de la VTA seraient toujours activés mais les récepteurs β4* dans l'IPN s'activeraient en parallèle afin d'induire un signal aversif pour arrêter la consommation. Un aspect essentiel de mon travail de recherche a été d'interroger ce modèle.

Cependant, cette théorie sur faibles/fortes doses se fonde sur un corpus de données assez indirectes tendant à montrer que les neurones de l'IPN ne répondent, et ne pourraient donc induire de l'aversion, qu'à de fortes doses de nicotine. Une étude a ainsi mesuré le marquage c-fos, proxy de l'activation neuronale, dans l'IPN suite à une injection intra-péritonéale de nicotine ou de saline (Fowler et al., 2011). Seule l'injection d'une forte dose de nicotine (1,5 mg/kg) entraîne une augmentation significative du marquage c-fos dans l'IPN. Dans une autre étude, les auteurs ont tenté de générer de l'aversion dans un protocole de CPA en activant l'IPN par optogénétique (Wolfman et al., 2018). Une stimulation à haute fréquence (20 Hz) permettait de générer un évitement du compartiment stimulé, ce qui n'était pas le cas à faible fréquence (1 Hz). Les auteurs concluent donc qu'il faut une forte activation de l'IPN pour induire de l'aversion, et *a fortiori* une forte dose de nicotine. Ces expériences, bien qu'elles fassent le lien entre IPN et aversion, n'interrogent pas l'impact fonctionnel et électrophysiologique de la nicotine sur l'activité *in vivo* des neurones de l'IPN, qui reste très peu connu. Il faut également noter que

la voie MHb-IPN exprime des récepteurs de haute affinité, contenant la sous-unité β2, dont le rôle aujourd'hui est inconnu (Beiranvand et al., 2014 ; Grady et al., 2009). De plus, de nombreux facteurs autres que la quantité de nicotine entrent en jeu dans la consommation de drogue comme la voie et la durée d'exposition, les différences inter-individuelles et les adaptations induites par une exposition chronique (Seconde publication). L'un des objectifs principaux de mon travail de recherche a été d'interroger cette séparation de circuits entre faibles et fortes doses pour déterminer si l'IPN pouvait être mis en jeu dès les premières prises de nicotine et l'impact éventuel de cette action sur la balance des propriétés renforçantes et aversives de la drogue (Première publication).

## 5.3. Développement d'outils pour manipuler les récepteurs nicotiniques

La théorie discutée ci-avant met en évidence la nécessité de comprendre le rôle spécifique de sous-populations de nAChR exprimées dans des structures d'intérêt - ici l'IPN et la VTA, qui sont anatomiquement juxtaposées - dans la dépendance à la nicotine. Les approches génétiques, pharmacologiques et optogénétiques qui ont été déployées jusqu'à présent pour étudier cette question ont été déterminantes pour accroître nos connaissances dans ce domaine. Cependant, ces stratégies présentent chacune des limites qui empêchent de comprendre comment ces récepteurs affectent la physiologie et la plasticité neuronale, et peuvent *in fine* sous-tendre le comportement. Les techniques génétiques (KO, *knock-down*, etc.) n'offrent pas une résolution temporelle suffisante pour établir un lien direct entre activation/blocage des récepteurs et modulations de la circuiterie et du comportement, et peuvent induire des mécanismes de compensation au cours du développement. *A contrario*, l'approche par pharmacologie classique administrée en systémique permet une action aiguë, souvent réversible et potentiellement dose-dépendante applicable à tout moment du développement. Cette approche demeure limitée en ce qui concerne les systèmes nicotiniques, en raison de la large distribution des nAChR dans le cerveau, de leur hétérogénéité et de leurs fonctions distinctes au sein de populations cellulaires et de réseaux spécifiques. L'infusion locale au sein de structures cérébrales précises peut résoudre la spécificité anatomique, mais la difficulté à contrôler le dosage et la diffusion au sein des tissus sont des handicaps majeurs à son utilisation. Enfin, l'optogénétique est un outil puissant pour lier la modulation temporellement précise d'un circuit et son rôle fonctionnel, mais ne permet pas de sonder avec suffisamment de précision les dynamiques de neurotransmission. Ainsi et à titre d'exemple, étudier la transmission nicotinique dans l'IPN en activant optogénétiquement ses afférences cholinergiques se heurte à plusieurs obstacles majeurs. Stimuler les afférences de la MHb provoquerait un relargage d'ACh mais également de glutamate dans l'IPN. L'ACh recruterait non seulement les nAChR mais aussi les récepteurs muscariniques locaux, tandis que le glutamate engagerait sa propre cascade de signalisation. Ces facteurs confondants empêchent d'isoler précisément la composante nicotinique par optogénétique.

Notre équipe a développé de nouvelles stratégies pour manipuler des nAChR spécifiques avec une grande précision spatiale, temporelle et pharmacologique (Figure 5.2). Ces technologies reposent sur l'attachement covalent de ligands sur des sous-unités de nAChR mutées (Tochitsky et al., 2012 ; Kramer et al. 2013 ; Paoletti et al., 2019). La mutation, substituant un acide aminé glutamate proche du site de liaison de l'agoniste par une cystéine (mutant E61C), sert ainsi de point d'ancrage à différents ligands

ingéniérés permettant des manipulations spécifiques (inhibition, activation, etc.) du récepteur. Cette approche combinant ciblage génétique via une mutation et développement de ligands attachés spécifiques a également été développée pour d'autres types de récepteurs, parmi lesquels des récepteurs du glutamate (Volgraf et al., 2006 ; Berlin et al., 2016), du GABA (Lin et al., 2014) ou de la dopamine (Donthamsetti et al., 2017). Une partie de mon travail a consisté à implémenter cette stratégie dans l'IPN afin de bloquer spécifiquement les récepteurs contenant soit la sous-unité β2 (β2E61C) soit la sous-unité β4 (β4E61C), pour comprendre leur rôle dans la réponse électrophysiologique et comportementale à la nicotine, et ce par deux approches complémentaires :

*Stratégie opto-chémogénétique ou photopharmacologique*

Elle repose sur l'incorporation d'un interrupteur photochimique, ici le MAHoCh (Maléimide - Azobenzène - HomoCholine), sur le récepteur muté (Tochitsky et al., 2012). La partie maléimide du MAHoCh va réagir avec la cystéine mutée et ancrer le ligand de manière covalente sur le récepteur, proche du site de liaison de l'agoniste. Le MAHoCh attaché change de configuration en fonction de la longueur d'onde d'illumination : dans le noir ou sous lumière verte (500 nm), l'azobenzène est sous forme *trans* « allongée » et l'homocholine reste éloignée du site agoniste, alors que sous lumière violette (380 nm), l'azobenzène est sous forme *cis* (« repliée ») et la partie homocholine entre en compétition avec l'agoniste pour inhiber le récepteur (Figure 5.2.A). La transition *cis-trans* est réversible et s'effectue soit rapidement grâce à la lumière verte (ordre de la milliseconde) soit lentement suite à une relaxation thermique (demi-vie du *cis* MAHoCh d'environ une heure en solution), le récepteur restant fonctionnel dans le noir ou sous lumière verte. Ces nAChR photo-contrôlables (LinAChR) permettent ainsi de bloquer optiquement et réversiblement avec une haute précision spatio-temporelle la transmission nicotinique, et ce avec une spécificité pharmacologique absolue (Figure 5.2.B). Des travaux récents de notre équipe ont ainsi démontré que les LinAChR β2 exprimés par transduction virale dans la VTA pouvaient être utilisés chez la souris afin de manipuler *in vivo* la réponse des neurones à la nicotine ainsi que le renfoncement induit par la drogue (Durand-de Cuttoli et al., 2018). J'ai déployé cette même approche avec un ciblage lentiviral pour la sous-unité β4 afin de sonder en temps réel l'impact de l'ACh et de la nicotine sur l'activité des neurones de l'IPN. (Données supplémentaires dans la discussion).

*Stratégie chémogénétique*

Cette approche est complémentaire à la stratégie photopharmacologique décrite ci-dessus, dont l'une des limites est la nécessité que l'animal demeure branché en continu à une source lumineuse pour maintenir l'antagonisme. Nous avons développé un nouveau ligand, le $MPEG_4Ch$ (Maléimide - PolyEthylèneGlycol(4) - Choline) qui fonctionne sur le même principe que le MAHoCh (Figure 5.2.A). Le MPEG va s'attacher covalemment sur les récepteurs mutés et antagoniser le récepteur de façon irréversible et durable dans le temps après une seule injection, ce qui facilite notablement le blocage de nAChR spécifiques dans des tâches comportementales de longue durée comme les expériences de CPP ou de consommation de nicotine (Figure 5.2.B). L'implémentation de cet outil dans l'IPN a été un axe essentiel de mon travail de recherche (Première publication).

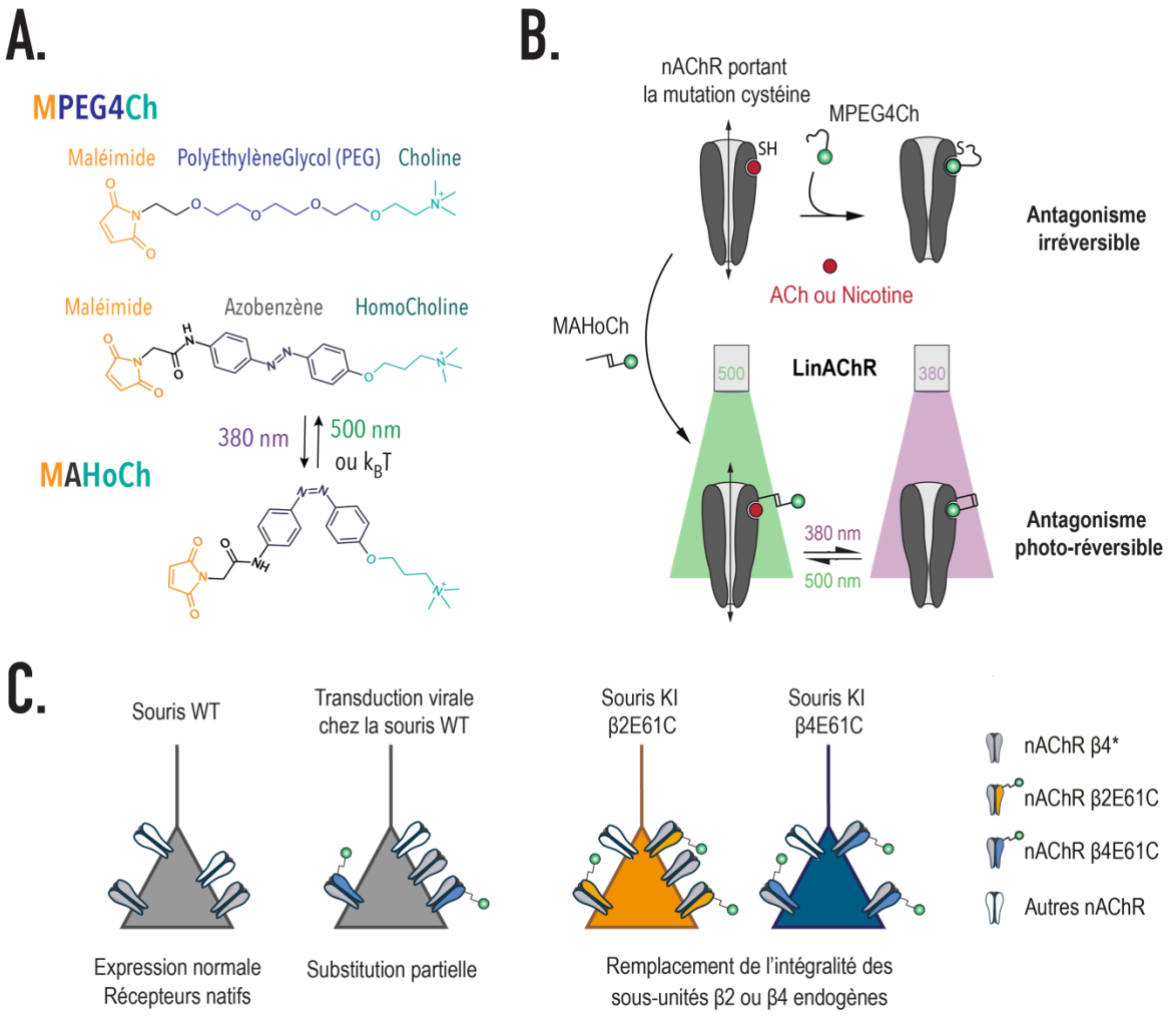



**Figure 5.2 – Stratégies de manipulation des récepteurs nicotiniques :** (**A**) Structures chimiques de l'antagoniste irréversible ($MPEG_4Ch$, haut) et de l'antagoniste photo-contrôlable (MAHoCh, bas). (**B**) Représentation schématique des stratégies chémogénétique (haut) et photopharmacologique (bas). (**C**) Techniques d'expression des sous-unités nicotiniques mutées. La transduction virale permet un remplacement ciblé mais partiel des sous-unités endogènes. Les souris *knock-in* (KI) permettent un remplacement complet par la sous-unité mutée avec un profil d'expression identique avec la condition sauvage (WT).

La première démonstration *in vivo* de notre stratégie photopharmacologique a été réalisée en exprimant la sous-unité mutée par transduction virale (Durand-de Cuttoli et al., 2018) (Figure 5.2.C). Cette approche par vecteur viral présente plusieurs avantages, dont la capacité de restreindre l'expression du mutant à une structure voire une population cellulaire définie, ainsi que d'interroger le rôle de la localisation spécifiques des récepteurs pré- et post-synaptiques. Elle présente cependant certaines limitations. La substitution avec la sous-unité mutante reste partielle, les neurones pouvant toujours exprimer la version native, ce qui ne permet pas un contrôle complet des récepteurs. De plus, la transduction virale n'est pas sélective dans la population visée, et peut donc conduire à des niveaux d'expression du transgène non physiologiques et/ou affecter des neurones n'exprimant pas nativement la sous-unité concernée. On peut également mentionner la contrainte technique liée à la nécessité d'une étape de transduction virale. Nous avons alors créé deux lignées de souris transgéniques *knock-in* (KI) : une pour la sous-unité β2 (KI β2E61C) et une pour la sous-unité β4 (KI β4E61C) (Figure 5.2.C). Chez ces souris, toutes les sous-unités β2/β4 porteront la mutation et seront exprimées en théorie à leur

localisation et à leurs niveaux endogènes. Ces souris permettent de s'affranchir des contraintes techniques liées à la transduction virale tout en assurant un marquage par nos ligands de potentiellement l'intégralité de la population de récepteurs. J'ai associé ces deux lignées à notre stratégie chémogénétique afin d'évaluer la contribution des sous-unités β2 et β4 dans la réponse de l'IPN à la nicotine *in vivo*, ainsi que dans le renforcement à la nicotine (Première publication).

# Première publication scientifique

## The interpeduncular nucleus blunts the rewarding effect of low-dose nicotine

Joachim Jehl, Éléonore Vicq, Maria Ciscato, Jacinthe Frangier, Nicolas Guyon, Sarah Mondoloni, Claire Nguyen, Jean-Pierre Hardelin, Fabio Marti, Pierre-Jean Corringer,
Philippe Faure* et Alexandre Mourot* (* co-derniers auteurs)

La nicotine présente des propriétés récompensantes et aversives selon la dose à laquelle elle est administrée. Le renforcement serait induit par de faibles doses de nicotine, alors que l'aversion émergerait quand la prise de nicotine devient importante. Un riche corpus illustre que le renforcement aux drogues d'abus comme la nicotine repose principalement sur la transmission dopaminergique issue des neurones de la VTA. L'IPN a quant à lui été plus récemment impliqué dans la traduction des propriétés aversives de la nicotine. Cette structure présente une forte densité et une grande hétérogénéité de nAChR, et exprime des sous-unités rares (α3, β4, α5) dont l'assemblage forme des récepteurs α3β4* dits « de faible affinité » pour la nicotine. Aussi, il a été proposé que l'IPN n'était engagé que par de fortes doses aversives de nicotine. Cependant, le rôle éventuel de l'IPN dans l'intégration des faibles doses de nicotine et de leurs effets renforçants n'a que peu été étudié. Nous avons ainsi cherché à évaluer les modalités du recrutement de l'IPN par la nicotine en termes de dose et de récepteurs impliqués, et l'impact de ce recrutement sur la VTA.

Nous avons mis en évidence grâce à des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* deux populations de neurones dans l'IPN selon la polarité de leur réponse à la nicotine : neurones activés et inhibés (augmentation et diminution de leur fréquence de décharge respectivement). Afin de disséquer les rôles spécifiques des nombreux sous-types de nAChR présents dans l'IPN dans ces réponses à la nicotine, nous avons développé un antagoniste irréversible permettant le contrôle spécifique des récepteurs contenant β2 ou β4 dans cette structure grâce à deux lignées de souris mutantes. Ces outils ont permis d'identifier un rôle spécifique des nAChR β2 dans l'inhibition et des nAChR β4 dans l'activation à la nicotine. Des enregistrements pairés entre l'IPN et la VTA ont par ailleurs révélé que l'IPN répondait significativement à de faibles doses de nicotine qui n'avaient aucun effet sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Bloquer la réponse à la nicotine dépendante de β4 dans l'IPN augmente la sensibilité de la VTA et les propriétés renforçantes de faibles doses de nicotine. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'IPN et les nAChR β4 qui y sont exprimés exercent un contrôle sur la réponse à la nicotine de la VTA dans la mise en place du renforcement à la drogue.

Contribution technique : J'ai réalisé et analysé l'ensemble des enregistrements *in vivo* en tétrodes et en photométrie fibrée, les chirurgies stéréotaxiques (injections, implantations de fibres optiques), ainsi que les expériences d'histologie et d'immunohistochimie. J'ai réalisé une partie des expériences de comportement et des analyses associées.

# The interpeduncular nucleus blunts the rewarding effect of low-dose nicotine

Joachim Jehl[1,2], Éléonore Vicq[1,2], Maria Ciscato[1], Jacinthe Frangier[3], Nicolas Guyon[1], Sarah Mondoloni[2], Claire Nguyen[2], Jean-Pierre Hardelin[1], Fabio Marti[1,2], Pierre-Jean Corringer[3], Philippe Faure[1,2*] and Alexandre Mourot[1,2*]

1. Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 75005 Paris, France.
2. Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France.
3. Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR 3571, Channel-Receptors Unit, Paris, France.

* equal contributions

## Abstract

Nicotine is rewarding at low dose because it stimulates ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons, while it is aversive at high dose, notably through its action on the interpeduncular nucleus (IPN). However, it is currently unknown whether the IPN also responds to low doses of nicotine *in vivo*, and if so, how it may affect the balance between the rewarding and aversive properties of the drug. To address this issue, we engineered a suicide inhibitor that prevents nicotine from binding to β2- or β4-containing nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) with high pharmacological and spatial precision in designer knock-in mice. By combining this chemogenetic tool with single-neuron recordings and behavioral tests, we show that nicotine injection activates and inhibits different populations of IPN neurons, and that β4-containing nAChRs are involved in the activation response only. Unexpectedly, we found that IPN neurons are more sensitive to nicotine than VTA neurons, and that blocking the response to nicotine in the IPN increased both the sensitivity of the VTA to the drug, and the rewarding effects of nicotine at low dose. Thus, we suggest that the IPN and the VTA already operate in concert at low dose of nicotine to control the motivational and aversive properties of the drug. Our data provide direct support for the modulation of addiction-related behaviors by low, non-rewarding concentrations of nicotine, by acting through IPN β4 nAChRs.

## Introduction

Nicotine is a highly addictive chemical substance found in the tobacco plant. Even though the percent of cigarette smokers currently decreases worldwide, there is a dramatic rise in the use of electronic nicotine delivery systems, particularly in teenagers [1]. Nicotine exerts its effects by binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) expressed in the central nervous system. These receptors belong to the family of pentameric ligand-gated ion channels. There are nine different alpha (α2-9) and

three different beta (β2-4) nAChR subunits in the brain, which co-assemble to form a variety of hetero- and homo-pentameric structures[2].

The initiation of addiction to nicotine involves the mesolimbic dopamine (DA) reward system [3]. Nicotine acts as a positive reinforcer by activating high-affinity β2-containing nAChRs located in the ventral tegmental area (VTA) [4–7], which ultimately increases DA release in the nucleus accumbens [8]. Nicotine also elicits "punishing" effects, depending on the dose. In particular, a reinforcing dose of nicotine simultaneously drives anxiogenic effects, through the inhibition of VTA DA neurons that project to the amygdala[8]. At higher doses, nicotine has been described as aversive [9–11]. These competing reinforcing and aversive properties of nicotine, together with the feeling of satiety, are consistent with the observation that humans and laboratory rodents titrate their nicotine intake when high doses are available [5,10–12].

The aversive effect of high-dose nicotine involves the neural pathway projecting from the medial habenula (Mhb) to the interpeduncular nucleus (IPN) [5,9,10]. Neurons belonging to this pathway express high densities of rare nAChR subunits, notably α3, α5 and β4 [13,14]. The α3 and β4 subunits are almost absent in the VTA [15] and in other parts of the brain[16,17]. Knock-out mice lacking α5[10] or β4[11,18] consume more nicotine than wild-type (WT) mice, especially at high doses, and consumption is rescued upon viral re-expression of these nAChR subunits in the Mhb [10,18] or IPN [11,18]. Similarly, knocking down α3 selectively in the Mhb or IPN [19], or pharmacologically blocking α3β4 nAChRs in the IPN [20], results in increased self-administration of nicotine in the rat. Because the α3β4 nAChR shows lower affinity for nicotine than the α4β2 nAChR [2,21], one current hypothesis is that nicotine is rewarding at low doses because it activates primarily α4β2 receptors of the VTA, while it is aversive at high doses because only then does it activate α3β4 nAChRs of the MHb-IPN axis [5,22]. Yet, there is only indirect evidence that the IPN only reacts to high concentrations of nicotine [10]. It is currently unknown whether the IPN also responds to low doses of nicotine *in vivo*, and if so, how it may affect the balance between the reinforcing and aversive properties of the drug.

To address this issue and get further insight into the receptor subtypes involved, we developed a chemogenetic approach to inhibit β2- and β4-containing nAChRs with high pharmacological and spatial precision in the living mouse. We installed a cysteine point mutation at amino acid position 61 (E61C) in β2 and β4, and we designed a complementary tethered ligand that can irreversibly antagonize the nAChRs containing these mutant subunits, but not WT receptors. We then produced two knock-in (KI) mouse lines, β2E61C and β4E61C, in which the WT subunit was genomically replaced by the corresponding mutant subunit, ensuring normal receptor expression profiles. Combining this chemogenetic approach with tetrode recordings and behavioral assays allowed us to assess the sensitivity of the IPN to nicotine and the role of this brain structure in setting the rewarding value of nicotine.

## Materials and Methods

### Animals

Mice were housed at 18-23 °C under a 12-hour light/dark cycle, with food and water available ad libitum. Female and male mice were used for the electrophysiology, whereas only male mice were used for the fiber photometry experiments and behavioral assays. All procedures for animal maintenance, surgery and behavior used protocols that were in accordance with the recommendations for animal experiments issued by the European Commission directives 2010/63, and approved by Sorbonne University and Paris Sciences et Lettres (PSL) University.

The transgenic mouse lines Chrnb4E61C and Chrnb2E61C were generated in the C57BL/6 N background using homologous recombination at the core facility Phenomin, Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch, France. Exons 3 and 4 were fused in both lines to prevent alternative splicing, owing to the overlap between the codon for E61 and the splice acceptor site. The following primers were used to genotype Chrnb4E61C mice: forward 5'-CCAAGAGAGATTTAGGTGACAGCTGG-3' and reverse 5'-CCTAACTCTAGACTTTGGCCACCCC-3'. The following primers were used to genotype Chrnb2E61C mice: forward 5'-GGGAAGACCAGAGGAGTGCTTG-3' and reverse 5'-GACAGTTTTGTGCCTTACAGGGG-3'. Mice were bred as homozygotes.

### Chemicals

$MPEG_4Ch$ chloride was custom-synthetized by Broadpharm, San Diego, CA (Purity 99.8%) and stored at -20°C in water-free DMSO. The nicotine used for all experiments is a nicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich, USA). For tetrode and fiber photometry recordings, we performed intravenous (i.v.) injection of both nicotine (example dose of 30 µg/kg) and saline (water with 0.9% NaCl) solutions. For the CPP paradigm, mice were injected intra-peritoneally (i.p.) with nicotine at 0.2 mg/kg and immediately placed in the apparatus. All solutions were prepared in the laboratory.

### Two-electrode voltage-clamp

Xenopus laevis oocytes were obtained from Centre de Ressources Biologiques-Rennes, France or from EcoCyte Bioscience, Germany, and maintained in modifed Barth's medium (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 2.5 mM $NaHCO_3$, 0.7 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES pH 7.3). Defolliculated oocytes were submitted to intranucleus injection of 2–5 ng of cDNA and kept at 18 °C for 2–5 days before recording. Recordings were performed with a Digidata 1550A (Molecular Devices) digitizer, an Oocyte Clamp OC-725C (Warner Instruments) amplifier and using the pClamp 10.5 software. Oocytes were perfused with Ringer's buffer (100 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES pH 7.3) using a gravity-driven system. ACh was applied after dilution in Ringer's buffer. All currents were measured at -60 mV.

### Patch-clamp electrophysiology

Mice were deeply anesthetized with an i.p. injection of a mixture of ketamine (150 mg/kg, Imalgene 1000, Merial) and xylazine (60 mg/kg, Rompun 2%, Bayer). Coronal midbrain sections (250 mm) were sliced using a Compresstome (VF-200; Precisionary Instruments) after intra-cardiac perfusion of cold (0–4℃) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 $NaH_2PO_4$, 5.9 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 25 Sucrose, 2.5 Glucose, 1 Kynurenate. After 10 min at 35℃ for recovery, slices were transferred into oxygenated (95% $CO_2$/ 5% $O_2$) aCSF containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 $NaH_2PO_4$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 15 Sucrose, 10 Glucose at room temperature for the rest of the day. Slices were labeled individually with MPEG4Ch in oxygenated aCSF (50 µM) for 10 min, and transferred to a recording chamber continuously perfused at 2 ml/min with oxygenated aCSF. Patch pipettes (5–8 MΩ) were pulled from thin-wall borosilicate glass (G150TF-3, Warner Instruments) using a micropipette puller (P-87, Sutter Instruments) and filled with a K-Gluconate based intra-pipette solution containing (in mM): 135 KGlu, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 ATP-Mg, 0.2 GTP-Na and 2 mg/mL biocytin (pH adjusted to 7.35). Cells were visualized using an upright microscope with a Dodt contrast lens and illuminated with a white light source (Scientifica). Whole-cell recordings were performed using a patch-clamp amplifier (Axoclamp 200B, Molecular Devices) connected to a Digidata (1550 LowNoise acquisition system, Molecular Devices). Currents were recorded in voltage-clamp mode at -60 mV. Signals were low pass filtered (Bessel, 2 kHz) and collected at 10 kHz using the data acquisition software pClamp 10.5 (Molecular Devices). Electrophysiological recordings were extracted using Clampfit (Molecular Devices) and analyzed with R. To record nicotinic currents from IPN neurons, local puffs (200 ms) of nicotine tartrate (30 µM in aCSF, Sigma-Aldrich) were applied every minute, using a glass pipette (2– 3 mm diameter) positioned 20 to 30 µm away from the soma and connected to a picospritzer (World Precision Instruments, adjusted to ~2 psi).

### Stereotaxic surgeries

For virus and $MPEG_4Ch$ injections, as well as for optic fiber implantations, mice were exposed to a gas mixture of oxygen (1 L/min) and 3% isoflurane (Piramal Healthcare, UK) for induction of anesthesia, and then placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA, USA) under 1% isoflurane to maintain proper anesthesia throughout the surgery. A local anesthetic (Lurocaine®, 100 µL at 0.67 mg/kg) was applied at the location of the scalp incision before the procedure. A median incision revealed the skull which was drilled at the level of the targeted structure. At the end of the surgery, an analgesic solution of buprenorphine (Buprecare®, 1 mg/kg) was injected subcutaneously to prepare awakening, and supplemented the following recovery days if necessary.

### Tetrode recordings

Mice were deeply anaesthetized with i.p. injection of chloral hydrate (8%, 400 mg/kg), supplemented as required to maintain optimal anesthesia throughout the experiment. After placement of the animal in the stereotaxic apparatus, the saphenous vein was catheterized (30G needle fitted into

polyethylene tubing PE10 connected to a Hamilton syringe) for intravenous administration of both saline and nicotine. The scalp was opened and a hole was drilled in the skull above the location of the targeted structure (IPN and/or VTA). Experiments were carried out with a Thomas Recording Mini-Matrix fitted with independently movable tetrodes (Tip shape A, Z = 1–2 MΩ) to record neuronal activity, and a stainless-steel cannula (OD 120 μm) for $MPEG_4Ch$ and dye injections. Each recording consisted in a baseline period of 5 minutes before injection of either saline or nicotine, selected pseudo-randomly. Subsequent injections were spaced by at least 5 minutes after saline and 15 minutes after nicotine. For nicotine dose-response experiments, mice received two to four injections of nicotine at doses of 7.5, 15, 30 and/or 60 μg/kg (pseudo-randomly administered).

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

Firing frequency was measured on successive windows of 60 s shifted by 15-second time steps (45 s overlapping period). Basal neuronal activity was defined on at least five-minute recording. For each neuron, the firing frequency was rescaled as a percentage of its baseline value averaged during 3 minutes before i.v. injection. The responses to both saline and nicotine are thus presented as a percentage of variation from baseline (mean ± S.E.M.). To classify neurons as "activated" or "inhibited", we performed the following analysis. First, we calculated the maximal variation from the baseline per neuron, within the first 3 minutes following nicotine injection. Neurons displaying an increase in firing frequency were defined as activated, while neurons displaying a decrease in firing frequency were defined as inhibited. For the dose-response curves, neurons were classified as activated or inhibited based on their response to the highest nicotine dose received. For saline injections, the polarity of the variation was defined based on the response to nicotine (i.e. in activated neurons, we considered that saline also increased activity). We used a bootstrapping method to identify neurons that significantly responded to nicotine injections. Baseline spike intervals were randomly shuffled 1000 times. For each neuron we determined the percentile from the shuffled data corresponding to the nicotine-evoked response (max or min frequency after nicotine injection). Neurons were individually considered as responsive to nicotine injection if this percentile is ≥ 0.98 (activated) or ≤ 0.02 (inhibited). The effect of nicotine was assessed by comparing the maximum of firing frequency variation induced by nicotine and saline injection. For activated (respectively inhibited) neurons, the maximal (respectively minimal) value of firing frequency was measured within the response period (3 minutes) that followed nicotine or saline injection.

To assess the proper location of recordings, injections of dye (Chicago Sky Blue 6B, Sigma-Aldrich) were performed at the mean stereotaxic coordinates of recordings (500 nL at 10 nL/s). Recordings in mice where dye location was outside of the targeted structure were excluded from the analysis. Spontaneously active pDA neurons were identified on the basis of previously established electrophysiological criteria (regular firing rate; firing frequency between 1 and 10 Hz) and proper post hoc dye location in the VTA. For chemogenetic experiments, $MPEG_4Ch$ was infused (250 µM in aCSF at the rate of 10 nL/s) within either the VTA (500 nL) or the IPN (700 nL) at least an hour before recordings started. All the data were analyzed with R (https://www.r-project.org).

### Fiber photometry

8-week-old WT mice were injected with AAV1-syn-jGCaMP7c (pGP-AAV-syn-jGCaMP7c variant 1513-WPRE, titer $1.1e^{13}$ vg/mL, Addgene, MA, USA, https://www.addgene.org/105321/) in either the VTA (AP -3.10 mm, ML ± 0.5 mm, DV -4.5 mm from bregma, 1µL, 100 nL/min) or the IPN (AP - 3.50 mm, ML ± 0.40 mm, DV - 4.7 mm from bregma, 700 nL, 100 nL/min). Optical fibers (200 µm core, NA = 0.39, Thor Labs) coupled to a stainless-steel ferule (1.25 mm) were implanted after virus injection slightly above (0.05 to 0.2 mm) those coordinates, and fixed to the skull with dental cement (SuperBond, Sun medical). Recordings started at least 4 weeks after surgery.

Fluorescent levels were recorded using a Doric Lenses 1-site 2-color fiber photometry system. The fiber photometry console was connected to the LED driver to control two connectorized LED in Lock-in mode (CLEDs, 405 nm CLED modulated at 333,786 Hz and 465 nm CLED modulated at 220.537 Hz) that were connected to their respective ports on the Mini Cube through an optic patch cord. Light stimulation and recorded fluorescence were transmitted through an optical fiber (400 µm core, NA = 0.39, Thorlabs) connected both to the animal's implanted optical fiber via a zirconia sleeve and to the sample port on the Mini Cube. Finally, the photoreceiver converting recorded light to electrical signals (AC Low setting, New Focus 2151 Visible Femtowatt Photoreceiver, New Focus, San Jose, CA, USA) was connected to the Mini Cube through an optic path cord (600 µm core, NA = 0.48, FC-FC, Doric Lenses) fitted on a fiber optic adapter (Doric Lenses) and to the fiber photometry console. Signal was acquired through Doric Neuroscience Studio software (version 5.2.2.5) with a sampling rate of 12.0 kS/s (kilosamples per second) and a low-pass filter with a cutoff frequency of 12.0 Hz.

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

All fiber photometry data were analyzed on R software. First, data were down-sampled by a 100-factor. We subtracted the mean value of "autofluorescence" (signal acquired after each recording with

the same parameters, but without the optic fiber attached to the mouse) to the signal. We then fitted an exponential to this signal and subtracted it before adding an offset equal to the mean of the signal before detrending to account for the slow decay of the signal due to bleaching during recording. We defined a baseline fluorescence value (F0) as the mean fluorescence of the signal during 120 seconds before injection time, for each injection (saline and nicotine) individually. We then calculated normalized variation in fluorescence (ΔF/F) as (F-F0)/F0 for each injection. The analysis was carried out by averaging each ΔF/F obtained for each condition (all saline or nicotine injections done in IPN implanted (n =7) mice, same for saline or nicotine in VTA (n = 5) mice). For each injection (saline and nicotine), maximum fluorescence was detected within a 180 seconds window after injection.

### Conditioned place preference (CPP)

The Conditioned Place Preference (CPP) experiments were performed in a Y-maze apparatus (Imetronic, Pessac, France) with one closed arm and two other arms with manually operated doors. Two rectangular chambers (11 x 25 cm) with different cues (texture and color) are separated by a center triangular compartment (side of 11 cm) used as a neutral compartment. One pairing compartment has grey textured floor and walls and the other one has smooth black and white striped walls and floor. All animals were handled for at least five days before starting the experiment. The first day (pretest) of the experiment, without previous habituation to the apparatus, mice (n = 6–8 animals/group) explored the environment for 900 s (15 min) and the time spent in each compartment was recorded. Conditioning was unbiased: pretest data were used to segregate the animals with equal bias so each group has an initial preference score almost null, indicating no preference on average. On day 2, 3 and 4, animals received an i.p. injection of saline (0.9% sodium chloride) or nicotine tartrate (0.2 mg/kg, in saline), and were immediately confined to one of the pairing chambers for 1200 s (20 min). Groups were balanced so that animals did not all receive nicotine in the same chamber. On the same day, at least 5 hours after the first pairing, mice received an injection of the alternate solution (nicotine or saline) and were placed in the opposite pairing chamber. On day 5 (test), animals were allowed to freely explore the whole apparatus for 900 s (15 min), and the time spent in each chamber was recorded. The preference score is expressed in seconds and is calculated by subtracting pretest from test data. Trajectories and time spent on each side are calculated based upon animal detection. Place preference and locomotor activity were recorded using a video camera, connected to a video-track system. A home-made software (Labview 2014, National Instruments) tracked the animal, recorded its trajectory (30 frames per s) for the duration of each session.

For chemogenetic experiments, $MPEG_4Ch$ (250 μM in aCSF, 700 nL at 100nL/min) or an equivalent volume of aCSF was injected under light gas anesthesia 3 days before the start of CPP paradigm. The experiments were performed in a double-blind fashion. Behavioral data were collected using home-made LabVIEW (National Instruments) and analyzed using ezTrack[23].

### Brain Slicing and Immunostaining

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

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R software with home-made routines. No statistical methods were used to predetermine sample sizes. Data are plotted as mean ±SEM. Total number (n) of observations in each group and statistics used are indicated in figure and/or figure legend. Unless otherwise stated, comparisons between means were performed using parametric tests (Student's t-test, One-way or two-way repeated measures ANOVA) when parameters followed a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test with $p > 0.05$), and non-parametric tests (here, Wilcoxon or Mann-Whitney (U-test)) when this was not the case. Homogeneity of variances was tested preliminarily and the t-tests were Welch-corrected if needed. Likewise, one-sample comparisons to 0 were performed using t-test when the parameter followed a normal distribution and with a Wilcoxon test otherwise. Multiple comparisons were Holm-Bonferroni corrected. Comparison between the cumulative distributions was performed using a Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.05$ was considered to be not statistically significant). Proportion of nicotine-activated VTA neurons in sham versus $MPEG_4Ch$ experiments (Figure 5B) were compared with Pearson's Chi-squared test.

## Results

### Conditioning at low-dose nicotine in $\beta4^{-/-}$ mice

To evaluate the rewarding properties of low-dose nicotine, we employed an unbiased conditioned place preference (CPP) paradigm (Figure 1A). Acute nicotine injected intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/kg consistently induces a preference for the drug-paired chamber in C57BL/6 mice, as shown by our lab [6] and many others [24–27]. Lower doses usually produce neither aversion nor preference for the drug in the WT mouse [27–29]. We found that, indeed, a low dose of nicotine (0.2 mg/kg) did not induce preference compared to saline in the wild-type mouse (Figure 1B, C). However, the same dose did

induce preference in mutant mice lacking the β4 subunit. This subunit is abundant in the MHb-IPN pathway, and virtually absent in the other brain regions including the VTA [15]. Therefore, this result may indicate that low doses of nicotine can affect low-affinity β4-containing nAChRs, conceivably in the MHb-IPN pathway, to modulate the rewarding effect of the drug. To address this question, we first developed a chemogenetic method that would allow long-lasting and exclusive manipulation of low-affinity β4 and high-affinity β2 nAChR subtypes in targeted brain regions.

### Designing chemogenetic tools for sustained nAChR antagonism

We had previously developed a chemogenetic approach for manipulating specific nAChR isoforms in the living mouse with light [6,30]. This approach relies on the covalent attachment of a photoswitchable tethered ligand (named MAHoCh) close to the acetylcholine binding pocket, through a cysteine substitution at position 61 (E61C) on the β2 or β4 nAChR subunit. Although this method allows rapid and reversible control of nicotinic signaling, its use *in vivo* requires mice to be constantly tethered to an external light source, which is complicated for long lasting behavioral experiments [31]. Here, we sought to extend the chemogenetic toolbox for nAChR control, by developing a method that would allow sustained receptor antagonism without the need to use light as a stimulus. The idea is to covalently attach a synthetic antagonist to a genetically-encoded cysteine tag on the nAChR surface, at close proximity to the agonist binding pocket (Figure 2A). The antagonist acts as a suicide inhibitor: its covalent attachment to the cysteine residue should, in theory, increase the local concentration of the antagonist in the vicinity of the receptor and lead to permanent occupation of the agonist binding pocket, and therefore to sustained antagonism. The newly developed tethered antagonist, named $MPEG_4Ch$, contains a cysteine-reactive maleimide (M) group on one end, a choline (Ch) ligand on the other end, and a flexible poly-ethylene glycol (PEG) linker in between (Figure 2A). To maximize the versatility of our chemogenetic toolbox, we designed $MPEG_4Ch$ so that it antagonizes nAChRs after attachment to the very cysteine residue (at position 61) that was used to make nAChRs photocontrolable [6,30]. The size of the PEG linker (4 ethylene glycol units) was thus chosen to match that of the photoswitchable azobenzene linker in MAHoCh (Figure S1A).

To experimentally test our strategy, we first heterologously expressed WT and cysteine-substituted α4β2 and α3β4 nAChRs in Xenopus oocytes. We found that the mutation of glutamate 61 to cysteine had no effect on the sensitivity of the α3β4 and α4β2 nAChRs to ACh (Figure 2B), showing that the cysteine-substituted receptors are fully functional, in agreement with previous reports [30]. Incubation of the oocytes with 15 μM $MPEG_4Ch$ potently inhibited ACh-induced current in α3β4E61C (over 80%) and α4β2E61C nAChRs (over 60%), at both $EC_{50}$ and saturating concentrations (Figure 2C).

### Knock-in mice for the manipulation of endogenous nAChRs

To manipulate nicotinic signaling while preserving endogenous nAChR expression patterns, we produced two knock-in mouse lines, β2E61C and β4E61C, carrying a single point mutation in the genes encoding the nAChR β2 and β4 subunits, respectively (Figure S1B). Patch-clamp recordings in IPN brain

slices indicated that the amplitude of nicotine-induced currents was identical in the mutant mice and in the WT mice (Figure 2D, E), suggesting unchanged nAChR expression profiles in the neurons of mutant mice. Together, these results suggest that the introduction of the cysteine mutation perturbs minimally (if at all) nicotinic signaling.

We then tested the ability of $MPEG_4Ch$ to specifically inhibit nicotinic current in neurons of the mutant mice. IPN brain slices from adult WT, β2E61C and β4E61C mice were treated for 10 min with $MPEG_4Ch$, extensively washed, and the amplitude of nicotine-induced currents was measured in whole-cell patch-clamp recordings. We found that $MPEG_4Ch$ treatment significantly decreased the amplitude of the response to nicotine in β4E61C mice, but had no effect in β2E61C and WT mice (Figure 2E, F). These results confirm that β4-containing nAChRs are the main receptor subtype in the IPN, and that the engineered cysteine mutation is required for $MPEG_4Ch$-induced nAChR antagonism. The lack of antagonism in the β2E61C mouse suggests that β2-containing nAChRs are little expressed in the soma of IPN neurons.

Because MPEG4Ch covalently reacts with cysteine residues, we tested the persistence of antagonism on the mutant β4E61C receptor. To this aim, $MPEG_4Ch$ was infused into the IPN of anesthetized WT and β4E61C mice, and brain slices were prepared 1 to 20 days after the intracranial infusion (Figure 2F). We found that the antagonistic effect of $MPEG_4Ch$ on β4E61C nAChRs persisted for as long as 20 days after a single injection in the IPN. Therefore, $MPEG_4Ch$ is a covalent ligand that achieves high potency, long-lasting and subtype-specific antagonism of β2E61C and β4E61C mutant nAChRs.

### Dose-dependent effect of nicotine on IPN neurons *in vivo*

We then sought to evaluate the sensitivity of the IPN to acute nicotine injections *in vivo*. Electrophysiological recordings remain the most sensitive and direct method for monitoring variations in neuronal action potential firing. We used a microdrive multielectrode manipulator directly mounted onto the head of an anesthetized mouse to record the electrical activity of IPN neurons with tetrodes (Figure 3A). At the end of the experiment, blue dye was pressure-injected at the median coordinates of recordings, to confirm the location of the tetrodes within the IPN. We observed that acute intravenous (i.v.) injection of a dose of nicotine (30 μg/kg) that is classically used for recordings VTA neurons [6,8,32] evoked opposing responses (activation vs. inhibition) in IPN neurons (see two representative IPN neurons recorded simultaneously in Figure 3A), as already observed for VTA DA neurons [8]. At the population level, the variation in firing frequency had a bimodal distribution for nicotine: of the 168 neurons recorded, 97 (58 %) showed an increase in firing rate, while 71 (42 %) showed a decrease in firing rate with nicotine injection, and these variations were absent with saline injection (Figure 3B). On average, nicotine increased the firing rate of activated neurons by 160 ± 12 %, while it decreased the firing rate of inhibited neurons by 65 ± 3 % (Figure 3C). The absolute change in firing rate was + 4.85 Hz for activated neurons (+ 0.25 Hz for saline) and - 3.13 Hz for inhibited neurons (- 0.21 Hz for saline, Figure S2A). The two populations of neurons could not be distinguished based on their spontaneous

firing rate before nicotine injection (Figure 3D), but there was a correlation between the basal spontaneous firing rate and the amplitude of the response to nicotine injection, in both activated and inhibited cells (Figure S2B). These results agree with previous data obtained using the juxtacellular technique in neurons that were labelled to confirm their location in the IPN [11].

We then assessed the sensitivity of IPN neurons to a range of nicotine doses (7.5 to 60 μg/kg). We found that the effect of nicotine on the firing frequency was highly dose-dependent, but that the polarity of the response was not. Indeed, neurons that were activated by nicotine at 30 μg/kg were activated at all doses tested, and neurons that were inhibited by nicotine were inhibited at all doses tested (Figure 3E). Most of the neurons (36/37), whether activated or inhibited, responded to the lowest dose of 7.5 μg/kg.

### Contribution of β2- and β4-containing nAChRs to the response of IPN neurons to nicotine

We employed our new chemogenetic strategy *in vivo* to assess the contribution of β2- and β4-containing nAChRs to the response of IPN neurons to nicotine. $MPEG_4Ch$ was locally infused in the IPN of WT or knock-in mice using the microdrive multielectrode manipulator, and the electrical activity of IPN neurons was recorded after a couple of hours. In β4E61C mice treated with $MPEG_4Ch$, the amplitude of nicotine-induced activation was markedly reduced compared to WT mice, while the amplitude of nicotine-induced inhibition was unchanged (Figure 3F). In β2E61C mice treated with $MPEG_4Ch$, there was a substantial reduction in the amplitude of the response in inhibited neurons, when compared to WT control animals, and a small but non-statistically significant effect of $MPEG_4Ch$ on the population of activated neurons (Figure 3F). Saline injections had minimal effects in all of the groups. Together, these results indicate that β4-containing nAChRs primarily contribute to the response to nicotine injection in activated neurons, while β2-containing nAChRs primarily contribute to the response to nicotine injection in inhibited neurons.

### Different sensitivities of the IPN and VTA to nicotine injection

Our results indicate that IPN neurons respond to i.v. nicotine doses as low as 7.5 μg/kg. In contrast, VTA DA neurons consistently start responding to nicotine at twice this dose (15 μg/kg) [8,31,32]. To assess the relative sensitivities of the VTA and the IPN to low doses of nicotine, we performed two independent experiments. Firstly, we recorded the bulk activity in each brain structure, using the genetically-encoded calcium sensor GCaMP7c and the fiber photometry technique. WT mice were transduced either in the VTA or in the IPN with AAV1-hSyn-GCaMP7c, and an optic fiber was implanted right above the target structure (Figure 4A and C). Proper transduction and fiber location were verified with post-hoc immunochemistry. Mice were anesthetized and different doses of nicotine (7.5 - 60 μg/kg) were i.v. injected while monitoring the GCaMP signal. We found that nicotine injection increased the calcium signal in the IPN at all doses tested (Figure 4B). In contrast, responses to nicotine in the VTA were only detected at the 30 μg/kg dose onward (Figure 4D).

Secondly, we set up a simultaneous recording of the nicotine response in both brain structures in the same mouse. We took advantage of the microdrive multielectrode manipulator to lower one tetrode in each structure (Figure 4E), and nicotine was i.v. injected at different doses (7.5 to 60 μg/kg). We observed that 7.5 μg/kg nicotine induced a significant increase in firing rate in IPN neurons, but not in VTA putative DA (pDA) neurons, compared to saline (Figure 4F, G). The lowest dose of nicotine at which pDA neurons responded was 15 μg/kg (Figure 4G), in agreement with previous recordings on identified VTA DA neurons [16–18]. Overall, the amplitude of firing frequency variation was greater in IPN neurons than in pDA neurons at all doses tested. Together, these optical and electrophysiological recordings strongly suggest that the IPN responds to lower doses of nicotine, and with greater amplitudes, than the VTA.

### The IPN lowers the rewarding properties of nicotine at low dose

Because it can be difficult to compare the effect of drugs in two distinct regions of the brain, we decided to check whether manipulating the response to nicotine in the IPN had an impact on the response to the drug in the VTA. We used our newly developed chemogenetic method to block the response to nicotine solely in the IPN. $MPG_4Ch$ (or sham for control mice) was infused into the IPN of β4E61C mice, and the response to nicotine i.v. injections was subsequently measured in the VTA with tetrodes (Figure 5A). Only $MPG_4Ch$-treated mice, and not control mice, responded to the injection of low-dose (7.5 μg/kg) nicotine (Figure 5B). The amplitude of the response was greater for $MPG_4Ch$-treated mice than for control animals for 7.5 μg/kg of nicotine (Figure 5C). Therefore, blocking the response to nicotine selectively in the IPN reduced the threshold of the response to the drug in the VTA. To rule out the possibility that $MPG_4Ch$, when injected in the IPN, would have diffused in the VTA to produce its effects, we did another control experiment. We infused $MPG_4Ch$ in the VTA of β4E61C mice, and determined the response of pDA neurons to injections of 7.5 and 30 μg/kg nicotine. We found that intra-VTA infusion of $MPG_4Ch$ had no effect on the response of pDA neurons to nicotine (Figure S3A), in agreement with the non-detectable levels of β4-containing nAChRs in this dopaminergic nucleus [15].

We wondered whether the increased sensitivity of the VTA to nicotine could explain the rewarding effect of low-dose nicotine observed in mice lacking the β4 subunit (Figure 1). We blocked β4 nAChRs selectively in the IPN with $MPG_4Ch$ in β4E61C mice, and repeated the CPP paradigm (Figure 5D). Sham-injected β4E61C mice were used as a control. $MPG_4Ch$ was injected 3 days before the beginning of the CPP, ensuring nAChR antagonism for the entire conditioning protocol. We found that only $MPG_4Ch$-treated mice developed preference for low-dose nicotine (Figure 5E, F). Together, these behavioral and physiological results suggest that the rewarding properties of nicotine can be blunted by IPN β4-containing nAChRs, especially at low dose.

## Discussion

Making receptors light-controllable is a powerful method for probing neurotransmission with high spatiotemporal precision [31,34], yet it is not convenient for manipulations that last days, especially in

the behaving mouse. Hence, we extended the toolbox for nAChR control, by developing two knock-in mouse lines (β2E61C and β4E61C) and a corresponding suicide inhibitor that covalently attaches to the cysteine-substituted amino acid installed in the mutant mice. The newly developed tethered ligand $MPEG_4Ch$ provides potent, immediate (maleimides react within minutes with thiols[35]), sustained (days) and pharmacologically specific (nAChRs containing β2 or β4 subunits) antagonism of endogenous nAChR subtypes in targeted brain regions. This combination of properties is difficult to achieve with traditional pharmacology tools, because small molecules rarely show receptor-subtype specificity, and because their effect wares off rapidly due to diffusion in brain tissue. Gene knock-down strategies with shRNAs can achieve long-lasting inhibition of receptors in targeted tissue, but the overall degree of silencing was found to vary tremendously [36], and the effect takes weeks to occur after viral infusion. We used this method in knock-in mice, in which the nAChR WT subunit has been genomically replaced by a mutant subunit, to ensure proper expression profiles. In principle, these two mutant mice could also be used in combination with previously-developed photoswitchable tethred ligands [6,30] to afford rapid, optical manipulation of endogenous nAChRs. Alternatively, $MPEG_4Ch$ could also be used with virus-mediated transduction of the mutant subunit, to afford cell-specific pharmacology [6,34]. In the knock-in mice, a single bolus dose of $MPEG_4Ch$ resulted in robust receptor inhibition for several days, which suggests that bioconjugation of $MPEG_4Ch$ to the thiol group of cysteines is fully irreversible, as demonstrated for PEG-substituted maleimide reagents [35]. It also suggests that the lifetime of nAChRs *in vivo* is in the range of weeks, which is compatible with the median lifetime of about 10 days measured for neuronal receptors in the mouse brain [37].

A previous study based on c-fos imaging reported that the IPN only responds to a high, aversive dose of nicotine, and not to a lower, rewarding dose [10]. This has led to the hypothesis that the IPN is only engaged at high nicotine doses to limit drug intake [5,22]. At low doses, the rewarding effect of nicotine would motivate intake, while at higher doses, its aversive effects would motivate avoidance. However, relatively little was known regarding the response of the IPN to nicotine. By recording the electrical activity of IPN neurons *in vivo*, we indeed unveiled the pronounced sensitivity of the IPN to low-dose nicotine. We found that the IPN responds to concentrations of nicotine that do not activate the brain reward pathway. More importantly, we found that the effect of low-dose nicotine on the IPN is translated into a decreased potency and decreased efficacy of the drug in the VTA. We therefore suggest that the competing rewarding/aversive effects of nicotine occur at all nicotine doses, and that the two neural circuits (encompassing the IPN and the VTA) do not work in isolation, which has important consequences for the control of nicotine consumption. Our results also reveal that low, non-rewarding concentrations of nicotine can modulate addiction-related behaviors by acting through β4 nAChRs, which are usually considered low-affinity receptors [21]. It is noteworthy however, that we (and others [27–29]) did not observe aversion to low-dose nicotine in the WT mouse. This indicates that the IPN does not necessarily transmit an aversive signal to the brain; it may act by reducing the reward value of the nicotine that arises from the activation of VTA dopaminergic neurons.

The mechanism by which the IPN reduces the effect of nicotine in the VTA remains unclear. There is no evidence for a direct neural connection from the IPN to the VTA [38,39], but the laterodorsal

tegmentum (LDTg) has been identified as an important functional relay between the two structures: GABAergic projections from the IPN to the LTDg are modulated by nicotine, and their optogenetic stimulation elicits avoidance behavior [22]. The LDTg, in turn, sends excitatory glutamatergic and cholinergic afferents to the VTA, and activation of these inputs mediates reward [40,41]. It is thus possible that nicotine, by activating GABAergic projections from IPN to LDTg, gates afferent excitatory signals onto the VTA, thereby decreasing its direct impact on DA neurons. The IPN is nevertheless a complex, heterogenous structure with multiple subnuclei and different populations of GABAergic projection neurons and interneurons with precise molecular and anatomical signatures [38,42,43]. Nicotine-activated and -inhibited neurons could not be identified from basal electrophysiological criteria alone, but they probably express β2 and β4 nAChRs in different proportions and/or in different subcellular compartments. Indeed, blocking β4 nAChRs potently affected the response to nicotine, yet only in activated neurons, whereas blocking β2 mainly affected the population of neurons that is inhibited by nicotine. These data strongly suggest that β4 nAChRs have a heterogenous distribution in the IPN, and notably that they are highly expressed in neurons that are activated by nicotine. Given that nicotine drives opposite effects, activation and inhibition, on distinct IPN neurons, future studies will be needed to determine whether IPN neurons that project to the LDTg are activated or inhibited by nicotine.

## Author contributions

Conceptualization: JJ, AM and PF
Methodology: AM
Validation: FM, PJC, PF, AM
Formal analysis: JJ, EV, MC, JF, NG, SM, CN
Investigation: JJ, EV, MC, JF, NG, SM, CN
Writing, original draft: AM and JJ
Writing, review and editing: AM, JJ, NG, JPH and PF
Visualization: JJ, EV, AM
Supervision: FM, PJC, PF, AM
Funding acquisition: PJC, PF, AM


## Acknowledgements

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

## Funding

Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE16-0012 CHOLHAB to AM)
Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE37-0026 NICOPTOTOUCH to AM and PJC)
Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU201903007961 to PF)
Institut National du Cancer Grant TABAC-16-022 and TABAC-19-02 (to PF)
PhD fellowship from Fondation pour la recherche médicale (FRM) (to JJ)
Fourth-year PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT201904008060 to SM).

Fourth-year PhD fellowship from the Memolife Labex (to JJ)
Fourth-year PhD fellowship from the Biopsy Labex (to CN)

## Declaration of interests

The authors declare no competing interest.

## References

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

2. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. & Changeux, J.-P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat Rev Drug Discov 8, 733–750 (2009).

3. Volkow, N. D. & Morales, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. Cell 162, 712–725 (2015).

4. Maskos, U. et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature 436, 103–107 (2005).

5. Wills, L. et al. Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. Pharmacological Reviews 74, 271–310 (2022).

6. Cuttoli, R. D. et al. Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. eLife 7, (2018).

7. Tolu, S. et al. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. Mol Psychiatry 18, 382–393 (2013).

8. Nguyen, C. et al. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. Neuron 109, 2604-2615.e9 (2021).

9. Frahm, S. et al. Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of beta4 and alpha5 Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. Neuron 70, 522–535 (2011).

10. Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J. & Kenny, P. J. Habenular α5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. Nature 471, 597–601 (2011).

11. Mondoloni, S. et al. Prolonged nicotine exposure reduces aversion to the drug in mice by altering nicotinic transmission in the interpeduncular nucleus. Biorxiv 2021.12.16.472949 (2022).

12. Tuesta, L. M. et al. GLP-1 acts on habenular avoidance circuits to control nicotine intake. Nature Neuroscience 20, 708–716 (2017).

13. Gotti, C. et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. Biochemical Pharmacology 78, 703–711 (2009).

14. Grady, S. R. et al. Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release. J. Neurosci. 29, 2272–2282 (2009).

15. Klink, R., d'Exaerde, A. de K., Zoli, M. & Changeux, J.-P. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. J. Neurosci. 21, 1452–1463 (2001).

16. Salas, R., Pieri, F., Fung, B., Dani, J. A. & Biasi, M. D. Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. J. Neurosci. 23, 6255–6263 (2003).

17. Zoli, M., Pistillo, F. & Gotti, C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. Neuropharmacology 96, 302–311 (2015).

18. Husson, M. et al. β4-Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. J. Neurosci. 40, 3465–3477 (2020).

19. Elayouby, K. S. et al. α3* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenula-Interpeduncular Nucleus Circuit Regulate Nicotine Intake. J. Neurosci. 41, 1779–1787 (2021).

20. Glick, S. D., Sell, E. M., McCallum, S. E. & Maisonneuve, I. M. Brain regions mediating α3β4 nicotinic antagonist effects of 18-MC on nicotine self-administration. European Journal of Pharmacology 669, 71–75 (2011).

21. Grady, S. R. et al. Structural differences determine the relative selectivity of nicotinic compounds for native α4β2*-, α6β2*-, α3β4*- and α7-nicotine acetylcholine receptors. Neuropharmacology 58, 1054–1066 (2010).

22. Wolfman, S. L. et al. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. Nature Communications 9, 2710 (2018).

23. Pennington, Z. T. et al. ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. Sci Rep 9, 19979 (2019).

24. Tapper, A. R. et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science 306, 1029–1032 (2004).

25. Ignatowska-Jankowska, B. M., Muldoon, P. P., Lichtman, A. H. & Damaj, M. I. The cannabinoid CB2 receptor is necessary for nicotine-conditioned place preference, but not other behavioral effects of nicotine in mice. Psychopharmacology 229, 591–601 (2013).

26. Tang, J. & Dani, J. A. Dopamine enables *in vivo* synaptic plasticity associated with the addictive drug nicotine. Neuron 63, 673–682 (2009).

27. Walters, C. L. et al. The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. Psychopharmacology 184, 339–344 (2006).

28. Grieder, T. E. et al. β2* nAChRs on VTA dopamine and GABA neurons separately mediate nicotine aversion and reward. Proc National Acad Sci 116, 25968–25973 (2019).

29. McGranahan, T. M., Patzlaff, N. E., Grady, S. R., Heinemann, S. F. & Booker, T. K. α4β2 nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief. J. Neurosci. 31, 10891–10902 (2011).

30. Tochitsky, I. et al. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nature Chemistry 4, 105–111 (2012).

31. Paoletti, P., Ellis-Davies, G. C. R. & Mourot, A. Optical control of neuronal ion channels and receptors. Nat Rev Neurosci 20, 514–532 (2019).

32. Morel, C. et al. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. Mol Psychiatry 19, 930–936 (2014).

33. Harrington, L. et al. Role of β4* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. Neuropsychopharmacology 41, 1790–1802 (2016).

34. Mondoloni, S., Cuttoli, R. D. & Mourot, A. Cell-Specific Neuropharmacology. Trends in Pharmacological Sciences 40, 696–710 (2019).

35. Szijj, P. A., Bahou, C. & Chudasama, V. Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates. Drug Discov Today Technologies 30, 27–34 (2018).

36. Knott, S. R. V. et al. A Computational Algorithm to Predict shRNA Potency. Mol Cell 56, 796–807 (2014).

37. Fornasiero, E. F. et al. Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. Nat Commun 9, 4230 (2018).

38. Quina, L. A. et al. Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. J. Comp. Neurol. 525, 2632–2656 (2017).

39. Lima, L. B. et al. 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 (2017).

40. Lammel, S. et al. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. Nature 491, 212–217 (2012).

41. Dautan, D. et al. Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. Nature Neuroscience 19, 1025–1033 (2016).

42. Ables, J. L. et al. Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular α5 nicotinic neurons regulates nicotine preference. Proceedings of the National Academy of Sciences (2017).

43. DeGroot, S. R. et al. Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. BPS 1–12 (2020) doi:10.1016/j.biopsych.2020.06.018.

## Figure legends

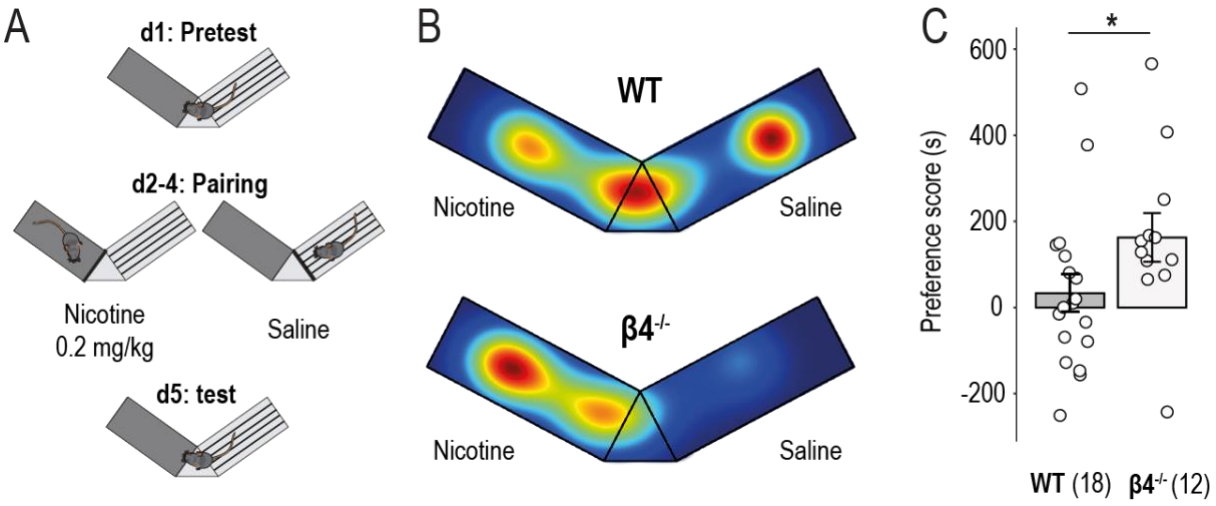



**Figure 1: Conditioned place preference (CPP) at low dose of nicotine in $\beta4^{-/-}$ mice. A.** Schematics of the unbiased CPP protocol. After a drug-free pretest day, 3 consecutive pairing days consisted of morning and afternoon nicotine (0.2 mg/kg) and saline conditioning sessions. Preference for the nicotine-paired chamber was measured on drug-free test day (d5). **B.** Representative heatmap of the positions of one WT and one $\beta4^{-/-}$ mouse on the test day (d5). **C.** Preference for the nicotine-paired chamber in both groups (Wilcoxon test, preference score for WT versus $\beta4^{-/-}$, *p = 0.019 ; One-sample Wilcoxon test (different from 0): WT, p = 0.7764, $\beta4^{-/-}$,*p = 0.016).

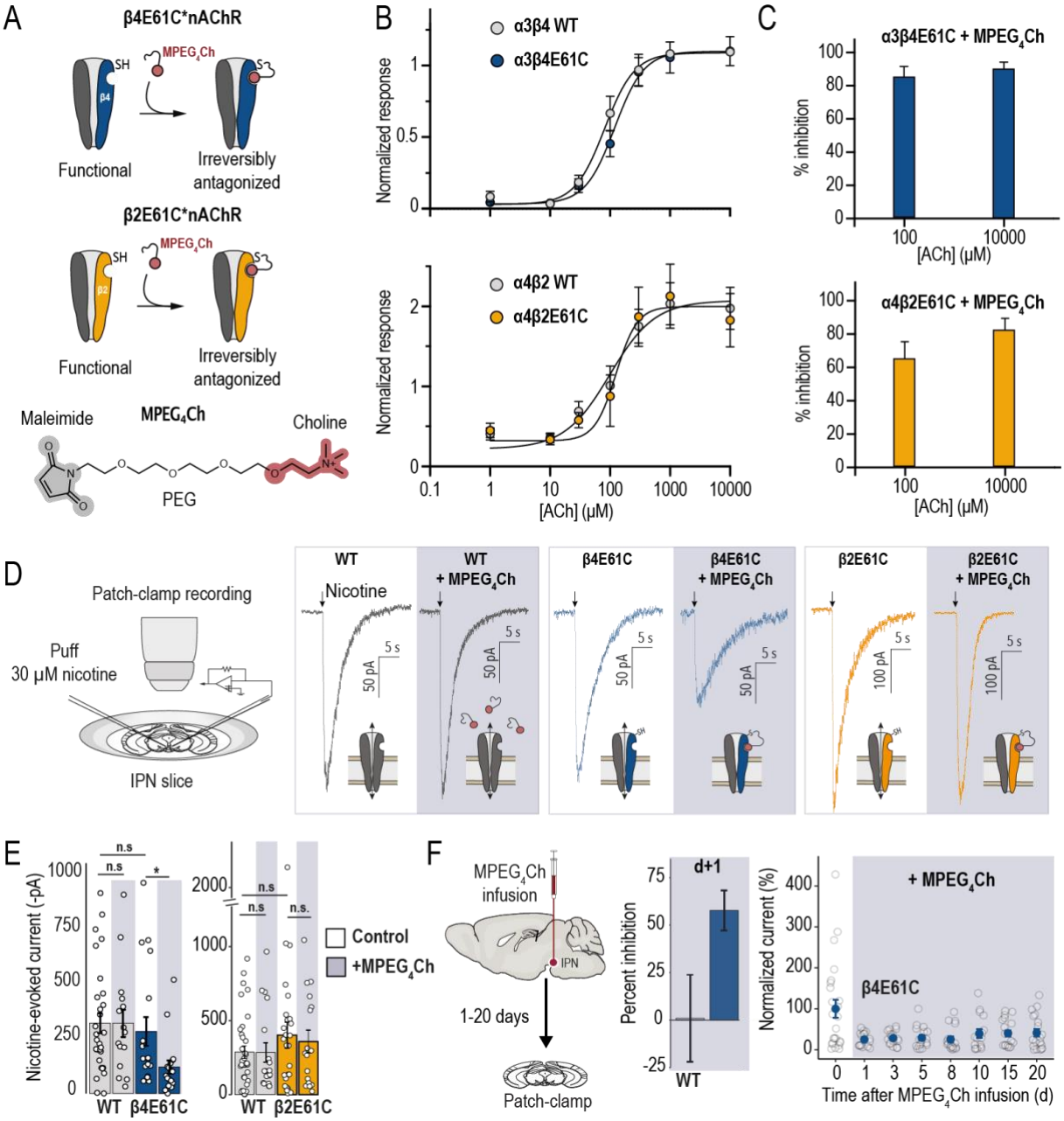



**Figure 2: Chemogenetic method for sustained nAChR antagonism. A.** Top, schematic showing nAChRs containing cysteine-substituted β2E61C and β4E61C subunits, with covalently tethered $MPEG_4Ch$. Bottom, chemical structure of $MPEG_4Ch$. **B.** Top, ACh-dose response curve for α3β4 ($EC_{50}$ = 81 μM, $n_H$ = 1.7) and α3β4E61C ($EC_{50}$ = 120 μM, $n_H$ = 1.7). Bottom, ACh-dose response curve for α4β2 ($EC_{50}$ = 99 μM, $n_H$ = 1.2) and α4β2E61C ($EC_{50}$ = 126 μM, $n_H$ = 2.4). **C.** Percent inhibition of ACh (100 μM and 10 mM)-induced current after $MPEG_4Ch$ treatment. **D.** Left, schematics of the patch-clamp recording with puff application of nicotine (30 μM) on IPN slices. Right, representative nicotine-induced current (30 μM puff) recorded in voltage-clamp mode (-60 mV) from IPN neurons of WT, β2E61C and β4E61C mice, from slices treated or not with $MPEG_4Ch$. **E.** Quantification of nicotine-induced current recorded in IPN

neurons as in D from WT, β2E61C and β4E61C slices treated or not with $MPEG_4Ch$. **F.** Left, local infusion of $MPEG_4Ch$ in the IPN of WT or β4E61C mice, 1 to 10 days before preparing the slices for patch-clamp experiments. Middle, percent inhibition of nicotinic current in IPN neurons of WT and β4E61C mice, 1 day after local infusion of $MPEG_4Ch$ in the IPN. Right, nicotine-induced current recorded in IPN neurons of WT and β4E61C mice, 1-20 days after local infusion.

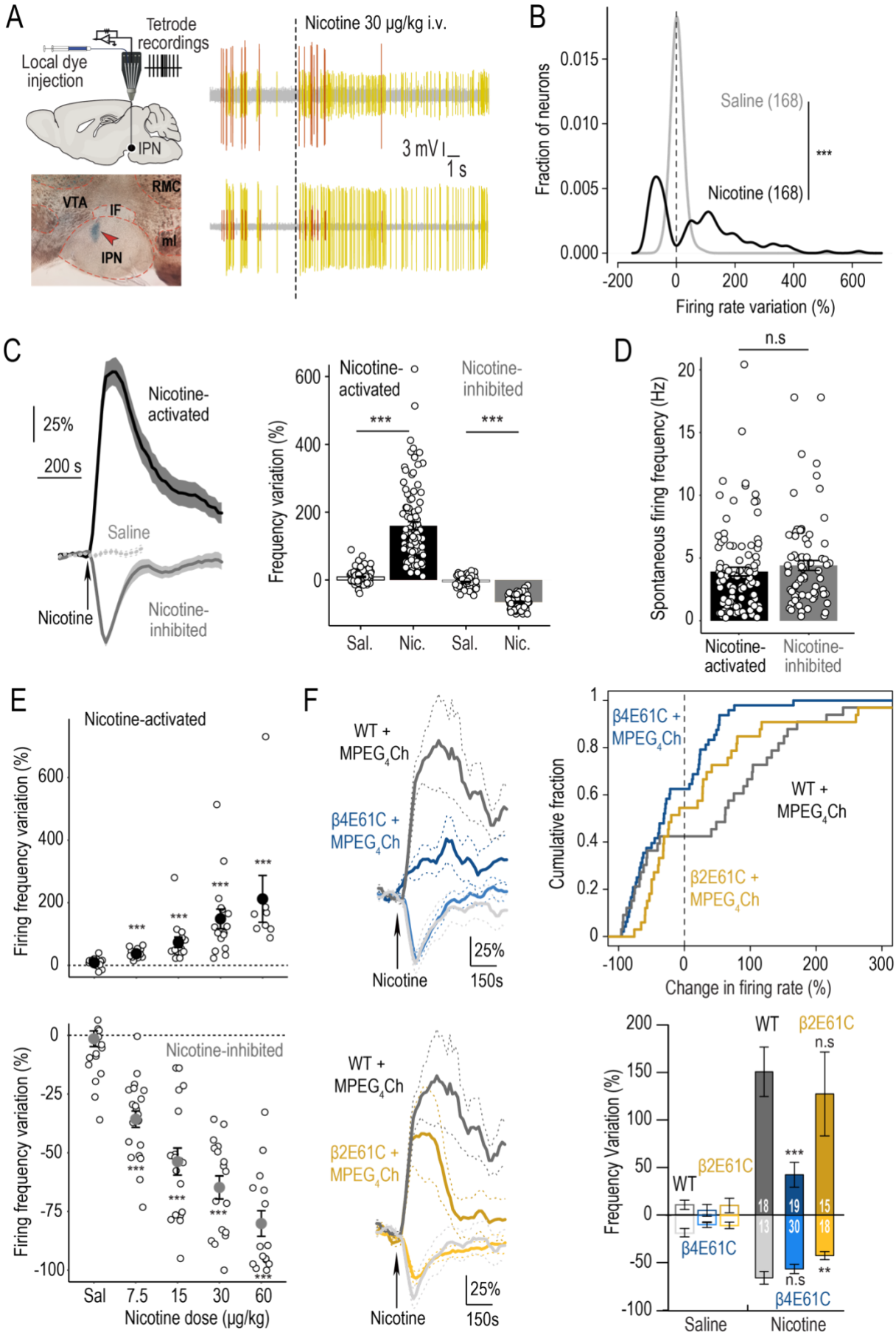

A
Tetrode recordings
Local dye injection
IPN
VTA
IF
RMC
ml
IPN
Nicotine 30 µg/kg i.v.
3 mV
1 s
B
Fraction of neurons
0.015
0.010
0.005
0.000
Saline (168)
Nicotine (168)
***
-200
0
200
400
600
Firing rate variation (%)
C
25%
200 s
Nicotine-activated
Saline
Nicotine
Nicotine-inhibited
Frequency variation (%)
600
400
200
0
Nicotine-activated
Nicotine-inhibited
***
***
Sal.
Nic.
Sal.
Nic.
D
n.s
Spontaneous firing frequency (Hz)
20
15
10
5
0
Nicotine-activated
Nicotine-inhibited
E
Nicotine-activated
Firing frequency variation (%)
600
400
200
0
***
Nicotine-inhibited
0
-25
-50
-75
-100
Sal
7.5
15
30
60
Nicotine dose (µg/kg)
F
WT + MPEG4Ch
β4E61C + MPEG4Ch
Nicotine
25%
150s
β2E61C + MPEG4Ch
Cumulative fraction
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-100
0
100
200
300
Change in firing rate (%)
Frequency Variation (%)
200
150
100
50
0
-50
-100
WT
β2E61C
β4E61C
18
13
19
30
15
18
***
n.s
**
n.s
Saline
Nicotine

**Figure 3: IPN neuron responses to nicotine intravenous injection. A.** Left, schematics of the microdrive multielectrode manipulator setup for tetrode recordings in the IPN. At the end of the recording, a blue dye is locally injected at the recording site coordinates. Right, action potentials recorded on two different channels at the time of nicotine injection. Two IPN neurons are recorded simultaneously on each channel, one that shows an increase in activity following nicotine injection (yellow trace) and one that shows a decrease in activity (orange trace). **B.** Density plot representing the distribution of the response to i.v. injections of nicotine (black, n = 168 neurons) or saline (light grey, n = 168 neurons), expressed as percentage of firing rate variation (Kolmogorov-Smirnov test, ***p < 0.001). **C.** Left, time-course of the response to nicotine (or saline) i.v. injections for nicotine-activated (black, n = 97 neurons) and -inhibited (grey, n = 71 neurons) IPN neurons. S.E.M is shown as shaded. Right, variation in firing frequency following i.v. injection of saline or nicotine, in nicotine-activated (black) and -inhibited (grey) neurons (Paired Wilcoxon tests: nicotine versus saline in both groups, ***p < 0.001). **D.** Spontaneous firing frequency before nicotine injections in nicotine-activated and -inhibited IPN neurons (Wilcoxon test, p = 0.12). **E.** Variation in firing frequency in nicotine-activated and -inhibited neurons, following i.v. injections of different doses of nicotine (7.5 - 60 μg/kg, Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: activated and inhibited neurons for all doses versus respective saline, ***p < 0.001). Neurons were classified as activated or inhibited based on their response at the 30 μg/kg dose (or alternatively 60 μg/kg for a few neurons not recorded at 30 μg/kg). **F.** Left, time-course of the response to nicotine injection (30 μg/kg) recorded in IPN neurons from WT (black), β4E61C (blue) and β2E61C (orange) mice infused with $MPEG_4Ch$ in the IPN. Top right, cumulative fraction of the percent change in firing rate in response to nicotine injection (30 μg/kg) recorded in IPN neurons from WT (black), β4E61C (blue) and β2E61C (orange) mice infused with $MPEG_4Ch$ in the IPN (Kolmogorov-Smirnov tests: β4E61C vs WT: activated neurons, ***p < 0.001 ; inhibited neurons, p = 0.45; β2E61C vs WT : activated neurons, p = 0.2 ; inhibited neurons, **p = 0.0017). Bottom right, quantification of the maximum amplitude of activation and inhibition following 30 μg/kg nicotine (or saline) i.v. injection, recorded in IPN neurons of WT (black), β4E61C (blue) and β2E61C (orange) mice treated with $MPEG_4Ch$ in the IPN (Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: β4E61C vs WT, activated neurons, ***p < 0.001, inhibited neurons, p = 0.18 ; β2E61C vs WT, activated neurons, p = 0.12, inhibited neurons, ***p < 0.001).

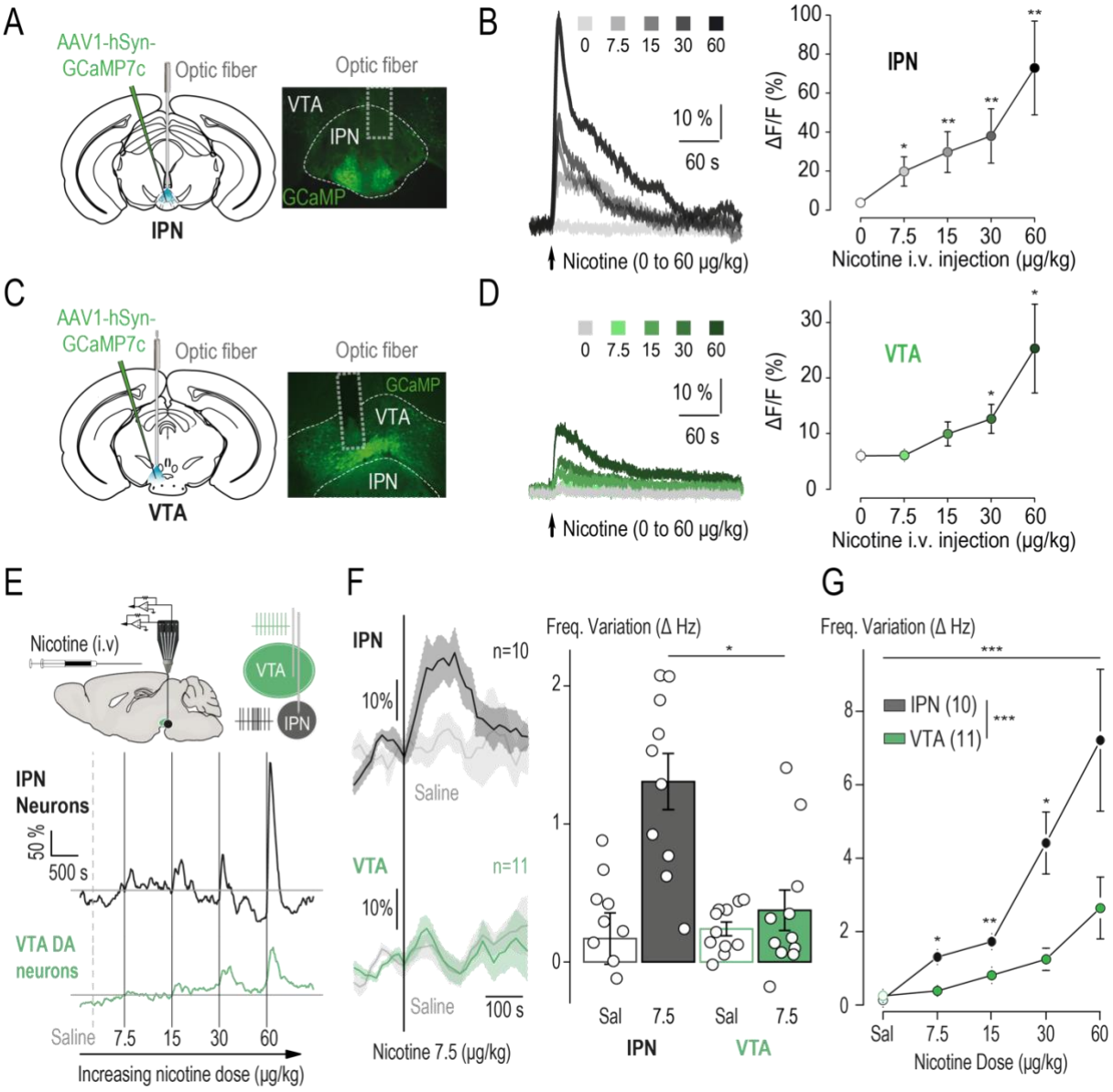



**Figure 4: Nicotine dose-response in VTA and IPN neurons. A.** Left, schematic of transduction of the IPN with AAV1-hSyn-GCaMP7c, followed by implantation of the optic fiber. Right, representative coronal brain slice with fiber tip and GCaMP7c expression. **B.** Left, time course of the average GCaMP response in the IPN following i.v. injection of nicotine at different doses (7.5 - 60 µg/kg). Right, dose response curve (Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: nicotine versus saline, 7.5 µg/kg: *p = 0.034, 15 µg/kg: **p = 0.0086, 30 µg/kg: **p = 0.0086, 60 µg/kg: **p = 0.0086). **C.** Left, schematic of transduction of the VTA with AAV1-hSyn-GCaMP7c, followed by implantation of the optic fiber. Right, representative coronal brain slice with fiber tip and GCaMP7c expression. **D.** Left, time course of the average GCaMP response in the VTA following i.v. injection of nicotine at different doses (7.5 - 60 µg/kg). Right, dose response

curve (Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: nicotine vs versus saline, 7.5 μg/kg : p = 1, 15 μg/kg : p = 0.89, 30 μg/kg : *p = 0.032, 60 μg/kg : *p = 0.032. **E.** Top, schematics of simultaneous tetrode recording in the IPN and the VTA. Bottom, representative change in firing frequency in IPN (black) and pDA (green) neurons following i.v. injection of nicotine at different doses (7.5 - 60 μg/kg). **F.** Left, time course of the response to i.v. injection of either 7.5 μg/kg nicotine or saline, in IPN (black) and pDA (green) neurons. Right, change in firing frequency was statistically significant compared to saline in IPN but not pDA neurons. The amplitude of the response in IPN neurons was different to that in pDA neurons (Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: nicotine versus saline, IPN **p = 0.002, VTA p = 1.0 ; nicotine IPN versus VTA, **p = 0.004). **G.** Nicotine dose response in pDA and IPN neurons (two-way repeated measures [RM] ANOVA: dose x structure interaction, $F[4, 90] = 6.164$, ***p < 0.001 ; main effect of dose, $F[4, 90] = 17.508$, ***p < 0.001 ; main effect of structure, $F[1, 90] = 27.118$, ***p < 0.001 ; post hoc Wilcoxon test with Bonferroni corrections: IPN versus VTA saline p = 1 ; nicotine : 7.5 μg/kg : *p = 0.039, 15 μg/kg : **p = 0.0076, 30 μg/kg : **p = 0.0019, 60 μg/kg : p = 0.27).

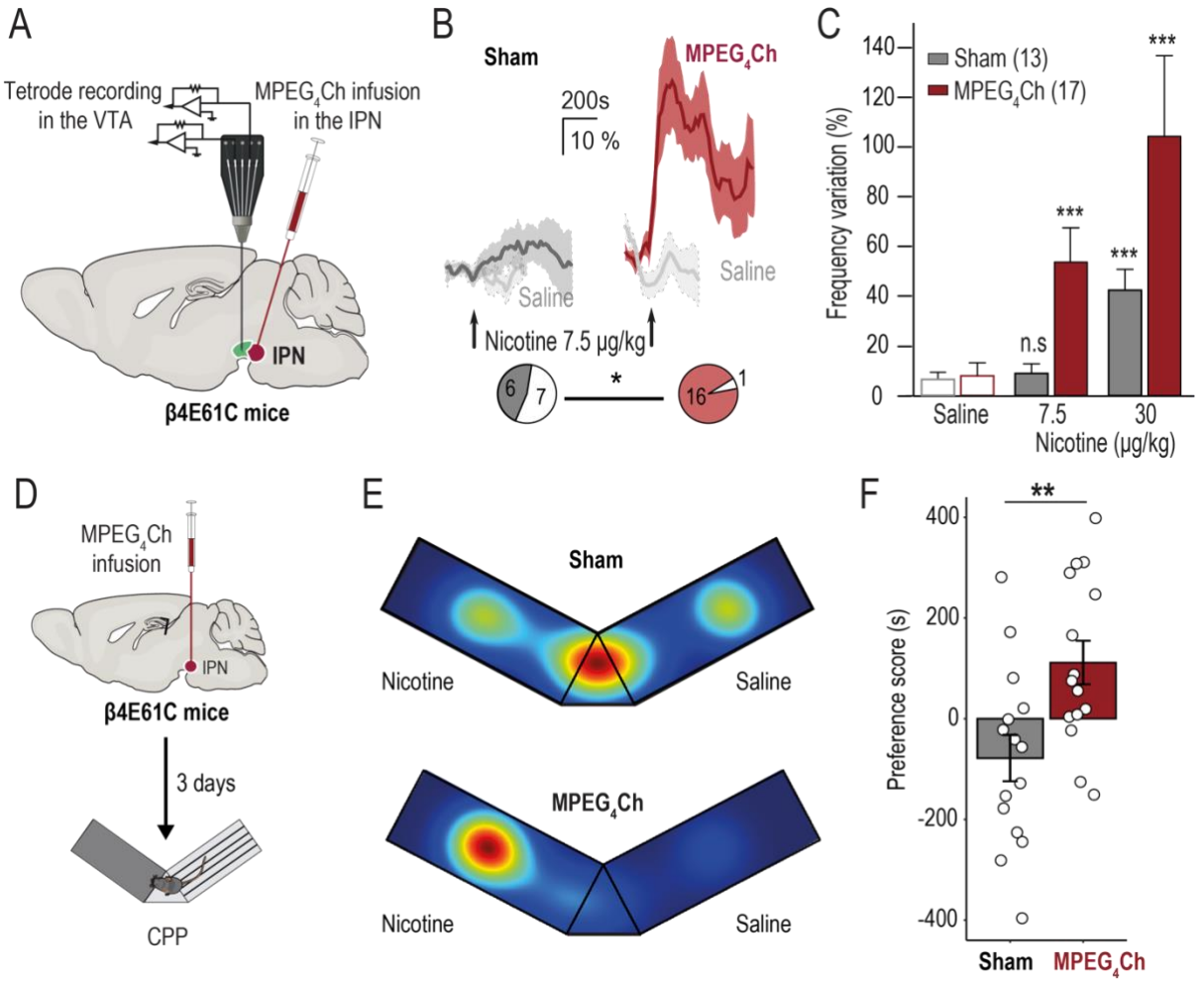



**Figure 5: The IPN dampens the effect of nicotine on the VTA and its rewarding properties. A.** Schematics of tetrode recording in the VTA following local infusion of MPG$_4$Ch in the IPN. **B.** Time course of the response to 7.5 µg/kg nicotine (or saline) i.v. injection in VTA neurons of β4E61C mice infused with either sham- (grey) or MPEG$_4$Ch (red) in the IPN. Only 6 out of the 13 pDA neurons responded to the 7.5 µg/kg nicotine injection in sham-treated mice, while almost all of the neurons (16/17) responded in MPEG$_4$Ch-treated mice (Pearson's Chi-square test, *p = 0.011). **C.** Average response to an i.v. injection of nicotine (7.5 and 30 µg/kg) or saline, recorded in pDA neurons of β4E61C mice infused with either sham- (grey) or MPEG$_4$Ch (red) in the IPN (two-way repeated measures [RM] ANOVA : main effect of dose, $F[2, 85] = 10.406$, ***p < 0.001 ; main effect of treatment, $F[1, 85] = 17.508$, **p = 0.00481 ; dose x treatment interaction, $F[2, 85] = 27.118$, p = 0.09785 ; post hoc Wilcoxon test with Bonferroni corrections: Sham nicotine versus saline, 7.5 µg/kg : p = 1, 30 µg/kg : ***p < 0.001 ; MPEG nicotine versus saline, ***p < 0.001 for both doses ; Sham vs MPEG : 7.5 µg/kg : *p = 0.012, 30 µg/kg : p = 0.5). **D.** Schematics representing the nicotine CPP protocol 3 days following the infusion of MPEG$_4$Ch in the IPN of β4E61C

mice. **E.** Representative heatmap of the positions of one sham-treated and one and one $MPEG_4Ch$-treated mouse. **F.** Preference for the nicotine-paired chamber in both groups (Student's t-test, **p = 0.005 ; One-sample t-test (different from 0): Sham, p = 0.1125, $MPEG_4Ch$, *p = 0.022).

## Supplementary figures

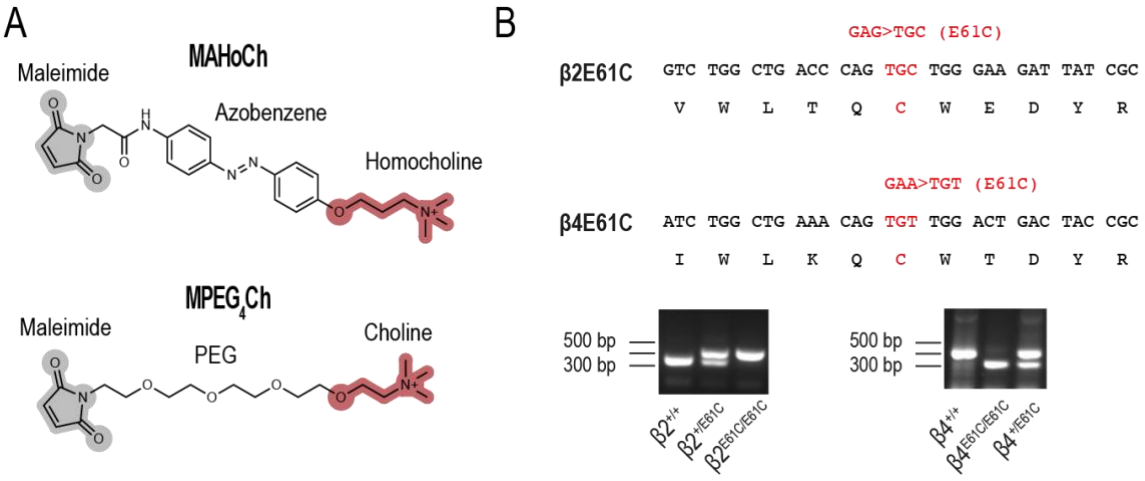



**Figure S1: New chemogenetic tools for nAChR control. A.** Chemical structures of the photoswitchable tethered ligand MAHoCh (top) and the suicide antagonist MPEG$_4$Ch (bottom). **B.** Top, mutation glutamate to cysteine in position 61 (E61C) in the gene coding the β2 and β4nAChr subunits. Bottom, PCR for genotyping the mutant mice.

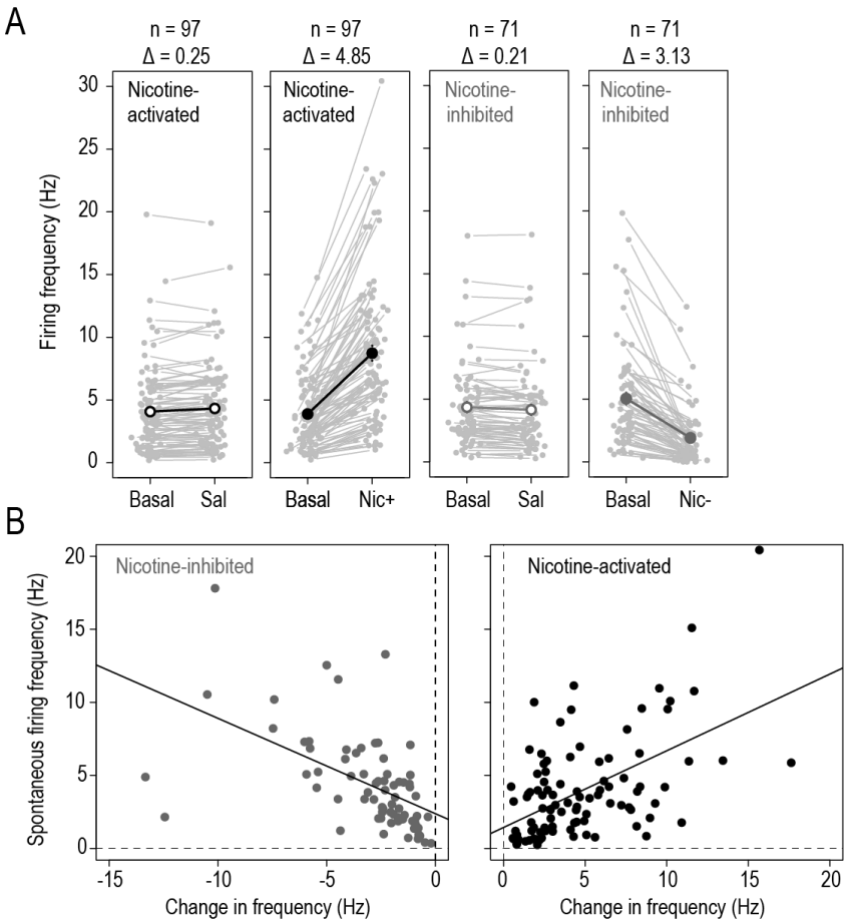



**Figure S2: Electrophysiological characterization of the response to nicotine injection in IPN neurons. A.** Basal, saline-evoked and nicotine-evoked change in firing frequency, for nicotine-activated (black) and -inhibited (grey) IPN neurons. **B.** Correlation between the basal spontaneous firing frequency and the change in firing frequency following an injection of nicotine, for nicotine-inhibited (grey) and -activated (black) neurons (Spearman correlation test: activated neurons, ***p < 0.001, rho = 0.49 ; inhibited neurons, ***p < 0.001, rho = -0.65).

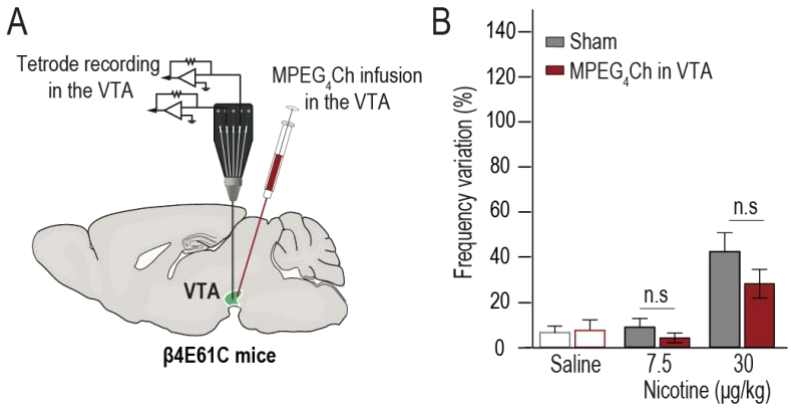



**Figure S3: $MPEG_4Ch$ has no effect when injected in the VTA. A.** Tetrode recording in the VTA of the β4E61C mouse, following infusion of $MPEG_4Ch$ in the VTA. **B.** Firing rate variation from baseline induced by nicotine or saline i.v. injection, recorded from VTA neurons of β4E61C mice infused with $MPEG_4Ch$ in the VTA. β4E61C mice infused with ACSF (Sham) in the IPN were used as a control (same as in Figure 5C, Wilcoxon tests with Bonferroni corrections: nicotine in Sham vs $MPEG_4Ch$ in VTA, 7.5 µg/kg : $p = 0.37$, 30 µg/kg : $p = 0.53$).

## Seconde publication scientifique

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

Sarah Mondoloni, Claire Nguyen, Éléonore Vicq, Joachim Jehl, Romain Durand-de Cuttoli, Nicolas Torquet, Stefania Tolu, Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Fabio Marti,
Philippe Faure* et Alexandre Mourot* (* co-derniers auteurs)

(En révision à **eLife**)

Lors de notre première étude, nous nous étions intéressés à l'effet aigu de la nicotine sur l'IPN chez un individu naïf et son implication dans la mise en place d'un renforcement à la drogue. La prise répétée de nicotine va amplifier ce renforcement et potentiellement conduire à une consommation compulsive caractéristique de l'addiction. L'objectif de ce second article a été de comprendre le rôle de l'IPN dans les comportements de consommation ainsi que les adaptations neurophysiologiques induites dans ce noyau par une exposition chronique à la nicotine. En utilisant un paradigme de choix à deux bouteilles chez des souris isogéniques, nous avons observé une forte variabilité dans les stratégies individuelles de consommation de nicotine. Certaines souris consomment tout au long de la tâche, alors qu'une autre partie développe une aversion à partir d'une dose seuil de nicotine, différente selon l'individu, et continue ensuite à éviter le biberon contenant la drogue peu importe la dose présentée. Des enregistrements *ex vivo* et *in vivo* ont révélé que ces profils de consommation sont corrélés à l'activité des neurones de l'IPN : une exposition chronique à la nicotine réduit la sensibilité de l'IPN à la drogue et la proportion de souris qui développe une aversion à la nicotine. Les souris knock-out pour la sous-unité nicotinique β4 voient également la sensibilité de l'IPN à la nicotine réduite et ne présentent pas de comportement d'évitement. La réexpression de la sous-unité β4 localement dans l'IPN restaure la réponse à la nicotine et rétablit des profils de consommation observés chez les souris de type sauvage. Nos résultats montrent que le niveau de sensibilité de l'IPN à la nicotine détermine le niveau d'aversion à la drogue : plus la transmission nicotinique est forte dans l'IPN, plus l'aversion sera importante.

Contribution technique : J'ai réalisé une partie des expériences de comportement, d'histologie et d'immunohistochimie.

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

Sarah Mondoloni[1], Claire Nguyen[1], Éléonore Vicq[1,2], Joachim Jehl[1,2], Romain Durand-de Cuttoli[1], Nicolas Torquet[1], Stefania Tolu[1], Stéphanie Pons[3], Uwe Maskos[3], Fabio Marti[1,2], Philippe Faure[1,2*] and Alexandre Mourot[1,2*]

1. Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France.
2. Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 75005 Paris, France.
3. Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Département de neuroscience, 75724 Paris cedex, France.

* equal contributions

## 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 a high heterogeneity in nicotine-drinking profiles in isogenic adult male mice, with about half of the mice persisting in consuming nicotine 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 β4-containing nicotinic acetylcholine receptors of IPN neurons as the molecular and cellular correlates of nicotine aversion. Collectively, our results identify the IPN as a substrate of individual variabilities and adaptations in nicotine consumption.

## 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 [1]. Nicotine administration induces a series of effects, ranging from pleasant (i.e. appetitive, rewarding, reinforcing, anxiolytic…) to noxious (i.e. anxiogenic, aversive…) [2,3]. 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 believed to be key in the regulation of nicotine intake and in the maintenance of addiction [2–4]. 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 [2]. There are nine nAChR α (α2-10) and three β (β2-4) subunits expressed in the brain, which can assemble to form homo-pentamers or hetero-pentamers with various localizations and functions [5,6]. Initiation of consumption and reinforcement to nicotine involve the mesolimbic dopamine reward circuit, which originates in the ventral tegmental area (VTA) [7]. Nicotine primarily acts on this circuit by activating α4β2 nAChRs, a receptor subtype that displays high affinity for the drug [7-10]. Interestingly, an acute injection of nicotine also inhibits a subset of VTA dopamine neurons that project to the amygdala [11], 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 [12-15]. This pathway is deeply implicated in the regulation of aversive physiological states such as fear and anxiety [16-18]. It is believed to directly mediate aversion to high doses of nicotine [12,13], to trigger the affective (anxiety) and somatic symptoms following nicotine withdrawal [19-22] and to be involved in relapse to nicotine-seeking [23]. Strikingly, neurons of the MHb-IPN axis express the highest density and largest diversity of nAChRs in the brain, notably the rare α5, α3 and β4 subunits [6]. These are encoded by the CHRNA5-A3-B4 gene cluster, of which some sequence variants are associated with a high risk of addiction in humans [24,25]. The α3 and β4 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 [12,14]. 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 [26-30]. About a third to half of those who have tried smoking tobacco become regular users [31]. 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 [14,32-35]. Yet, the neural mechanism that makes individuals more prone to maintain nicotine consumption versus 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.

## Materials and Methods

### Animals

Eight to sixteen-week old wild-type C57BL/6J (Janvier labs, France) and Acnb4 knock-out ($\beta4^{-/-}$) mice (Pasteur Institute, Paris) [58] were used for this study. $\beta4^{-/-}$ mice were backcrossed onto C57BL/6J background for more than twenty generations. Mice were maintained on a 12h 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 µg/ml) with changes in concentration occurring every 4 days. For the two-bottle aversion task, a single nicotine concentration (100 µg/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/d). To minimize stress from handling, mice were weighed every other day, since we found their weigh to be sufficiently stable over two 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/d) or saline (control) solution with a rate of 0.25 µl/h 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 (0.1mL, heparin 1000 U/mL, Sigma) into the left ventricle, and an intra-cardiac perfusion of ice-cold (0-4°C), oxygenated (95% $O_2$/5% $CO_2$) sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (SB-aCSF) was performed. The SB-aCSF solution contained (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 $NaH_2PO_4$, 5.9 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 25 sucrose, 2.5 glucose, 1 kynurenate (pH 7.2). After rapid brain sampling, slices (250 µm thick) were cut in SB-aCSF at 0-4°C using a Compresstome 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 $NaH_2PO_4$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 15 sucrose, 10 glucose (pH 7.2). After minimum 1h 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 MΩ) 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 µM in aCSF) was locally and briefly applied (200 ms puffs) using a puff pipette (glass pipette ~3 µm diameter at the tip) positioned about 20-30 µm 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 µg/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 µm 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 MΩ. 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 β4 subunit together with eGFP (or only eGFP for control experiments) under the control of the PGK promoter. Lentiviruses were produced as previously described [7]. For viral transduction, mice were anaesthetized with a gas mixture containing 1-3% isoflurane (IsoVet®, Pyramal Healthcare Ltd., Nothumberland, UK) and placed in a stereotactic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Unilateral injections (0.1µl/min) of 1µl of a viral solution (Lenti.pGK.β4.IRES.eGFP, titer 150 ng/µl of p24 protein; or Lenti.pGK.eGFP, titer 75 ng/µl of p24 protein) were performed using a cannula (diameter 36G, Phymep, Paris, France). The cannula was connected to a 10 µL 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 [10], 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 µm-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 hour. 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 ± 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.

## 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 wild-type (WT) C57Bl6 male 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 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). Consumption from each bottle was measured every minute. We found that the daily nicotine intake increased throughout the paradigm, to stabilize at about 10 mg/kg/day on average for the highest nicotine concentration tested (Figure 1C). Overall, the percent of nicotine consumption, i.e., the nicotine solution intake relative to the total fluid intake, was initially close to 50%, and decreased below that value for nicotine concentrations above 50 μg/ml (Figure 1D). These results match what was observed in previous studies using C57Bl6 male mice, notably the fact that these mice rarely show over 50% nicotine consumption, whether the water is supplemented with saccharine or not [36,37]. The decreased percent nicotine consumption observed at the population level in the course of the task suggests that mice adapt their behavior to reduce their number of visits to the nicotine-containing bottle. We indeed observed that mice rapidly (within a day) adjusted their nicotine intake when the concentration of nicotine increases (Figure 1-figure supplement 1A), resulting in titration of the nicotine dose, as previously reported [12,34].

We noticed some disparity between mice and decided to analyze more precisely nicotine consumption profiles for each individual. 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 entire 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), in contrast, 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 of looking at these distinct consumption profiles is to quantify the differences in intake between two consecutive days (positive differences indicate increased intake, while negative differences indicate decreased intake). The distinction between the two phenotypic groups appears clearly when we plot, for each mouse, the minimum and maximum values of the difference in intake between two consecutive days (Figure 1E, right). The group of avoiders was characterized either by a minimum difference in intake that was negative (mice that reduce their intake abruptly), or by both a minimum and a maximum difference in intake that were close to zero (very low intake throughout the task). In contrast, the non-avoider mice were characterized by a minimum difference in intake between two consecutive days that was always positive, indicating continual 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 [12,34]. 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 μg/ml, $p > 0.05$), but while nicotine intake increased throughout the task for non-avoiders (16.9 ± 2.9 mg/kg/day for 200 μg/ml of nicotine) it dropped down to 2.6 ± 0.4 mg/kg/day for such high nicotine concentration in avoiders (Figure 1F), and almost reached zero over the last three 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 of the naive mice actively avoided the quinine-containing solution, and showed a percent quinine consumption close to zero, as observed with nicotine for avoiders, but not for non-avoiders (Figure 1-figure supplement 1C). Together, these results suggest that avoiders display strong aversion to nicotine.

### The concentration of nicotine triggering aversion differs between 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 (whether positive or negative) of nicotine. We thus systematically analyzed the percent nicotine consumption throughout the task in individual mice, to examine their variability in choice patterns and behavioral alterations. We found that some non-avoiders actively tracked the side associated with nicotine when bottles were swapped (e.g. mouse #1 in Figure 2A), indicating strong preference for the bottle containing nicotine 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 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 take into account 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 top 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 μg/ml nicotine condition, this plot 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, i.e. their distance from the three apices was not really impacted by the modifications in nicotine concentration (Figure 2C and Figure 2-figure supplement 2A,B), whether they consumed nicotine actively 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 2A,B). Aversion to nicotine in avoider mice mainly occurred at the transition from 100 to 200 μg/ml, but some mice displayed aversion at concentrations as low as 10 μg/ml (Figures 1E, 2A and 2C). 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.

Do avoiders learn to keep away from the nicotine-containing solution, or do they just rapidly react to the 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, i.e. after the 200 μg/ml nicotine concentration, a condition with a low concentration of nicotine (50 μg/ml) for four days. We chose 50 μg/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 to 50 μg/ml transition, it would indicate a rapid adjustment to the concentration proposed, so to maintain their level of intake constant. In contrast, if avoiders maintained a steady, low percent nicotine consumption, it would indicate that nicotine aversion persists, independently of the dose. We indeed found that lowering nicotine concentration from 200 to 50 μg/ml did not increase percent nicotine consumption in avoiders (Figure 2D), at least for the four days mice were subjected to this concentration, suggesting aversion learning for nicotine, and a behavioral adaptation that leads to near complete cessation of nicotine consumption.

### Nicotine consumption negatively correlates with the amplitude of nicotine-evoked currents in the IPN

We then investigated the neural correlates of such aversion to nicotine. We hypothesized that the IPN, which is involved in nicotine aversion and in negative affective states [3,38,39], might be differently

activated 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 dorsal and rostral IPN because these neurons have high nAChR density [14,15,40,41]. 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 [42]. We found that the amplitude of nicotine-evoked currents was higher in IPN neurons of avoider mice than in non-avoiders (Figure 2E). Moreover, we found a negative correlation between the average amplitude of nicotine-evoked current in IPN neurons, and nicotine consumption (measured over the last 24 hours prior to the patch-clamp recording, Figure 2F), suggesting that nicotine consumption in mice is negatively linked to the amplitude of the response to nicotine 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 an intrinsic difference pre-exists 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). 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 3A). 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 our knowledge, no description of *in vivo* recordings of IPN neurons, and thus no criteria for identification, have been reported as yet, hence we solely considered neurons that were labelled *in vivo* with neurobiotin and confirmed to be within the IPN for the analysis. We found that nicotine i.v. injections in naive WT mice induced an increase in the firing rate of IPN neurons compared to an injection of saline, and that this acute effect of nicotine was reduced after the prolonged (4 weeks) passive exposure of mice to the drug (Figure 3B). Some of the IPN neurons, however, responded to nicotine by decreasing their firing rate, and the degree of inhibition was lower in the group exposed to chronic nicotine (Figure 3-figure supplement 3B). Together, these *ex vivo* and *in vivo* recordings demonstrate that prolonged exposure to nicotine markedly reduces nicotine-evoked responses in mouse IPN neurons.

To verify the hypothesis that a modification in the cholinergic activity of IPN neurons impacts nicotine aversion, we did a series of experiments. Firstly, 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 consisted

in a rapid presentation to a high concentration (100 µg/ml) of nicotine (Figure 3C). We chose this protocol to avoid the confounding effects of a gradual exposure to nicotine, and to evoke strong aversion in mice. We found that indeed, mice pretreated with saline (controls) showed low percent nicotine consumption (Figure 3C), which may indicate aversion to such high nicotine concentration. In contrast, mice pretreated with nicotine did not decrease on average their percent consumption when nicotine was introduced in the bottle, suggesting that they may have developed tolerance for the aversive effects of nicotine. When 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 four days (Figure 3-figure supplement 3C). Overall, this resulted in greater nicotine intake for the group treated with nicotine than for the group treated with saline (Figure 3C). When 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 great 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. Altogether, 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, resulting in increased consumption of the drug. Yet, chronic nicotine can produce adaptations in other brain circuits, and whether the neurophysiological changes observed in the IPN are causally related to the variations in aversion sensitivity remains to be demonstrated.

### Nicotine avoidance involves β4*nAChRs

We turned to mutant mice deleted for the gene encoding the nAChR β4 subunit ($\beta4^{-/-}$ mice), because of the strong and restricted expression of this subunit in the MHb-IPN pathway [32,43,44]. We found that $\beta4^{-/-}$ mice displayed both greater percent nicotine consumption and greater nicotine intake than WT animals, with minimal concentration-dependent change in percent nicotine consumption (Figure 4A). When looking at individuals, we observed both active and passive nicotine-drinking profiles in $\beta4^{-/-}$ mice, as already observed in WT mice. Strikingly however, none of the $\beta4^{-/-}$ 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 4A, p =0.04 Pearson's Chi squared with Yates' continuity correction). WT mice showed a strong nicotine concentration-dependent adaptation in their behavior, while $\beta4^{-/-}$ mice had a more consistent behavior throughout the task (Figure 4C and Figure 4-figure supplement 4B, C).

To verify that responses to nicotine were affected in IPN neurons of $\beta4^{-/-}$ mice, we 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 $\beta4^{-/-}$ than in WT mice (Figure 4D), confirming that β4*nAChRs are the major receptor subtype in the IPN. Furthermore, 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 β4*nAChRs. We then used *in vivo* juxtacellular recordings, to assess the role of β4*nAChRs in the response to nicotine in the intact brain. Nicotine i.v. injections (30 μg/kg) resulted in an increase in IPN neuron activity (Figure 4E), that was larger in WT mice than in $\beta4^{-/-}$ mice, further demonstrating the important role of β4*nAChRs in the response of the IPN to nicotine. In both WT and $\beta4^{-/-}$ mice, we observed a population of neurons that decreased their firing rate, yet with no difference in the amplitude of the response between the two genotypes (Figure 4-figure supplement 4D), suggesting that β4*nAChR are mainly involved in the increase, but not in the decrease, of neuronal activity in response to nicotine injection. Collectively, our results in $\beta4^{-/-}$ mice demonstrate the key role of the nAChR β4 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 β4*nAChRs of IPN neurons in nicotine aversion, and more generally in nicotine consumption, we targeted re-expression of β4 in the IPN specifically, using lentiviral vectors in $\beta4^{-/-}$ mice (KO-$\beta4^{IPN}$ 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 5A). 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 $\beta4^{-/-}$ mice decreased nicotine intake compared to the group of mice transduced with eGFP in the IPN (Figure 5C). Overall, nicotine intake was similar in WT and in KO-$\beta4^{IPN}$ 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-$\beta4^{IPN}$ mice (8/17, Figure 5D, $p = 0.04$ Chi squared). The behavior of KO-$GFP^{IPN}$ was steady throughout the task, whereas it was highly nicotine concentration-dependent for KO-$\beta4^{IPN}$ mice (Figure 5E and Figure 5-figure supplement 5B, 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 $\beta4^{-/-}$ mice rescued aversion for nicotine, and highlight the specific role of β4*nAChRs of IPN neurons 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. Oral self-

administration is a classical method for chronic nicotine administration as it provides rodents with ad libitum access to nicotine, while minimizing stress from handling [45]. We observed that, on average, WT mice titrate their intake to achieve a consistent nicotine dose, in agreement with previous reports [12,34,35], and discovered that mutant mice lacking the nAChR β4 subunit did not, resulting in greater nicotine intake, notably at high nicotine concentrations in the drinking solution. These behavioral results are in agreement with the greater intracranial self-administration observed at high nicotine doses in these mice [33] and, conversely, with the results obtained with transgenic TABAC mice overexpressing the β4 subunit at endogenous sites, which avoid nicotine and consequently consume very little [13,33]. Nevertheless, it should be noted that conflicting results have also been reported regarding the role of β4 nAChRs in nicotine consumption. Notably, intravenous self-administration of nicotine is lower in $\beta4^{-/-}$ mice despite a higher sensitivity of the VTA to nicotine in these mice [32], and self-administration is higher in TABAC mice despite reduced nicotine-induced activation of the VTA [46]. The increased consumption at high nicotine concentration reported here for $\beta4^{-/-}$ mice resembles what was observed in mutant mice either lacking the α5 subunit [12] or with low levels of the α3 subunit [47], likely because the α3, α5, and β4 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 that contribute to the control of nicotine intake.

In the two-bottle choice nicotine-drinking test, a percent nicotine consumption below 50% is usually interpreted as a sign of aversion to the drug [13,37]. However, it may rather indicate a process of regulation of nicotine consumption, through which mice adapt to an increase in nicotine concentration by reducing the volume of nicotine intake at each visit. At low nicotine concentrations, percent nicotine consumption never really exceeded 50% in average, as already seen in previous studies [37], yet very few mice readily avoided the nicotine-containing bottle, and many mice did track nicotine, which would rather indicate an actual appetite (as opposed to an aversion) for the drug in these mice. As nicotine concentration increases, the percent nicotine consumption dropped to about 20% on average at the end of the task (Figure 1D), yet it was associated with an increase in nicotine intake (in mg/kg/day, Figure 1C). Hence the nicotine preference score alone may not be sufficient to determine whether nicotine is aversive or not. We believe that, instead, aversion to the drug may be better defined by a constantly low consumption, or a sudden drop in nicotine intake, as seen here with the group of avoider mice (Figure 1E-G).

One important limitation of population-level analyses is that they greatly limit the ability to examine inter-individual differences in drug taking behaviors. It is indeed increasingly acknowledged that in mice, as in humans, there is a substantial variability in the susceptibility for developing drug use disorders [27–29,48–51]. Yet, it is still unclear why some individuals are more susceptible than others to become regular users. Here we inspected drinking profiles in individual isogenic mice, and discovered large 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 [3]. Avoiders displayed variable concentration thresholds required for triggering aversion, and some of them even

developed aversion at the beginning of the two-bottle choice task, when concentrations of nicotine were still low. Non-avoiders (WT and $\beta4^{-/-}$ mice) may retain an aversion threshold, but which would exceed the highest concentration tested here. Importantly, very few mice showed what could be considered as titration (plateaued consumption), emphasizing the needs to consider individual behavior, as opposed to group behavior, in addiction research.

We also discovered that the functional expression level of β4-containing nAChRs in the IPN underlies these different sensitivities to the aversive properties of nicotine. Indeed, inter-individual variability for nicotine aversion was nearly eliminated in $\beta4^{-/-}$ mice, none of which quit drinking nicotine, and was restored after selective re-expression of the β4 subunit in the IPN. This selective re-expression experiment discards the possibility that different sensitivities to the bitter taste of nicotine solutions explain the different drinking profiles of avoiders and non-avoiders. Strikingly, 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, which displayed large currents. The expression level of β4-containing nAChRs in the IPN may thus determine the level of aversion to the drug, and consequently its intake. We suggest that β4-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, thus impacting the balance between drug reward and aversion to limit drug consumption. In line with this, it was found that pharmacological or optogenetic stimulation of the MHb-IPN pathway could directly produce aversion [14,15,34], while pharmacological inactivation of this pathway increases nicotine intake [12]. From our results, we further suggest that the aversion produced by nicotine is not just an acute response to the dose that has just been ingested. Aversion can also be lasting for days, as evidenced by the fact that mice persist in avoiding the nicotine-containing bottle even after the concentration has been reduced to a dose they used to ingest. This echoes observations made in humans, in which the unpleasant initial responses to cigarettes is associated with a reduced likelihood of continued smoking [52]. Such a sustained aversive reaction to nicotine was conditioned, in mice, by nicotine itself, and required β4-containing nAChRs of the IPN for its onset, but most likely involves other brain circuits for its persistence in the long-term. 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 μg/ml), but cannot completely rule out pre-existing inter-individual differences that may 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 [53], 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 the expression level of β4-containing nAChRs in the IPN, 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 that may alter nicotine aversion and consumption. In the VTA, chronic nicotine upregulates

the number of β2-containing receptors at the cell surface [54,55]. We discovered that prolonged nicotine exposure had the opposite effect on β4-containing nAChRs of the IPN: it downregulated and/or desensitized these receptors, as evidenced by the decreased response to nicotine both *ex vivo* and *in vivo*. This effect seems to be specific to β4-containing nAChRs, since chronic nicotine had minimal consequence on the residual IPN nAChR current in $\beta4^{-/-}$ mice. These results may appear at odds with the recent report of increased nAChR currents in IPN slices of nicotine-treated mice [56]. However, differences in the effective agonist concentrations used in the two studies (30 μM of nicotine with local puff here, vs. 50 μM of caged-nicotine, but effective concentration probably much lower after photo-uncaging in [56]) may explain this discrepancy. Indeed, by using a lower effective agonist concentration, Arvin et al. [56] were possibly not recruiting the low-affinity β4-containing receptors, which are the receptor subtypes we found to be downregulated by chronic nicotine exposure (Figure 4D). Whatever the reason behind these opposite results is, our behavioral data in nicotine-treated WT and $\beta4^{-/-}$ mice completely match: 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, to supposedly attenuate the negative emotional reactions elicited by nicotine withdrawal [57]. However, our data indicate that mice under prolonged nicotine administration will also develop tolerance to the aversive effects of nicotine, highlighting the necessity to develop alternative medical approaches.

## Author contributions

Conceptualization: SM, PF and AM.
Methodology: SM, PF and AM.
Software: NT and SM.
Validation: SM, PF and AM.
Formal analysis: SM and FM.
Investigation: SM, CN, EV, JJ, RDC, ST and FM.
Resources: SP and UM.
Writing - original draft: AM.
Writing - review and editing: SM, PF and AM.
Visualization: SM.
Supervision: PF and AM.
Funding acquisition: PF and AM.

## Acknowledgments

The authors would like to 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 facility at Institut de Biology Paris Seine (IBPS, Paris, France).

## Funding

Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE16-0012 CHOLHAB to AM)
Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU201903007961 to PF)
Institut National du Cancer Grant TABAC-16-022 and TABAC-19-02 (to PF).
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).

## Declaration of interests

The authors declare no competing interest.

## References

1. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025 third edition. 1–121 (2019).
2. Wills, L. et al. Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. Pharmacological Reviews 74, 271–310 (2022).
3. Fowler, C. D. & Kenny, P. J. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. Neuropharmacology 76 Pt B, 533–544 (2014).
4. Verendeev, A. & Riley, A. L. The role of the aversive effects of drugs in self-administration. Behavioural Pharmacology 24, 363–374 (2013).
5. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. & Changeux, J.-P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat Rev Drug Discov 8, 733–750 (2009).
6. Zoli, M., Pistillo, F. & Gotti, C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. Neuropharmacology 96, 302–311 (2015).
7. Maskos, U. et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature 436, 103–107 (2005).
8. Tapper, A. R. et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science 306, 1029–1032 (2004).
9. Tolu, S. et al. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. Mol Psychiatry 18, 382–393 (2013).
10. Durand-de Cuttoli, R. et al. Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. eLife 7, e37487 (2018).
11. Nguyen, C. et al. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. Neuron 109, 2604–2615.e9 (2021).
12. Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J. & Kenny, P. J. Habenular α5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. Nature 471, 597–601 (2011).
13. Frahm, S. et al. Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of beta4 and alpha5 Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. Neuron 70, 522–535 (2011).

14. Wolfman, S. L. et al. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. Nature Communications 9, 2710 (2018).
15. Morton, G. et al. Chrna5-Expressing Neurons in the Interpeduncular Nucleus Mediate Aversion Primed by Prior Stimulation or Nicotine Exposure. J. Neurosci. 38, 6900–6920 (2018).
16. Otsu, Y. et al. Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. Science 366, 250–254 (2019).
17. Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T. & Nakanishi, S. Distinct Roles of Segregated Transmissionof the Septo-Habenular Pathway in Anxiety and Fear. Neuron 78, 537–544 (2013).
18. Zhang J., et al. Presynaptic Excitation via GABAB Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. Cell 166, 716–728 (2016).
19. Salas, R., Sturm, R., Boulter, J. & De Biasi, M. Nicotinic Receptors in the Habenulo-Interpeduncular System Are Necessary for Nicotine Withdrawal in Mice. J. Neurosci. 29, 3014–3018 (2009).
20. Zhao-Shea, R. et al. Increased CRF signalling in a ventral tegmentalarea-interpeduncular nucleus-medial habenulacircuit induces anxiety during nicotine withdrawal. Nature Communications 6, 1–13 (2015).
21. Pang, X. et al. Habenula cholinergic neurons regulate anxiety during nicotine withdrawal via nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology 107, 294–304 (2016).
22. Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P. D. & Tapper, A. R. Activation of GABAergic Neuronsin the Interpeduncular Nucleus Triggers Physical Nicotine Withdrawal Symptoms. Current Biology 23, 2327–2335 (2013).
23. Forget, B. et al. A Human Polymorphism in CHRNA5 Is Linked to Relapse to Nicotine Seeking in Transgenic Rats. Curr. Biol. 28, 3244–3253.e7 (2018).
24. Bierut, L. J. et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. Am J Psychiatry 165, 1163–1171 (2008).
25. Lassi, G. et al. The CHRNA5–A3–B4 GeneCluster and Smoking: FromDiscovery to Therapeutics. Trends in Neurosciences 39, 851–861 (2016).
26. George, O. & Koob, G. F. Individual differences in the neuropsychopathology of addiction. Dialogues Clin Neurosci 19, 217–229 (2017).
27. Deroche-Gamonet, V., Belin, D. & Piazza, P. V. Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science 305, 1014–1017 (2004).
28. Siciliano, C. A. et al. A cortical-brainstem circuit predicts and governs compulsive alcohol drinking. Science 366, 1008–1012 (2019).
29. Juarez, B. et al. Midbrain circuit regulation of individual alcohol drinking behaviors in mice. Nature Communications 8, 2220 (2017).
30. Pascoli, V. et al. Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. Nature 564, 1–22 (2018).
31. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US)Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. (2010).

32. Harrington, L. et al. Role of β4* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. Neuropsychopharmacology 41, 1790–1802 (2016).
33. Husson, M. et al. β4-Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. J. Neurosci. 40, 3465–3477 (2020).
34. Tuesta, L. M. et al. GLP-1 acts on habenular avoidance circuits to control nicotine intake. Nature Neuroscience 20, 708–716 (2017).
35. Antolin-Fontes, B. et al. The habenular G-protein-coupled receptor 151 regulates synaptic plasticity and nicotine intake. Proceedings of the National Academy of Sciences 117, 5502–5509 (2020).
36. Bagdas, D. et al. Assessing nicotine dependence using an oral nicotine free-choice paradigm in mice. NP 157, 107669 (2019).
37. Matta, S. G. et al. Guidelines on nicotine dose selection for *in vivo* research. Psychopharmacology 190, 269–319 (2006).
38. Molas, S., DeGroot, S. R., Zhao-Shea, R. & Tapper, A. R. Anxiety and Nicotine Dependence: Emerging Role of the Habenulo-Interpeduncular Axis. Trends in Pharmacological Sciences 38, 169–180 (2017).
39. McLaughlin, I., Dani, J. A. & De Biasi, M. The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. J Neurochem 142, 130–143 (2017).
40. Hsu, Y.-W. A. et al. Medial habenula output circuit mediated by α5 nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. J. Neurosci. 33, 18022–18035 (2013).
41. Quina, L. A., Harris, J., Zeng, H. & Turner, E. E. Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway. J. Comp. Neurol. 525, 2632–2656 (2017).
42. Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W. & Lester, R. A. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. J. Neurosci. 17, 5747–5759 (1997).
43. Shih, P.-Y. et al. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. J. Neurosci. 34, 9789–9802 (2014).
44. Grady, S. R. et al. Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release. J. Neurosci. 29, 2272–2282 (2009).
45. Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T. & Kanit, L. Oral Nicotine Self-Administration in Rodents. J Addict Res Ther S2, (2012).
46. Gallego, X. et al. 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 (2011).
47. Elayouby, K. S. et al. α3* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenula-Interpeduncular Nucleus Circuit Regulate Nicotine Intake. J. Neurosci. 41, 1779–1787 (2021).
48. Nesil, T., Kanit, L., Collins, A. C. & Pogun, S. Individual differences in oral nicotine intake in rats. NP 61, 189–201 (2011).

49. Garcia-Rivas, V., Cannella, N. & Deroche-Gamonet, V. Individual Variations in the Mechanisms of Nicotine Seeking: A Key for Research on Nicotine Dependence. Neuropsychopharmacology 42, 584–586 (2017).
50. Piazza, P. V., Deminière, J. M., Le Moal, M. & Simon, H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. Science 245, 1511–1513 (1989).
51. Dongelmans, M. et al. Chronic nicotine increases midbrain dopamine neuron activity and biases individual strategies towards reduced exploration in mice. Nature Communications 12, 6945 (2021).
52. DiFranza, J. R. et al. Recollections and repercussions of the first inhaled cigarette. Addictive Behaviors 29, 261–272 (2004).
53. Torquet, N. et al. Social interactions impact on the dopaminergic system and drive individuality. Nature Communications 9, 3081 (2018).
54. Sallette, J. et al. Nicotine Upregulates Its Own Receptors through Enhanced Intracellular Maturation. Neuron 46, 595–607 (2005).
55. Lester, H. A. et al. Nicotine is a Selective Pharmacological Chaperone of Acetylcholine Receptor Number and Stoichiometry. Implications for Drug Discovery. AAPS J 11, 167–177 (2009).
56. Arvin, M. C. et al. Chronic Nicotine Exposure Alters the Neurophysiology of Habenulo-Interpeduncular Circuitry. J. Neurosci. 39, 4268–4281 (2019).
57. Hartmann-Boyce, J., Chepkin, S. C., Ye, W., Bullen, C. & Lancaster, T. Nicotine replacement therapy versus control for smoking cessation. Cochrane Database of Systematic Reviews 1, 7–196 (2018).
58. Xu, W. et al. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J. Neurosci. 19, 9298–9305 (1999).

## Figure Legends

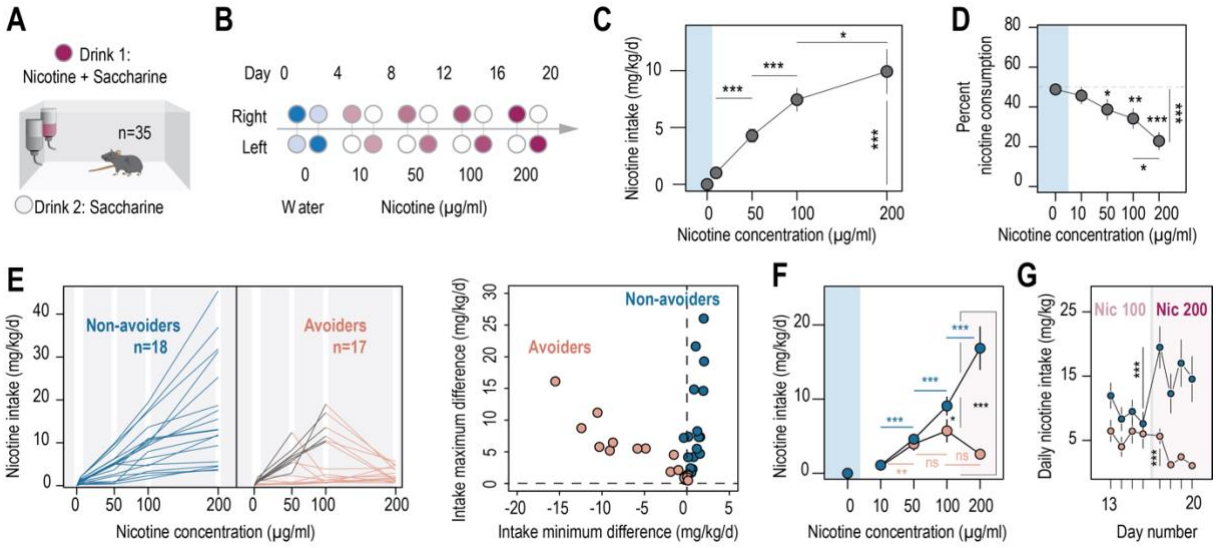



**Figure 1: Two different profiles, avoiders and non-avoiders, emerged in WT mice subjected to a two-bottle choice nicotine-drinking test. A.** Continuous access, two-bottle choice setup. **B.** Two-bottle choice paradigm. Each dot represents a bottle and is color-coded according to whether it contains 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 four days, and the bottles were swapped every other day. **C.** Nicotine intake (mg/kg/d), averaged over four 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 four 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 two consecutive days, for each individual. **F.** Nicotine intake in avoiders and non-avoiders for each nicotine concentration, averaged over four 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 17 for avoiders. In all figure panels avoiders are depicted in pinkish-orange while non-avoiders are in blue. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

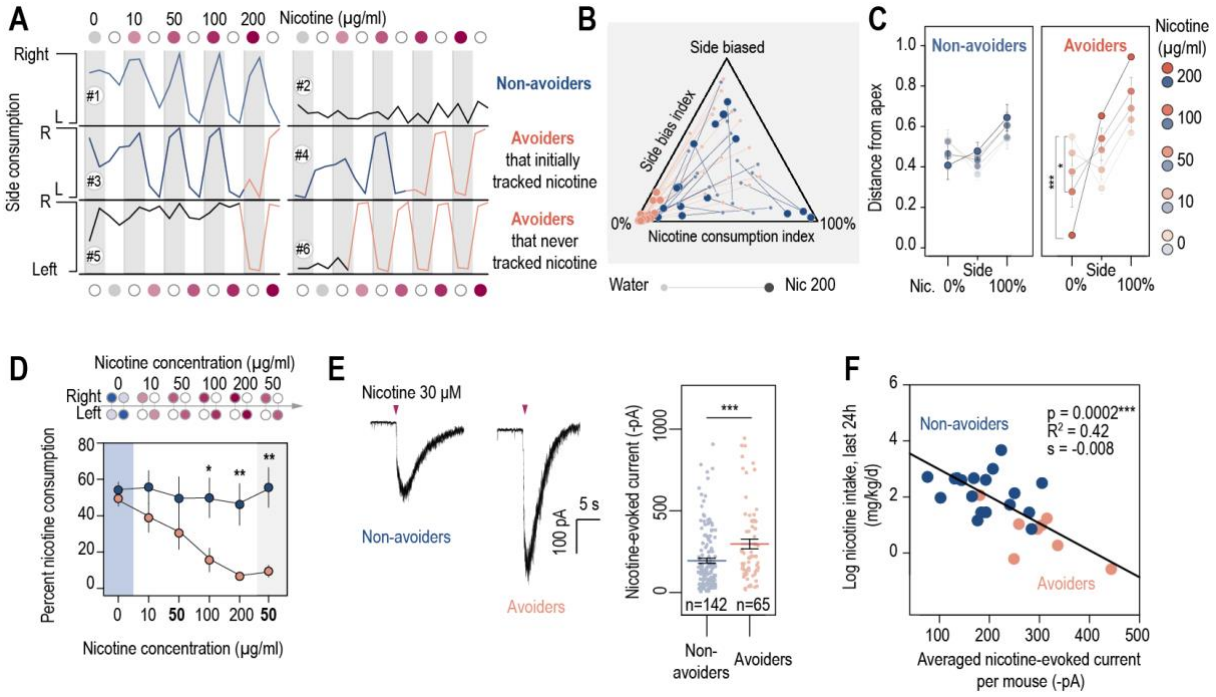



**Figure 2: Nicotine intake was negatively correlated with the amplitude of the response to nicotine in IPN neurons. A.** Representative examples of choice behaviors (% consumption on the right vs. left bottle) in WT mice when the right-hand side bottle contains either nicotine + saccharine (red dots, 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 µg/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 µg/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 and non-avoider mice for each concentration of nicotine. The 50 µg/ml nicotine solution was presented a second time to the mice, at the end of the session, for four days. (Mann-Whitney test, Holm-Bonferroni correction, p(50 Nic) = 0.04, p(100 Nic) = 0.005, p(200 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 = 142 neurons from 18 mice,

I = -194 ± 15 pA) and avoiders (red, n = 65 neurons from 8 mice, I = -297 ± 30 pA) following a puff application of nicotine (30 µM, 200 ms). Avoiders presented greater nicotine-evoked currents than non-avoiders (Mann-Whitney test, p = 1.4e-11). **F.** Correlation between the dose consumed (log scale, over the last 24 hours prior to the recording) and the averaged nicotine evoked-current per mouse (-pA). In all figure panels avoiders are depicted in pinkish-orange and non-avoiders in blue. *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05.

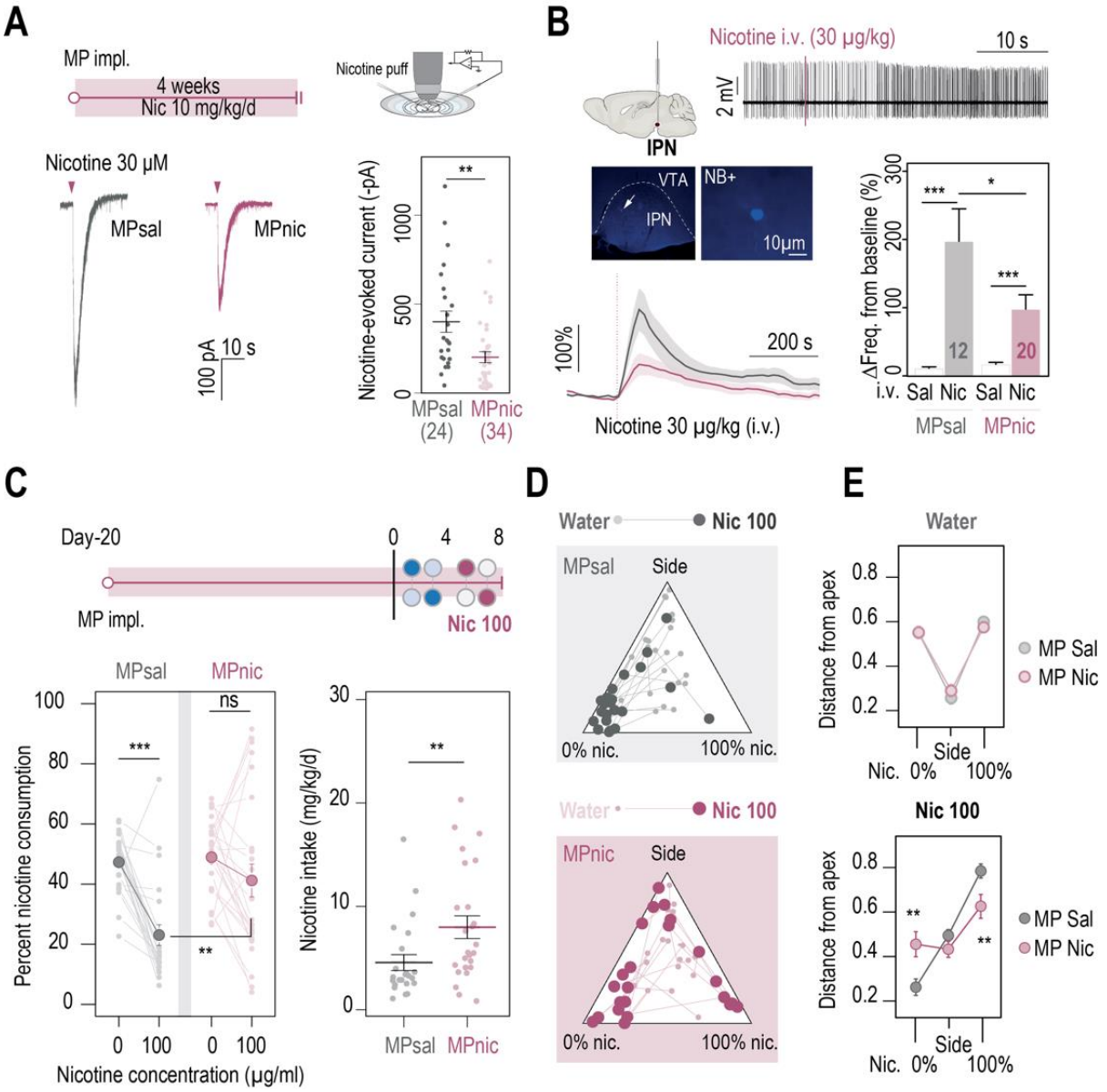



**Figure 3: Chronic nicotine treatment altered both nAChR expression levels in the IPN and nicotine intake in WT mice. A.** Top, passive nicotine treatment protocol. Mice were implanted subcutaneously with an osmotic minipump (MP) that continuously delivers 10 mg/kg/d of nicotine. After 4 weeks of treatment, 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 µM, 200 ms) in IPN neurons of mice treated with either saline (n = 24 neurons from 3 mice, I = -401 ± 59 pA) or nicotine (n = 34 neurons from 4 mice, I = -202 ± 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 µg/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 µg/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 = 6) or nicotine-treated (n = 13) animals. 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/d of nicotine continuously, for 20 days before performing the modified two-bottle choice task. After four days of water vs. water habituation, mice were directly exposed to a high concentration of nicotine (100 µg/ml). Bottom, percent nicotine consumption and nicotine intake at 0 and 100 µg/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 ± 2.0% to 23.0 ± 3.4%, p = 1.7e-05, Mann-Whitney paired test), but not the nicotine-treated group (n = 25, from 48.9 ± 2.4 to 41.2 ± 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 µg/ml of nicotine in one bottle. **E.** Average distance from each apex in the water vs. water (top) and water vs. nicotine 100 µg/ml conditions (bottom). Saline-treated, but not nicotine-treated mice developed a strategy to avoid nicotine ($p_{Sacc}$ = 0.013, $p_{Side}$ = 0.27 $p_{Nic}$ = 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.

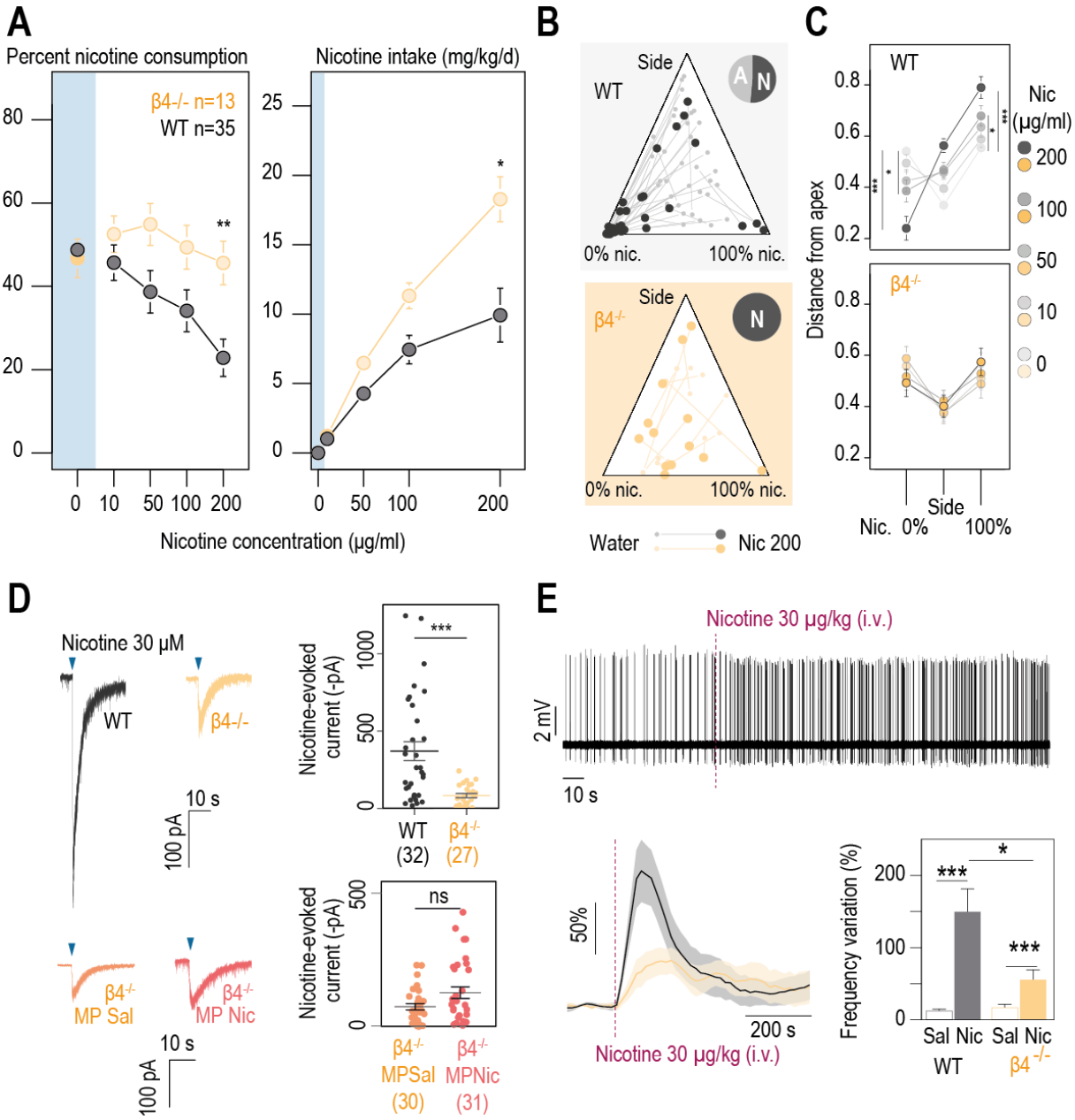



**Figure 4: β4-containing nicotinic receptors are essential for triggering nicotine aversion in mice. A.** Left, average percent nicotine consumption in WT and $\beta4^{-/-}$ mice for each concentration of nicotine in the two-bottle choice task. WT mice had lower percent nicotine consumption than $\beta4^{-/-}$ 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 $\beta4^{-/-}$ mice displayed a stable percent nicotine consumption (Friedman test, n = 13, df = 4, p = 0.11). Right, average nicotine intake (mg/kg/d) in $\beta4^{-/-}$ 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). $\beta4^{-/-}$ mice consumed more nicotine than WT mice (Mann-Whitney test). **B.** Ternary diagram representing each WT and $\beta4^{-/-}$ 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 of the task. Note the absence of avoiders in $\beta4^{-/-}$ 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, 200 ms) in IPN neurons from naive WT and $\beta4^{-/-}$ mice, or from saline-treated (orange) and nicotine-treated (dark orange) $\beta4^{-/-}$ mice. Right, average nicotine-evoked currents recorded in IPN neurons from naïve WT (n = 32 neurons from 5 mice, I = -370 ± 61 pA) and $\beta4^{-/-}$ (n = 27 neurons from 4 mice, I = -83 ± 13 pA) mice, and from $\beta4^{-/-}$ 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). $\beta4^{-/-}$ 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 $\beta4^{-/-}$ mice (Mann-Whitney test, p = 0.15). **E.** Juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in IPN neurons in naive WT and $\beta4^{-/-}$ mice. Top, representative recording in $\beta4^{-/-}$ mice. Bottom left, average nicotine-evoked responses at 30 µg/kg of nicotine in IPN neurons from WT and $\beta4^{-/-}$ mice. Bottom right, average amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline and nicotine (30µg/kg), for IPN neurons from WT (n = 18) and $\beta4^{-/-}$ (n = 7) mice. Nicotine-induced responses were smaller in $\beta4^{-/-}$ than in WT mice ($p < 0.001$, 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 $\beta4^{-/-}$ mice in yellow. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

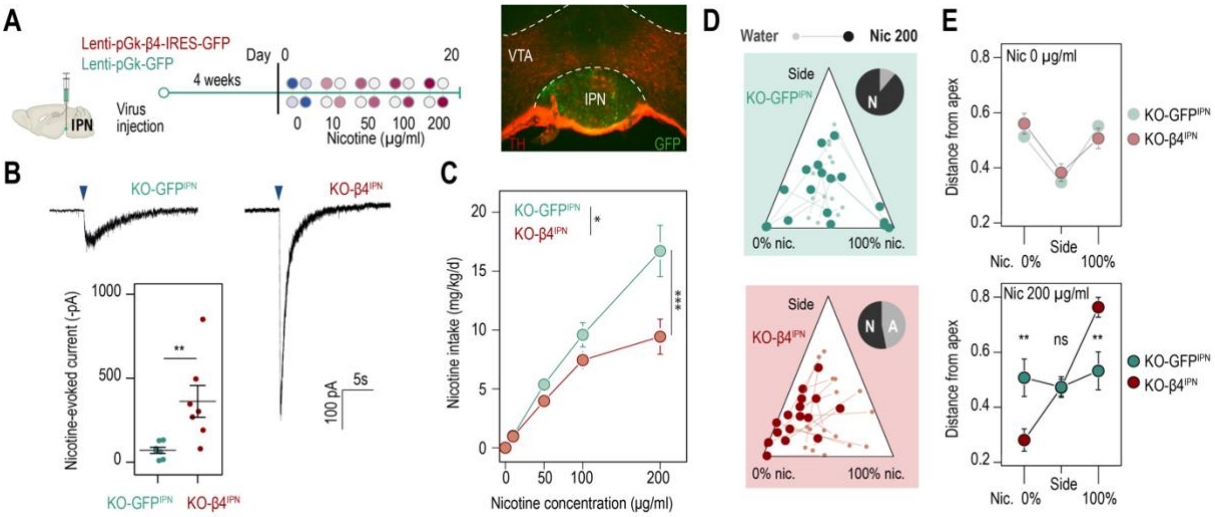



**Figure 5: β4-containing nAChRs of the IPN are involved in the control of nicotine consumption and in aversion to nicotine in mice. A.** Protocol: stereotaxic transduction of the β4 subunit together with GFP (or GFP alone in control mice) in the IPN of $\beta4^{-/-}$ mice, and subsequent two-bottle choice task. Right: coronal section highlighting proper viral transduction of lenti-pGK-β4-IRES-GFP in the IPN. **B.** Validation of the re-expression using whole-cell patch-clamp recordings. Representative currents and average responses following a puff application of nicotine (30 µM, 200 ms) on IPN neurons from $\beta4^{-/-}$ mice transduced in the IPN with either lenti-pGK-β4-IRES-GFP (KO-$\beta4^{IPN}$, 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.** Average nicotine intake was lower in KO-$\beta4^{IPN}$ than in KO-$GFP^{IPN}$ (two-way repeated measure; ANOVA: genotype x 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). **D.** Ternary diagram representing each $\beta4^{-/-}$ mouse, transduced with either β4 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 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 condition at the end of the task. **E.** Average distance from each apex during the two-bottle choice task at 0 and 200 µg/ml of nicotine, for KO-$\beta4^{IPN}$ and KO-$GFP^{IPN}$ mice ($p_{Sacc}$ = 0.007, $p_{Nic}$ = 0.008, Mann-Whitney test with Holm-Bonferroni correction). In all figure panels KO-$\beta4^{IPN}$ mice are depicted in red and KO-$GFP^{IPN}$ mice (controls) in green. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

## Supplementary material

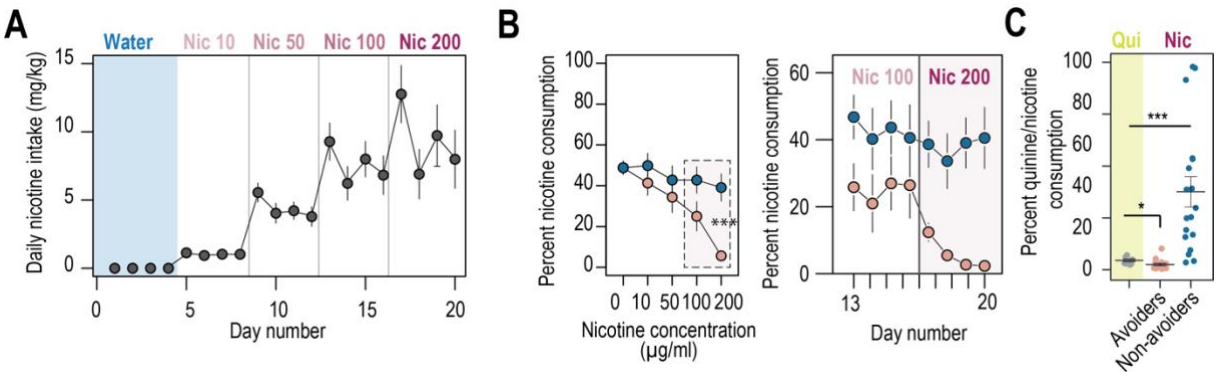



**Figure 1-figure supplement 1: Nicotine intake and consumption profiles in avoiders and non-avoiders.** **A.** Nicotine intake measured every day (mg/kg/d) for WT mice in the two-bottle choice task (n = 35). **B.** Percent nicotine consumption for avoider and non-avoider mice for each concentration of nicotine, averaged over four days for the entire session (left) or depicted each day for the last 8 days (right). **C.** Percent quinine consumption in WT animals (n = 8 mice, 4.3 +/- 0.6 %), compared to percent nicotine consumption in avoiders (n = 17 mice, 2.3 +/- 0.59 %, Mann-Whitney p-value= 0.033) and non-avoiders (n = 18 mice, 41.6 +/- 8.9 %, Mann-Whitney p-value= 0.0003). *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

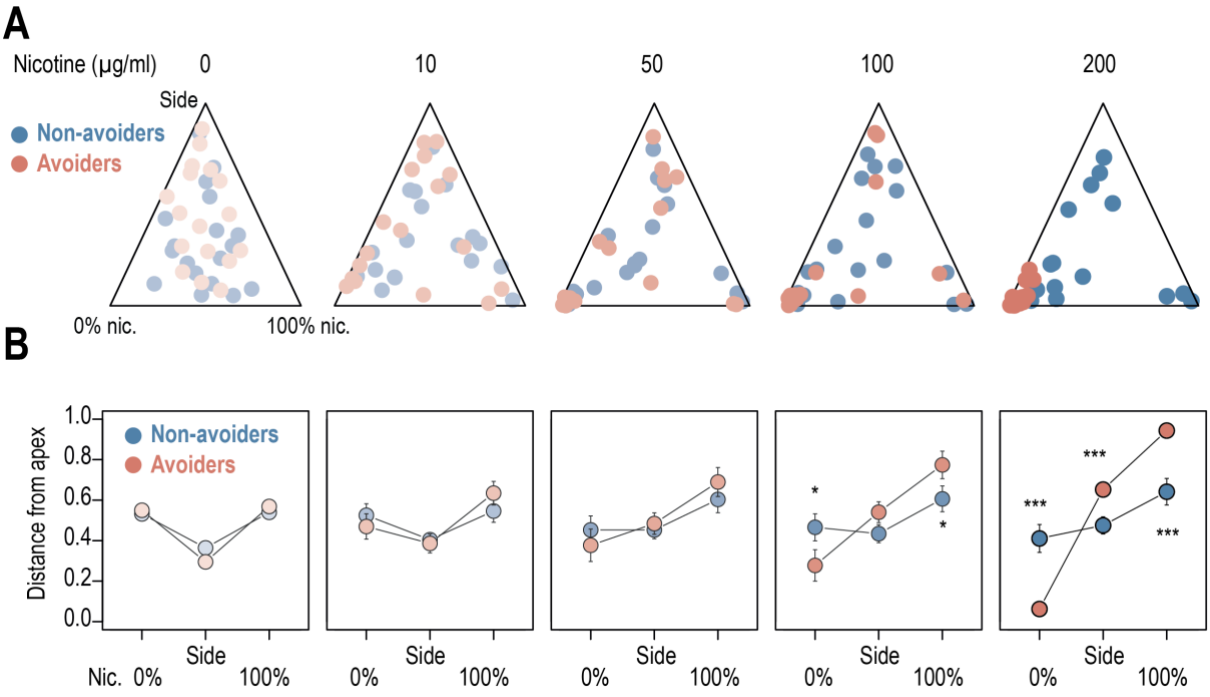



**Figure 2-figure supplement 1: Individual adaptations for avoiders and non-avoiders. A.** Ternary representations for avoiders (red) and non-avoiders (blue), illustrating their nicotine consumption index over their side bias index, as nicotine concentration increases during the task. Note how all avoiders end up, at the end of the task, in the bottom left apex corresponding to 0% nicotine consumption. **B.** Distance from each of the three apices for avoiders (red) and non-avoiders (blue) as nicotine concentration increases during the task. Note how the behavior of avoiders is highly nicotine-concentration dependent (Mann-Whitney, Nic 100 µg/ml : p(Sacc) = 0.018; p(Nic) = 0.011; Nic 200 µg/ml : p(Sacc) < 0.001, p(Side) < 0.001, p(Nic) < 0.001). *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

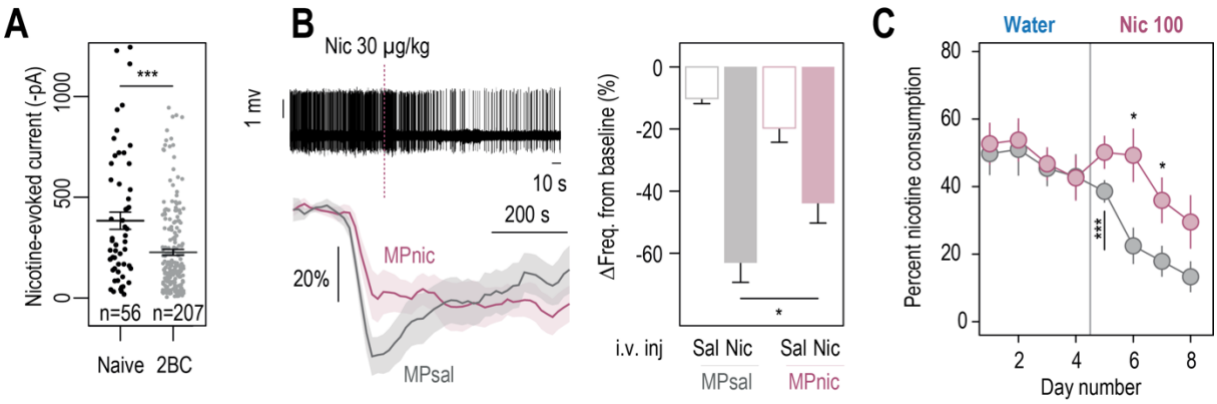



**Figure 3-figure supplement 1: Physiological and behavioral adaptations following chronic nicotine treatment. A.** Nicotine-induced current (puff application, 30 µM, 200 ms) recorded in voltage-clamp mode (-60 mV) from IPN neurons of naive mice kept in their home-cage (black, n = 56 neurons from 8 mice, I = -384 ± 43 pA) and of mice that underwent the two-bottle choice task (2BC, grey, n = 207 neurons from 26 mice, I = -227 ± 15 pA). Nicotine-induced currents were of smaller amplitude in 2BC mice than in naive mice (Mann-Whitney, p = 0.0002). **B.** *In vivo* juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in nicotine-inhibited IPN neurons of saline- and nicotine-treated animals. Top left, representative electrophysiological recording of an IPN neuron, during an i.v. injection of nicotine (30 µg/kg). Bottom left, average time course and amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline and nicotine (30 µg/kg), for IPN neurons of saline- (n = 12 neurons from 7 mice) and nicotine-treated animals (n = 13 neurons from 10 mice). Right, responses were on average lower after chronic exposure to nicotine ($p < 0.05$). **C.** Daily percent nicotine consumption for saline- and nicotine-treated mice, for each day in the two-bottle choice task. In saline-treated mice, avoidance to nicotine appears from the second nicotine exposition day onward. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

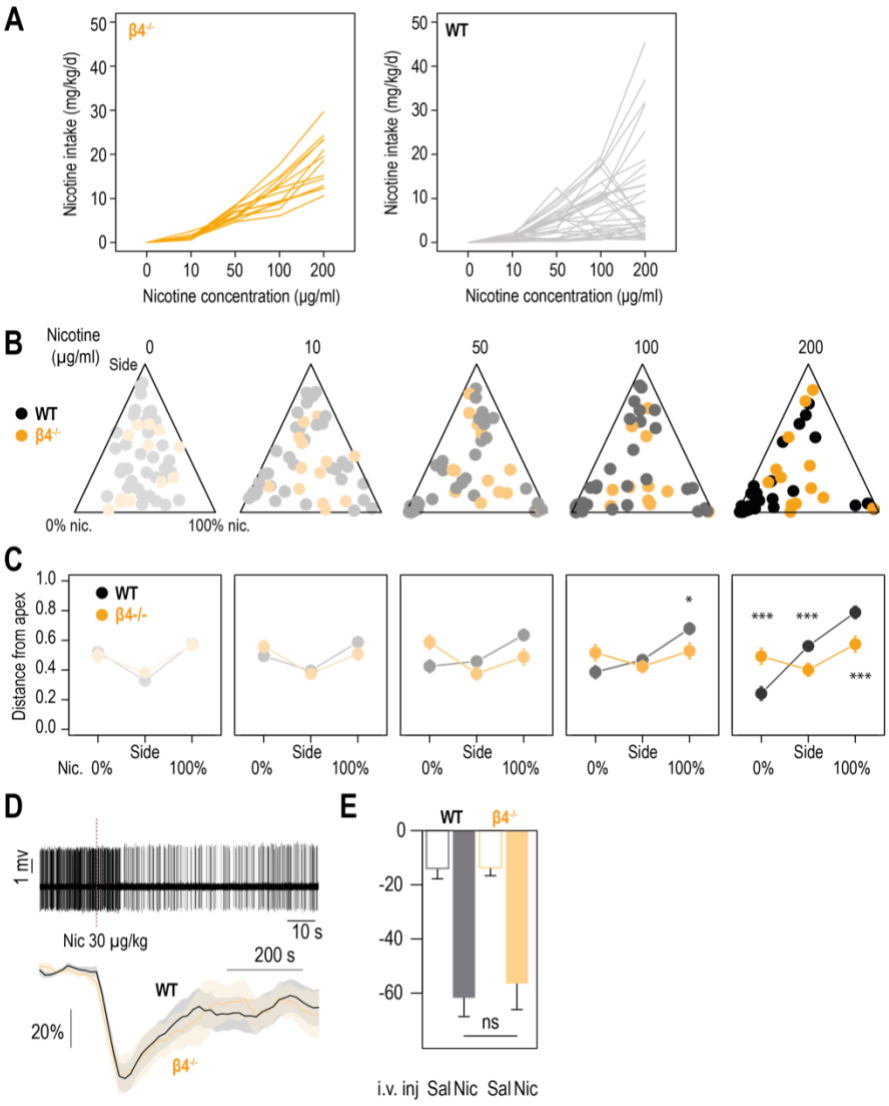



**Figure 4-figure supplement 1: Behavioral and electrophysiological differences between WT and β4$^{-/-}$ mice. A.** Nicotine intake (mg/kg/d) for individual WT (black) and β4$^{-/-}$ mice (orange), as concentration of nicotine increases. **B.** Ternary representations for WT (black) and β4$^{-/-}$ mice (orange), illustrating their nicotine consumption index over their side bias index, as nicotine concentration increases during the task. **C.** Distance from each of the three apices for WT (black) and β4$^{-/-}$ mice (orange) as nicotine concentration increases during the task. Note how the behavior of WT mice is highly nicotine-concentration dependent compared to that of β4$^{-/-}$ mice. (Mann-Whitney test, Nic 100 µg/ml : p(Nic) = 0.018; Nic 200 µg/ml : p(Sacc) < 0.001, p(Side) < 0.001, p(Nic) < 0.001) **D.** *In vivo* juxtacellular recordings of nicotine-evoked responses in nicotine-inhibited IPN neurons of WT and β4$^{-/-}$ animals. Top, representative electrophysiological recording of an IPN neuron, during an i.v. injection of nicotine (30 µg/kg). Bottom, average time course and amplitude of the change in firing frequency from baseline after

an i.v. injection of saline and nicotine (30 µg/kg), for WT (black) and $\beta4^{-/-}$ animals (yellow). Right, average amplitude of the change in firing frequency from baseline after an i.v. injection of saline and nicotine (30 µg/kg) in nicotine-inhibited IPN neurons from WT (n =16 neurons from 14 mice) and $\beta4^{-/-}$ (n = 8 neurons from 6 mice) animals. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

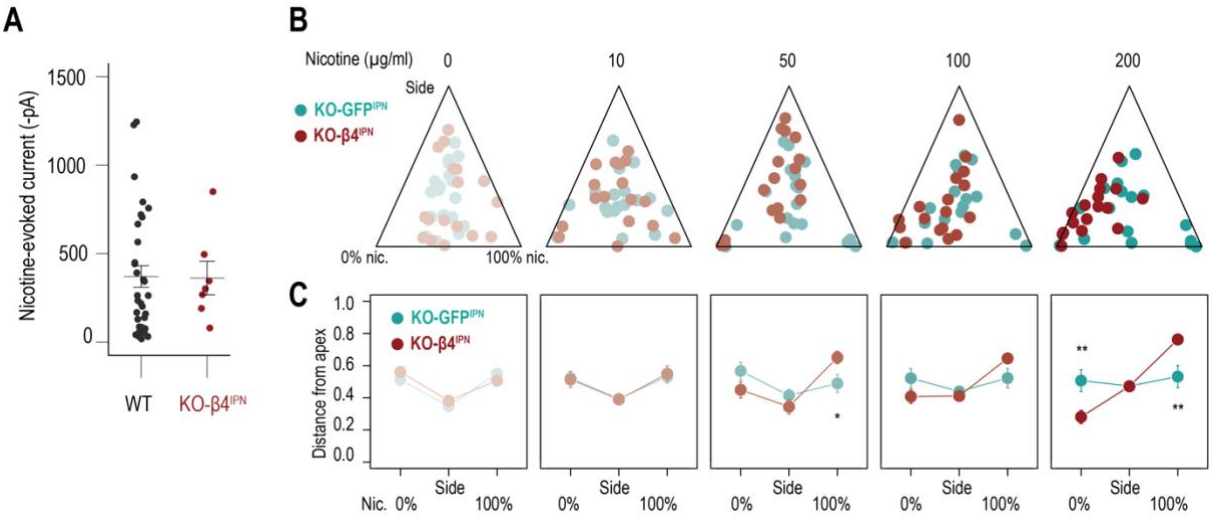



**Figure 5-figure supplement 1: Viral rescue of nAChR β4 subunit expression in the IPN of β4$^{-/-}$ mice. A.** Average nicotine-induced currents following a puff application of nicotine (30 µM, 200 ms) on IPN neurons from WT (n = 32, -370 +/ -61 pA) and KO-β4$^{IPN}$ mice (n = 7, -362 ± 95 pA; Mann-Whitney, p = 0.6). **B.** Ternary representations for KO-GFP$^{IPN}$ (controls, green) and KO-β4$^{IPN}$ mice (red), illustrating their nicotine consumption index over their side bias index, as nicotine concentration increases during the task. **C.** Distance from each of the three apices for KO-GFP$^{IPN}$ (controls, green) and KO-β4$^{IPN}$ mice (red) as nicotine concentration increases during the task. (Mann-Whitney, Nic 50 µg/ml: p(Nic) = 0.017; Nic 200 µg/ml: p(Sacc) = 0.0074, p(Nic) = 0.0083). *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

# Discussion

## 1. Développement d'outils pour manipuler la transmission nicotinique *in vivo*

La nicotine présente des propriétés antagonistes dont l'émergence est distribuée au sein de plusieurs circuits, comprenant la VTA et l'IPN. Les nAChR exprimés par ces deux voies traduisent le message chimique de la nicotine et sont acteurs de plusieurs mécanismes d'adaptations lors d'une exposition chronique à la drogue. Alors que le rôle clé de la sous-unité nicotinique β2 au sein de la VTA dans les processus menant à l'addiction est bien caractérisé, les fonctions spécifiques de la grande diversité de nAChR dans l'IPN restent à élucider. Pour les étudier, j'ai participé au développement d'outils pour contrôler des populations de nAChR spécifiques exprimées dans l'IPN et étudier leurs rôles dans la réponse électrophysiologique et comportementale à la nicotine.

Les stratégies génétique, pharmacologique et optogénétique ont toutes permis des avancées considérables dans notre compréhension des processus neuronaux sous-tendant l'addiction à la nicotine. Cependant, ces outils présentent des limites en termes de résolution temporelle, spatiale et/ou de spécificité moléculaire et cellulaire. Nous avons développé des sous-unités nicotiniques mutantes et une gamme de ligands associés afin de pouvoir interroger le rôle de sous-types de nAChR précis exprimés dans des structures ou des synapses spécifiques, à des échelles de temps allant de la milliseconde à plusieurs jours. Au cours de ce travail, j'ai pu mettre en œuvre deux méthodes complémentaires pour manipuler *in vivo* les nAChR dans l'IPN. Je discuterai dans un premier temps des données non publiées détaillant notre approche de photopharmacologie via un ligand photo-contrôlable (MAHoCh) appliquée à l'IPN, avant de revenir sur les résultats obtenus grâce à la stratégie d'antagonisme irréversible ($MPEG_4Ch$).

### 1.1. Contrôle optique des nAChR β4* dans l'IPN

Nous avons mis en place une stratégie photopharmacologique permettant de contrôler un sous-type spécifique de nAChR de manière aiguë et réversible, grâce à la lumière. Elle repose sur l'incorporation d'un ligand sensible à la lumière sur une sous-unité nicotinique, permettant de bloquer (lumière violette) ou libérer (lumière verte) le site de liaison de l'agoniste (Figure 8.1.A). Notre laboratoire a déjà réussi à implémenter les nAChR β2 photo-contrôlables (LinAChR) chez l'animal éveillé (Durand-de Cuttoli et al., 2018). Dans cette étude, le blocage des LinAChR β2 par la lumière a révélé l'impact de la modulation cholinergique endogène sur l'activité spontanée de la VTA, et a permis d'abolir leur réponse à la nicotine ainsi que le renforcement à la drogue de manière photo-réversible. Il s'agit de la première démonstration de l'utilisation de ce type de stratégie *in vivo* chez la souris en comportement (Paoletti et al., 2019). Une partie de mon travail de recherche a consisté à implémenter cette technique via la sous-unité β4 dans l'IPN, où elle joue un rôle important dans plusieurs phases de la dépendance (Zhao-Sheah et al., 2013 ; Harrington et al., 2016), afin d'évaluer son rôle dans la modulation cholinergique endogène ainsi que dans la réponse à la nicotine des neurones de ce noyau.

Pour cela, j'ai réalisé des injections stéréotaxiques de lentivirus pour faire exprimer le transgène de la sous-unité β4 mutée (β4E61C) de façon ubiquitaire dans les neurones de l'IPN chez la souris WT (Figure 8.1.B). Des enregistrement *ex vivo* ont confirmé que la sous-unité β4E61C s'incorpore dans les nAChR natifs des neurones de l'IPN pour former des récepteurs fonctionnels et photo-inhibables (Figure 8.1.C). On observe en effet une diminution de l'amplitude des courants évoqués par l'application locale de nicotine (30 µM) pendant l'illumination en lumière violette, qui est restaurée en lumière verte. J'ai ensuite testé le rôle de la sous-unité β4 dans la réponse à la nicotine de l'IPN *in vivo* grâce à des enregistrements en tétrodes chez l'animal anesthésié (Figure 8.1.D). J'ai pu déterminer que la photo-inhibition des LinAChR β4 dans l'IPN diminue significativement et de façon réversible l'activation des neurones de l'IPN en réponse à la nicotine (Figure 8.1.E-F). Sur l'échantillon de neurones inhibés enregistré, le blocage de la sous-unité β4 ne semble avoir aucun impact sur l'amplitude de réponse (données non représentées). Ces résultats corroborent ceux obtenus avec le MPEG$_4$Ch : la sous-unité β4 jouerait un rôle uniquement dans la réponse activée induite par la nicotine dans l'IPN.

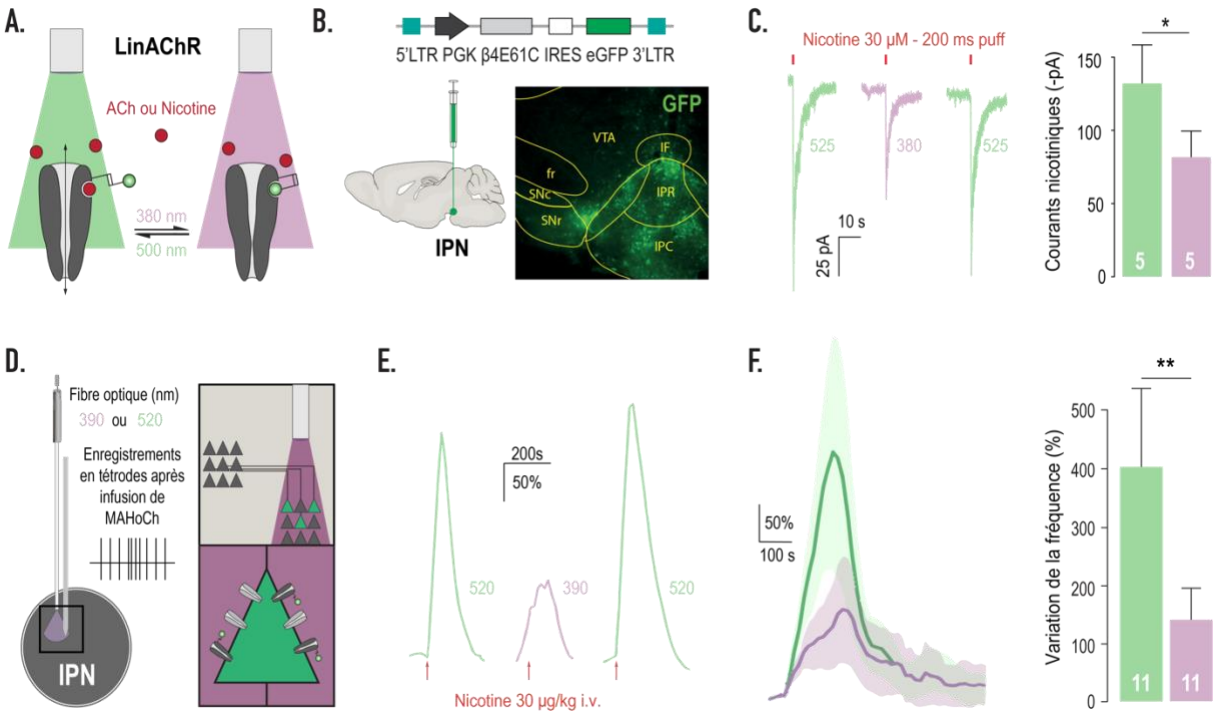



**Figure 8.1 – Photo-inhibition des récepteurs nicotiniques β4* *ex vivo* et *in vivo* :** (**A**) Principe de la stratégie photopharmacologique. Le LinAChR est constitué d'un nAChR muté sur la sous-unité β4 et d'un antagoniste photo-contrôlable. Sous lumière verte (500 nm) ou dans le noir, le récepteur est fonctionnel. Sous lumière violette (380 nm), l'antagoniste change de configuration, entre en compétition avec l'agoniste et inhibe le récepteur. (**B**) (Haut et Gauche) Construction utilisée pour la transduction des neurones de l'IPN avec la sous-unité mutante cystéine (β4E61C). (Droite) Immunohistochimie de la GFP représentative d'une infection virale circonscrite à l'IPN. (**C**) L'amplitude des courants évoqués par l'application locale de nicotine (puff de 200 ms, nicotine 30 µM) est significativement réduite sous lumière violette (380 nm) et entièrement restaurée sous lumière verte (525 nm). Expériences réalisées par Romain Durand-de Cuttoli. (**D**) Schéma des enregistrements *in vivo* dans l'IPN avec photo-stimulation des récepteurs β4* mutés conjugués au MAHoCh. (**E**) Exemple de neurone enregistré *in vivo* chez une souris anesthésiée : la réponse évoquée par l'injection aiguë de nicotine (30 µg/kg, i.v.) est diminuée sous lumière violette et entièrement rétablie sous lumière verte. (**F**) (Gauche) Représentation du décours temporel de la réponse moyenne des neurones de l'IPN sous lumière violette et sous lumière verte. (Droite) Les neurones activés dans l'IPN voient leur réponse significativement réduite sous lumière violette.

1.2. Modulation cholinergique endogène de l'activité de l'IPN

Au-delà des perturbations exogènes induites par la nicotine, l'IPN reçoit une forte modulation cholinergique endogène via les afférences de la MHb (Ren et al., 2011). L'ACh au sein de l'IPN peut engager une large gamme de nAChR, situés aussi bien sur les terminaisons pré-synaptiques de la MHb que sur les neurones en post-synaptique. Plusieurs mécanismes d'action de l'ACh ont été mis en évidence, dont l'augmentation du relargage de neurotransmetteurs par la MHb et une dépolarisation des neurones de l'IPN (Mulle et al., 1991 ; Frahm et al., 2015). Cependant l'effet de la neurotransmission cholinergique *in vivo* sur les nombreux nAChR des neurones de l'IPN reste à déterminer.

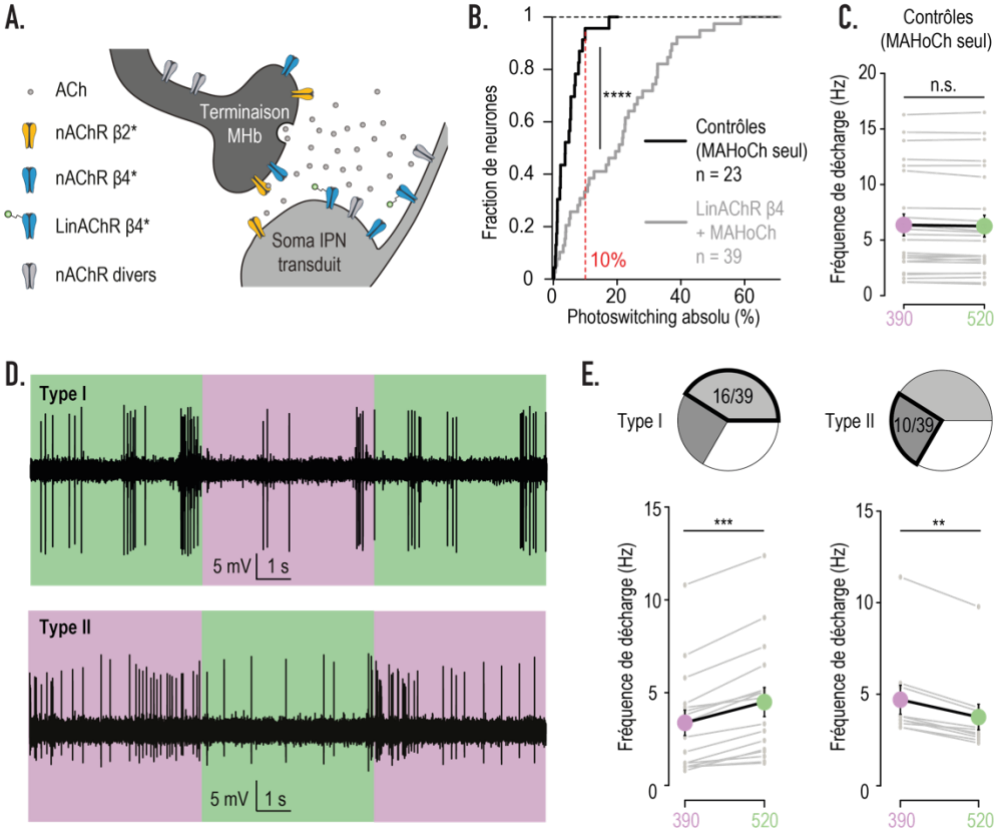



**Figure 8.2 – Photo-modulation de la transmission nicotinique endogène *in vivo* dans l'IPN :** (**A**) La transduction lentivirale dans l'IPN permet de restreindre l'expression du mutant cystéine au niveau des neurones de l'IPN en laissant les terminaisons de la MHb intactes. (**B**) Distribution cumulative représentant la proportion des neurones enregistrés en fonction de leur pourcentage absolu de photoswitching (photoswitching = (Fréquence sous lumière à 520nm ($Freq_{520}$) – $Freq_{390}$) / $Freq_{520}$)). Gris : neurones enregistrés chez les individus transduits avec la construction β4E61C après infusion de MAHoCh dans l'IPN. Noir : neurones en condition contrôle (Infusion seule de MAHoCh sans transduction). (**C**) Fréquence de décharge spontanée sous lumière violette (390 nm) et lumière verte (520 nm) des neurones de l'IPN en condition contrôle. (**D**) Exemples d'enregistrements en tétrodes pour un neurone de type I (haut) et un neurone de type II (bas). (**E**) Fréquence de décharge spontanée sous lumière violette (390 nm) et lumière verte (520 nm) des neurones type I et II de l'IPN chez les in dividus transduits avec la construction β4E61C et traités avec le MAHoCh.

La stratégie de transduction virale permet de cibler exclusivement les neurones de l'IPN et de sonder leur réponse aux variations d'ACh par le blocage aigu de leurs nAChR (Figure 8.2.A). J'ai ainsi enregistré l'activité spontanée des neurones de l'IPN tout en interrompant brièvement la neurotransmission nicotinique, en antagonisant optiquement et de façon intermittente leurs nAChR β4*

(e.g. alternance de lumières verte et violette toutes les 5 secondes). Ce protocole a permis de démontrer qu'il n'y avait aucune photosensibilisation de la neurotransmission nicotinique par application seule de MAHoCh (Figure 8.2.B-C), alors qu'après transfection deux tiers des neurones présentent une modulation de leur activité lors de l'alternance de flashs de lumière (Figure 8.2.B). Ce résultat montre la spécificité pharmacologique de notre approche : la mutation cystéine est nécessaire pour la photo-modulation avec le MAHoCh. De plus, nous observons que cette modulation est bidirectionnelle avec une population de neurones inhibés lors du blocage des LinAChR β4 (Type I) et une population de neurones activés (Type II, Figure 8.2.D-E). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'ACh libérée par les neurones de la MHb module l'activité des neurones de l'IPN en agissant également sur les nAChR β4* de l'IPN.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent l'existence d'un tonus cholinergique endogène impliqué dans la régulation de l'activité spontanée des neurones de l'IPN et confirment le rôle des nAChR β4* dans l'activation des neurones de l'IPN par la nicotine.

### 1.3. Antagonisme irréversible des récepteurs nicotiniques

La stratégie de photopharmacologie par transduction virale permet de manipuler un sous-type de nAChR spécifique dans une structure cérébrale d'intérêt, et ce de manière rapide et réversible. L'expression de la sous-unité mutante est restreinte à un compartiment cellulaire précis (pré- ou post-synaptique) et potentiellement à une population neuronale définie par l'utilisation d'un système de ciblage génétique (Cre-lox par exemple). Cependant, ce type de technologie est associé à plusieurs contraintes techniques, notamment la nécessité d'apporter trois éléments au même endroit dans le cerveau : le gène qui code la sous-unité mutée, le ligand photosensible, et la lumière. Son emploi requiert également de maintenir les souris reliées en permanence à une source de lumière, ce qui représente une forte contrainte lors de paradigmes comportementaux de longue durée, comme celui du choix à deux bouteilles. Enfin, la stratégie par transduction virale ne permet qu'une substitution partielle par la sous-unité mutée, uniquement dans les neurones infectés, maintenant ainsi une population de récepteurs endogènes insensibles à la photo-régulation. Pour répondre à ces problématiques, nous avons développé deux lignées de souris transgéniques *knock-in* (KI β2E61C et β4E61C) ainsi qu'un antagoniste irréversible, le $MPEG_4Ch$.

Les souris transgéniques KI, dans lesquelles les gènes natifs sont remplacés par les mutants ponctuels, permettent de garantir un remplacement complet de la sous-unité endogène par sa version mutée avec *a priori* un profil d'expression identique avec la condition WT. L'utilisation de ces lignées permet également de nous affranchir de l'étape de transduction virale par injection stéréotaxique et des contraintes techniques associées. En conséquence, ces souris permettent de manipuler la neurotransmission nicotinique à tous les stades de développement. Le $MPEG_4Ch$ entraîne une inhibition importante, immédiate (les maléimides réagissent en quelques minutes avec les thiols des cystéines (Szijj et al., 2018) et durable sur plusieurs jours, des nAChR endogènes avec une spécificité pharmacologique absolue et dans des régions cérébrales ciblées. Ces outils nous ont permis de bloquer la transmission nicotinique dans l'IPN pendant plus de vingt jours suite à une unique infusion de $MPEG_4Ch$,

ce qui suggère que l'attachement du $MPEG_4Ch$ au récepteur via la cystéine est complètement irréversible, en accord avec ce qui a déjà été montré pour ce type de liaison (Szijj et al., 2018). L'antagonisme de très longue durée induit par le $MPEG_4Ch$ interroge toutefois sur les mécanismes de *turnover* des nAChR. Il n'existe en effet que peu d'informations sur le processus de *turnover* des nAChR *in vivo*. L'efficacité du blocage en système hétérologue et chez la souris nous laisse penser que l'infusion de notre ligand marque une grande partie des récepteurs mutés présents à la membrane, en accord avec la grande efficacité de réaction des maléimides sur les thiols (Paoletti et al., 2019). Le $MPEG_4Ch$ étant une molécule polaire, il a peu de chances de traverser les membranes plasmique et vésiculaire pour marquer les nAChR intracellulaires. Seuls les récepteurs présents à la surface des cellules devraient donc être marqués. De plus, de par sa petite taille, le $MPEG_4Ch$ devrait diffuser rapidement en dehors du site d'injection. Enfin, de par sa réactivité chimique (groupement maléimide nucléophile), l'excès de $MPEG_4Ch$ devrait rapidement s'hydrolyser sur les autres cystéines environnantes, même en dehors de celles présentées par les nAChR mutés. Il semble ainsi peu probable que ce ligand réactif subsiste suffisamment longtemps dans le milieu extracellulaire pour marquer l'ensemble des récepteurs synthétisés par la cellule, et notamment le stock intracellulaire. Nous ne pouvons toutefois pas exclure la possibilité que le $MPEG_4Ch$ reste longtemps dans le milieu extracellulaire, comme observé avec la chlorisondamine (Clarke er al., 1994 ; el-Bizri et Clarke, 1994), un antagoniste des nAChR toutefois beaucoup plus hydrophobe que le $MPEG_4Ch$. Comment expliquer la durée d'action du $MPEG_4Ch$ ? On pourrait imaginer que le turnover des nAChR (défini ici comme le recyclage entre les stocks intracellulaires et ceux adressés à la membrane) soit très rapide (cinétique de recyclage comparable à celle du marquage), et que le $MPEG_4Ch$ ait le temps de marquer, lors de son infusion, l'ensemble des récepteurs fabriqués par la cellule. Il est également possible que le stock de récepteurs dans les vésicules intracellulaires soit très petit par rapport au stock membranaire. Dans tous les cas, la taille du stock intracellulaire de nAChR sera déterminante : si elle est relativement faible (la cellule adresse la majorité des récepteurs synthétisés à la membrane), l'infusion de $MPEG_4Ch$ marquera de façon irréversible la majorité des nAChR de la cellule. Le rétablissement des courants nicotiniques dépendrait alors de la synthèse *de novo* de récepteurs, qui peut prendre plusieurs semaines (Fornasiero et al., 2018).

## 2. La réponse de l'IPN à la nicotine

Nous avons constaté que les neurones de l'IPN présentaient une hétérogénéité (activation/inhibition) de réponses à l'administration aiguë de nicotine. Ce phénomène a déjà été observée dans les neurones dopaminergiques de la VTA (Eddine et al., 2015 ; Nguyen et al., 2021 en annexe). La polarité des réponses dans l'IPN ne change pas en fonction de la dose et semble dépendre de sous-types de nAChR différents (β4* pour les neurones activés, β2* pour les neurones inhibés). L'IPN est majoritairement composé de neurones GABAergiques répartis en deux populations d'interneurones et de neurones de projection. Dans la population de neurones activés, l'excitation provient vraisemblablement de la liaison directe de la nicotine sur les nAChR exprimés par ces neurones, entraînant leur dépolarisation et facilitant ainsi la genèse de potentiels d'action. Cet effet est amplifié par l'action de la nicotine sur les récepteurs somatiques et pré-synaptiques de la MHb qui augmente la transmission excitatrice cholinergique et glutamatergique sur l'IPN (Beiranvand et al., 2014). Dans le cas

des neurones inhibés, l'hypothèse la plus simple serait que la nicotine entraîne l'activation d'interneurones présents dans l'IPN, dont l'action inhibitrice sur leurs neurones cibles supplanterait la modulation excitatrice que ces neurones reçoivent. Il semble peu probable que l'inhibition provienne d'une structure extérieure, aucune afférence inhibitrice sur l'IPN n'ayant à ma connaissance été caractérisée. Des expériences *ex vivo* en tranches permettraient d'investiguer si un mécanisme d'inhibition des neurones de l'IPN peut émerger au sein de ce noyau en absence de ses afférences.

Les rôles respectifs des sous-unités β4 et β2 dans l'activation et l'inhibition à la nicotine pourraient provenir de différences en termes de types de neurones et de compartiment cellulaire. On pourrait ainsi imaginer que les nAChR β4* sont plutôt somatiques et exprimés par des neurones de projection de l'IPN. La nicotine jouerait un rôle excitateur direct sur ces neurones, entraînant leur activation sans avoir d'impact sur la population de neurones inhibés. A l'inverse, les nAChR β2* pourraient être préférentiellement exprimés au niveau des terminaisons des neurones de l'IPN. Il a par exemple été montré que les neurones de projections de l'IPN expriment des nAChR β2* sur leurs terminaisons axonales dans le LDTg, qui semblent jouer un rôle dans leur relargage de neurotransmetteur suite à l'administration de nicotine (Wolfman et al., 2018). L'absence d'inhibition des courants nicotiniques *ex vivo* dans l'IPN chez la souris β2E61C après traitement avec le $MPEG_4Ch$ renforce cette hypothèse. Le blocage de cette population de récepteurs n'aurait donc pas nécessairement d'impact sur la fréquence de décharge des interneurones, bien que nos résultats ne permettent pas de l'exclure. Cependant, il s'opposerait à la facilitation du relargage de GABA par la nicotine : l'inhibition serait ainsi réduite, sans être abolie. Enregistrer les courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) dans les neurones de l'IPN en jouant sur le blocage réversible des nAChR β2* grâce au MaHoCh permettrait d'éclaircir un rôle de ces récepteurs dans la libération de neurotransmetteurs en réponse à la nicotine.

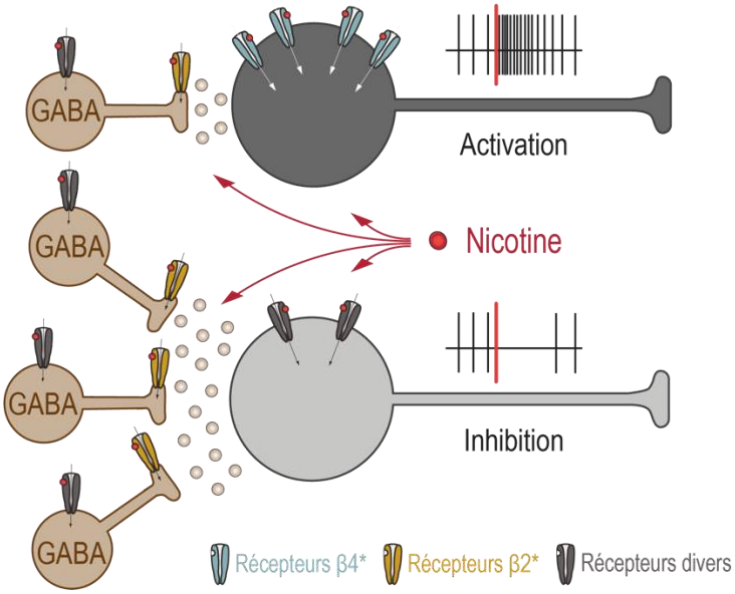



**Figure 8.3 – Hypothèse des mécanismes concurrents d'activation et d'inhibition à la nicotine dans l'IPN :** Les neurones exprimant des nAChR β4* sont activés par la nicotine et ne contactent pas nécessairement les autres neurones dans l'IPN. Les interneurones locaux portent sur leurs terminaisons synaptiques des nAChR β2* qui modulent le relargage local de GABA et donc l'inhibition des neurones qu'ils contactent en réponse à la nicotine. L'expression « récepteurs divers » indique ici que nous ne faisons pas d'hypothèses a priori sur la composition ou la densité de ces récepteurs (β2*, β4* ou autre).

Nos résultats illustrent l'importante hétérogénéité des neurones de l'IPN, déjà exprimée dans plusieurs études s'intéressant à leurs propriétés physiologiques et moléculaires ainsi qu'à leurs caractéristiques anatomiques (Antolin-Fontes et al., 2015 ; Ables et al., 2017 ; Quina et al., 2017 ; Lima et al., 2017 ; DeGroot et al., 2020). Il serait intéressant de pouvoir corréler un profil électrophysiologique de réponse à la nicotine à un marquage moléculaire en immunohistochimie et/ou à un type de neurone (projection ou interneurone), permettant de disséquer les rôles fonctionnels de populations neuronales spécifiques. Notamment, identifier la polarité du message de sortie de l'IPN en réponse à la nicotine (activé ou inhibé) permettrait d'élucider le type de modulation qu'il exerce sur ses structures cibles. Une activation des neurones de projections correspondrait ainsi à une augmentation du relargage de GABA et une inhibition des neurones qu'ils contactent. Bien que nous ne puissions pas le confirmer pour le moment, c'est l'hypothèse que nous formulons pour la modulation de la VTA par l'IPN via le LDTg et que nous allons maintenant détailler.

## 3. Contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques par l'IPN dans le renforcement

Nous avons observé que le blocage chémogénétique des nAChR β4* dans l'IPN induit une sensibilité accrue à la nicotine des neurones dopaminergiques de la VTA, en accord avec une précédente étude utilisant un modèle génétique (Harrington et al., 2016). Cet antagonisme impacte uniquement la réponse des neurones activés dans l'IPN, suggérant que l'effet sur la VTA est porté par cette population. Bien que le mécanisme de cette modulation de l'IPN sur la VTA reste encore à déterminer, l'absence de connexion directe établie à ce jour (Quina et al., 2017 ; Lima et al., 2017) laisse supposer que le message passe par une autre structure servant d'intermédiaire. Le LDTg se dessine comme un acteur potentiel de cette communication : il reçoit des afférences GABAergiques de l'IPN dont l'activation induit un comportement d'évitement, alors que leur inhibition bloque l'aversion à la nicotine (Wolfman et al., 2018). Le LDTg envoie vers la VTA majoritairement des projections glutamatergiques et cholinergiques qui jouent un rôle dans la régulation de son activité ainsi que dans le renforcement et la récompense (Lammel et al., 2012 ; Dautan et al., 2016 ; Fernandez et al., 2018). On pourrait ainsi supposer que la population de neurones activés dans l'IPN contacte le LDTg et exerce un contrôle inhibiteur sur cette structure. Dans cette hypothèse, la stimulation de l'IPN par la nicotine entraînerait une inhibition du LDTg et donc une diminution de la transmission excitatrice en aval sur la VTA. L'effet seul d'une dose sous-seuil de nicotine sur les neurones dopaminergiques ne serait pas suffisant pour induire une réponse électrophysiologique et comportementale. Lorsque l'on bloque la transmission nicotinique dans l'IPN, ce contrôle inhibiteur est levé et l'effet conjugué d'excitation par la nicotine sur le LDTg et la VTA active la transmission dopaminergique, même aux faibles doses. L'IPN jouerait ainsi un rôle de gating sur la réponse à la nicotine des neurones dopaminergiques de la VTA en contrôlant leurs afférences, déterminant la dose seuil de leur activation et de l'émergence d'un renforcement à la drogue. Pour valider cette hypothèse, il nous faudrait déterminer la polarité du message de sortie de l'IPN en réponse à la nicotine, et enregistrer la réponse en aval des neurones du LDTg en modulant la transmission nicotinique dans l'IPN. Cibler les neurones projetant vers le LDTg via des traceurs rétrogrades (virus, rétrobilles) et enregistrer leur activité en photométrie fibrée ou par des enregistrements

électrophysiologiques permettrait d'élucider la nature de ce message de sortie. Des expériences combinant notre stratégie de pharmacologie chémogénétique et enregistrements en tétrodes *in vivo* permettraient également d'évaluer l'impact du blocage de l'IPN sur l'activité du LDTg et sa réponse à la nicotine.

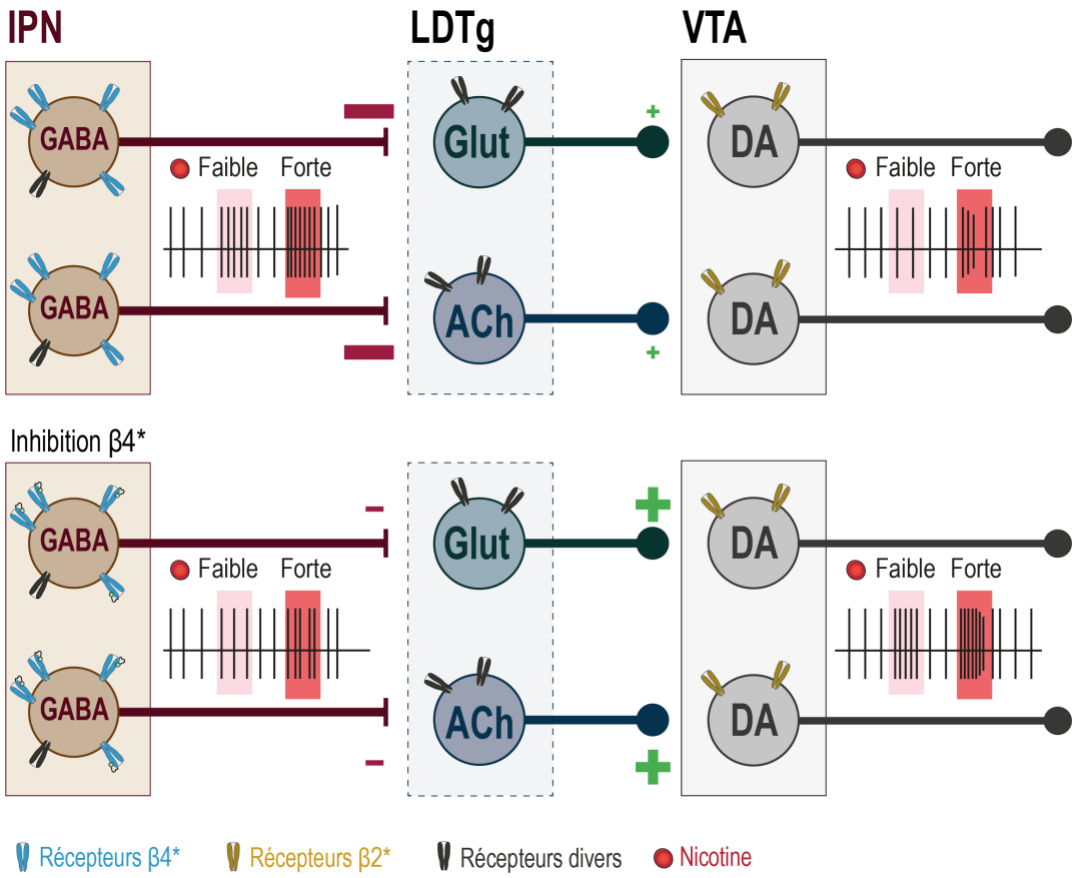



**Figure 8.4 – Modèle de la modulation de la réponse à la nicotine de la VTA par l'IPN :** En conditions normales (haut), l'IPN répond dès les faibles doses de nicotine et exerce un contrôle inhibiteur sur le LDTg, réduisant en aval la sensibilité des neurones dopaminergiques à la nicotine. Lorsque la transmission nicotinique par les récepteurs β4* dans l'IPN est bloquée (bas), ce frein est levé et entraîne une sensibilité accrue des neurones dopaminergiques à la drogue.

Bien que l'utilisation de tétrodes ne permette pas d'identifier avec certitude les neurones dopaminergiques enregistrés, nous pouvons estimer certains paramètres sur l'identité de ces neurones. La quasi-totalité d'entre eux voit leur fréquence de décharge augmenter suite à l'administration de nicotine. J'ai participé à une étude de notre équipe qui a démontré que les neurones dopaminergiques activés par la nicotine sont situés davantage dans la partie latérale de la VTA et projettent vers le NAc (Nguyen et al., 2021 en annexe). Les projections dopaminergiques de la VTA vers le NAc sont essentielles dans les processus de renforcement aux drogues d'abus (Picciotto et al., 1998 ; Faure et al., 2014), ce qui est cohérent avec nos résultats lors du paradigme de CPP. Il serait intéressant de savoir si les neurones dopaminergiques inhibés par la nicotine voient également leur réponse modifiée par le blocage de l'IPN, impliquant une modulation par ce noyau de l'anxiété traduite par la voie VTA-BLA. Pour autant, la question de la nature des neurones de la VTA contactant l'IPN reste en suspens. En effet, les études s'étant intéressées à ces projections ont ciblé l'ensemble des neurones dopaminergiques sans

restreindre leur stratégie à des populations particulières (Molas et al., 2017a ; De Groot et al., 2020). Une étude plus approfondie via des marquages anatomiques spécifiques permettrait d'éclaircir les réseaux dopaminergiques précis impliqués dans la communication entre IPN et VTA.

L'action de l'IPN semble correspondre à une réduction de la valeur récompensante de la nicotine produite par l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA. D'un point de vue physiologique, on peut ainsi s'interroger sur un éventuel rôle de l'IPN dans l'intégration d'autres types de récompenses. L'IPN agirait ainsi comme un modulateur endogène indirect de la VTA pour gérer la valence des stimuli naturels. Une expérience permettant de le tester serait une tâche de choix entre deux récompenses naturelles de valeurs équivalentes pour l'animal, et où une stimulation de l'IPN serait associée au choix de l'une des deux afin d'en évaluer l'impact sur la prise de décision. Un tel rôle de dévaluation des récompenses serait en adéquation avec la variété de rôles endogènes de l'IPN, encore imprécise, qui signale globalement des comportements et émotions négatives. Un stimulus négatif pourrait activer l'IPN qui, en diminuant l'activité dans la VTA, signalerait l'aversion.

## 4. Le circuit IPN – VTA dans l'addiction à la nicotine

L'ensemble de nos résultats nous amène à considérer l'IPN comme un acteur engagé à toutes les étapes de la prise de drogue, depuis les premières prises et la mise en place d'un renforcement jusqu'aux stratégies de consommation dans un contexte d'exposition chronique. Notre hypothèse est que l'IPN agit comme un frein à la consommation de drogue en diminuant les propriétés renforçantes de la nicotine dès les faibles doses et en s'opposant à la consommation de fortes doses. L'IPN agirait dans cette mesure comme un senseur de la dose de nicotine dans l'organisme et son activité influencerait le comportement de l'animal en conséquence. Plus la transmission nicotinique est forte dans l'IPN, plus la gamme de doses permettant un renforcement est étroite. A l'inverse, bloquer ou diminuer la transmission nicotinique dans l'IPN lève le frein qu'il exerce et permet un engagement de l'individu dans une plus large gamme de doses de nicotine, à savoir un renforcement à des doses sous-seuil et une aversion réduite aux fortes doses. Nous avons ainsi identifié lors de ce travail plusieurs facteurs influençant significativement l'efficacité de cette transmission, et donc la réponse comportementale à une dose de nicotine donnée.

Premièrement, nos résultats mettent en évidence un rôle essentiel de la sous-unité β4 dans le contrôle par l'IPN de la balance des propriétés renforçantes et aversives de la nicotine. Des concentrations faibles et non récompensantes de nicotine peuvent moduler le renforcement à la drogue en agissant par l'intermédiaire des nAChR β4*, qui sont habituellement considérés comme des récepteurs de faible affinité (Fenster et al., 1997 ; Grady et al., 2010). Dans le même sens, nous observons que les souris $\beta4^{-/-}$ ne développent pas d'aversion à la nicotine, mais que la réexpression locale de cette sous-unité dans l'IPN est suffisante pour restaurer les comportements d'évitement dans une partie de la population. D'un point de vue neurophysiologique, seule l'activation des neurones de l'IPN en réponse à la nicotine est impactée par le blocage génétique (modèle KO) et chémogénétique des nAChR β4*. Nous pouvons donc conclure que la sous-unité β4 dans l'IPN participe à définir les seuils de renforcement et d'aversion à la nicotine. Elle constituerait le substrat biologique du rôle de frein de l'IPN : plus la

transmission nicotinique via β4 est réduite, plus le seuil de renforcement est abaissé et le seuil d'aversion élevé.

Une exposition chronique à la nicotine réduit également l'amplitude des courants nicotiniques dans l'IPN, et élève ainsi le seuil d'aversion. Nous avons en effet observé que les souris exposées à une dose élevée de nicotine directement suite à la période d'habituation évitent majoritairement le biberon avec la drogue, alors que celles implantées avec une mini-pompe délivrant la nicotine en continu ne changent pas leur comportement de consommation. La prise régulière de nicotine atténue donc progressivement le frein issu de l'IPN, mettant ainsi en place une forme de tolérance favorisant le comportement de consommation. C'est sans doute ce phénomène que nous observons chez les souris « non-avoiders » qui ont accès à des doses croissantes de nicotine et voient ainsi graduellement leur transmission nicotinique dans l'IPN diminuer. Ce groupe continue de consommer même à de fortes doses. Chez les « avoiders », on observe un « décrochage » plus ou moins précoce lors de l'expérience, c'est-à-dire une dose à partir de laquelle ces souris vont éviter le biberon de nicotine et qui caractérise pour nous une aversion. Chaque souris semble donc adapter sa stratégie de consommation en fonction de la dose présentée et du read-out de son propre seuil d'aversion intégré par l'IPN. Quand la dose seuil est franchie, correspondant à une activation suffisante des neurones de l'IPN, l'aversion semble persister dans le temps même après présentation de doses plus faibles. Les souris qui continuent à consommer, dont les $\beta4^{-/-}$, ne doivent pas atteindre leur dose seuil au cours de l'expérience en raison de la plus faible réponse à la nicotine dans l'IPN. Étudier les différences interindividuelles dans le paradigme de consommation nous a également permis de constater que l'aversion à la nicotine ne survient pas uniquement aux fortes doses. Le seuil de sensibilité aux effets aversifs semble intrinsèque à chaque individu et une partie des souris évite la nicotine même à de faibles doses. La notion des faibles et fortes doses dans l'émergence des propriétés renforçantes et aversives de la nicotine dépend ainsi fondamentalement de l'individu.

Ce résultat, comme l'ensemble de ce travail, montre les limites de la dichotomie stricte entre faibles et fortes doses via des populations de récepteurs sous-jacentes (Chapitre 5). Pour rappel, cette théorie avance que l'IPN ne pourrait répondre qu'à de « fortes » doses de nicotine, considérées comme aversives, et non aux « faibles » doses qui seraient récompensantes (Fowler et al., 2011 ; Wolfman et al., 2018 ; Wills et al., 2022). Aux doses récompensantes, la VTA agirait seule pour renforcer la prise de drogue via les récepteurs β2* de haute affinité, tandis que l'IPN ne serait engagé que suite à une consommation importante de nicotine pour la limiter via les récepteurs β4* de faible affinité. Nos résultats montrent à l'inverse que de faibles doses de nicotine, qui n'ont pas d'effet sur les neurones dopaminergiques de la VTA, perturbent significativement l'activité des neurones de l'IPN *in vivo*. Nos expériences d'inhibition chémogénétique impliquent également que cette réponse de l'IPN aux faibles doses diminue l'effet de la nicotine sur la VTA, aussi bien d'un point de vue électrophysiologique (augmentation de l'activité) que comportemental (renforcement). Cet engagement aux faibles doses de l'IPN pourrait également sous-tendre l'aversion à la nicotine, qui repose sur l'efficacité de la transmission nicotinique dans l'IPN, et n'est dans cette mesure pas une réponse comportementale restreinte aux fortes doses. La consommation de nicotine ne reposerait donc pas uniquement sur le renforcement à la drogue et l'action de la VTA et

des récepteurs β2*, mais sur une balance d'effets récompensants et aversifs concomitants et mis en jeu à toutes les doses. L'IPN et ses nAChR β4* peuvent ainsi non seulement participer à la traduction d'une aversion à la nicotine mais également moduler le renforcement à la drogue dès les faibles doses. Son action sur l'équilibre de ces propriétés antagonistes implique un contrôle de la VTA et de la transmission dopaminergique. Une exposition chronique à la nicotine va progressivement atténuer la réponse dans l'IPN et ainsi favoriser la consommation de nicotine. Pris dans leur ensemble, nos résultats mettent en lumière l'existence d'une communication entre l'IPN et la VTA dans l'émergence de la balance entre les propriétés renforçantes et aversives de la nicotine.

# Bibliographie


Ables, J. L. et al. Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular α5 nicotinic neurons regulates nicotine preference. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 13012–13017 (2017).

Aizawa, H., Amo, R. & Okamoto, H. Phylogeny and Ontogeny of the Habenular Structure. Front. Neurosci. 5, (2011).

Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T. & Okamoto, H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. J. Comp. Neurol. 520, 4051–4066 (2012).

Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. & Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol Rev 89, 73–120 (2009).

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. (American Psychiatric Association, 2013).

Anand, P. & Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Arch Pharm Res 36, 375–399 (2013).

Antolin-Fontes, B., Ables, J. L., Görlich, A. & Ibañez-Tallon, I. The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. Neuropharmacology 96, 213–222 (2015).

Ashton, H. et al. Biphasic dose-related responses of the CNV (contingent negative variation) to i.v. nicotine in man. Br J Clin Pharmacol 10, 579–589 (1980).

Azam, L., Winzer-Serhan, U. H., Chen, Y. & Leslie, F. M. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. J Comp Neurol 444, 260–274 (2002).

Baeyer, A. I. Ueber das Neurin. Ann. Chem. Pharm. 142, 322–326 (1867).

Beaulieu, J.-M. & Gainetdinov, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev 63, 182–217 (2011).

Beier, K. T. et al. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. Cell 162, 622–634 (2015).

Beiranvand, F. et al. Nicotinic acetylcholine receptors control acetylcholine and noradrenaline release in the rodent habenulo-interpeduncular complex. Br J Pharmacol 171, 5209–5224 (2014).

Benowitz, N. L. Nicotine Addiction. N Engl J Med 362, 2295–2303 (2010).

Benwell, M. E. M., Balfour, D. J. K. & Anderson, J. M. Evidence that Tobacco Smoking Increases the Density of (?)-[ ³ H]Nicotine Binding Sites in Human Brain. J Neurochem 50, 1243–1247 (1988).

Berke, J. D. What does dopamine mean? Nat Neurosci 21, 787–793 (2018).

Berlin, S. et al. A family of photoswitchable NMDA receptors. Elife 5, e12040 (2016).

Berrettini, W. et al. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. Mol Psychiatry 13, 368–373 (2008).

Bierut, L. J. et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. Am J Psychiatry 165, 1163–1171 (2008).

Björklund, A. & Dunnett, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends Neurosci 30, 194–202 (2007).

Blaha, C. D. et al. Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. J Neurosci 16, 714–722 (1996).

Bousseyrol, E. et al. Self-generation of goal-directed choices in a distributed dopaminergic and prefrontal circuit. http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.05.19.492598 (2022)

Brody, A. L. et al. Cigarette Smoking Saturates Brain α4 β2 Nicotinic Acetylcholine Receptors. Arch Gen Psychiatry 63, 907–915 (2006).

Brody, A. L. et al. Smoking-induced ventral striatum dopamine release. Am J Psychiatry 161, 1211–1218 (2004).

Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. Neuron 68, 815–834 (2010).

Bueno, D. et al. Connections of the laterodorsal tegmental nucleus with the habenular-interpeduncular-raphe system. J Comp Neurol 527, 3046–3072 (2019).

Caggiula, A. R. et al. Importance of nonpharmacological factors in nicotine self-administration. Physiol Behav 77, 683–687 (2002).

Caggiula, A. R. et al. Environmental stimuli promote the acquisition of nicotine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl) 163, 230–237 (2002).

Carlsson, A., Lindqvist, M. & Magnusson, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. Nature 180, 1200–1200 (1957).

Carpenter, C. M., Wayne, G. F. & Connolly, G. N. The role of sensory perception in the development and targeting of tobacco products. Addiction 102, 136–147 (2007).

Changeux, J.-P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. Nat Rev Neurosci 11, 389–401 (2010).

Changeux, J.-P. The nicotinic acetylcholine receptor: a typical 'allosteric machine'. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 373, 20170174 (2018).

Changeux, J.-P. & Taly, A. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. Trends in Molecular Medicine 14, 93–102 (2008).

Chen, L.-S. et al. CHRNA5 risk variant predicts delayed smoking cessation and earlier lung cancer diagnosis--a meta-analysis. J Natl Cancer Inst 107, djv100 (2015).

Cho, K. H. et al. The habenulo-interpeduncular and mammillothalamic tracts: early developed fiber tracts in the human fetal diencephalon. Childs Nerv Syst 30, 1477–1484 (2014).

Clarke, P. B. et al. The pharmacology of the nicotinic antagonist, chlorisondamine, investigated in rat brain and autonomic ganglion. Br J Pharmacol 111, 397–405 (1994).

Clarke, P. B., Schwartz, R. D., Paul, S. M., Pert, C. B. & Pert, A. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin. J Neurosci 5, 1307–1315 (1985).

Coddington, L. T. & Dudman, J. T. The timing of action determines reward prediction signals in identified midbrain dopamine neurons. Nat Neurosci 21, 1563–1573 (2018).

Cohen, C., Perrault, G., Griebel, G. & Soubrié, P. Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). Neuropsychopharmacology 30, 145–155 (2005).

Coimbra, B. et al. Role of laterodorsal tegmentum projections to nucleus accumbens in reward-related behaviors. Nat Commun 10, 4138 (2019).

Colombo, S. F., Mazzo, F., Pistillo, F. & Gotti, C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. Biochemical Pharmacology 86, 1063–1073 (2013).

Conway, K. P., Compton, W., Stinson, F. S. & Grant, B. F. Lifetime comorbidity of DSM-IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. J Clin Psychiatry 67, 247–257 (2006).

Cornwall, J., Cooper, J. D. & Phillipson, O. T. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. Brain Research Bulletin 25, 271–284 (1990).

Correa, V. L., Flores, R. J., Carcoba, L. M., Arreguin, M. C. & O'Dell, L. E. Sex differences in cholinergic systems in the interpeduncular nucleus following nicotine exposure and withdrawal. Neuropharmacology 158, 107714 (2019).

Corrigall, W. A. & Coen, K. M. Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. Psychopharmacology (Berl) 99, 473–478 (1989).

Corringer, P. J., Le Novère, N. & Changeux, J. P. Nicotinic receptors at the amino acid level. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40, 431–458 (2000).

Corringer, P.-J., Sallette, J. & Changeux, J.-P. Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? J Physiol Paris 99, 162–171 (2006).

Cosgrove, K. P. et al. β2-Nicotinic Acetylcholine Receptor Availability during Acute and Prolonged Abstinence from Tobacco Smoking. Arch Gen Psychiatry 66, 666–676 (2009).

Covey, L. S., Glassman, A. H. & Stetner, F. Cigarette smoking and major depression. J Addict Dis 17, 35–46 (1998).

D'Silva, J., Cohn, A. M., Johnson, A. L. & Villanti, A. C. Differences in Subjective Experiences to First Use of Menthol and Nonmenthol Cigarettes in a National Sample of Young Adult Cigarette Smokers. Nicotine Tob Res 20, 1062–1068 (2018).

Dajas-Bailador, F. A., Soliakov, L. & Wonnacott, S. Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. J Neurochem 80, 520–530 (2002).

Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol Sci 25, 317–324 (2004).

Dal Bo, G. et al. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. J Neurochem 88, 1398–1405 (2004).

Dale, H. H. The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and Their Relation to Muscarine. J Pharmacol Exp Ther 6, 147–190 (1914).

Dale, H., Hallett. Memorable experiences in research. Diabetes 3, 17–27 (1954).

Dani, J. A. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. Biol Psychiatry 49, 166–174 (2001).

Dani, J. A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. Int Rev Neurobiol 124, 3–19 (2015).

Dautan, D. et al. A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. J Neurosci 34, 4509–4518 (2014).

Dautan, D. et al. Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. Nat Neurosci 19, 1025–1033 (2016).

De Biasi, M. & Dani, J. A. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. Annu Rev Neurosci 34, 105–130 (2011).

De Biasi, M. & Salas, R. Influence of neuronal nicotinic receptors over nicotine addiction and withdrawal. Exp Biol Med (Maywood) 233, 917–929 (2008).

de Wit, H. & Phillips, T. J. Do initial responses to drugs predict future use or abuse? Neuroscience & Biobehavioral Reviews 36, 1565–1576 (2012).

DeGroot, S. R. et al. Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. Biological Psychiatry 88, 855–866 (2020).

Deneris, E. S., Connolly, J., Rogers, S. W. & Duvoisin, R. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Trends in Pharmacological Sciences 12, 34–40 (1991).

DeNoble, V. J. & Mele, P. C. Intravenous nicotine self-administration in rats: effects of mecamylamine, hexamethonium and naloxone. Psychopharmacology (Berl) 184, 266–272 (2006).

Di Chiara, G. & Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 5274–5278 (1988).

Di Chiara, G. et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. Neuropharmacology 47 Suppl 1, 227–241 (2004).

Donovick, P. J., Burright, R. G. & Zuromski, E. Localization of quinine aversion within the septum, habenula, and interpeduncular nucleus of the rat. Journal of Comparative and Physiological Psychology 71, 376–383 (1970).

Donthamsetti, P. C. et al. Optical Control of Dopamine Receptors Using a Photoswitchable Tethered Inverse Agonist. J Am Chem Soc 139, 18522–18535 (2017).

Durand-de Cuttoli, R. et al. Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. eLife 7, e37487 (2018).

Durand-de Cuttoli, R., Mondoloni, S. & Mourot, A. Dissection optique du rôle des récepteurs nicotiniques neuronaux à l'aide de récepteurs photo-contrôlables. Biologie Aujourd'hui 211, 173–188 (2017).

Eddine, R. et al. A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. Sci Rep 5, 8184 (2015).

el-Bizri, H. & Clarke, P. B. Blockade of nicotinic receptor-mediated release of dopamine from striatal synaptosomes by chlorisondamine administered *in vivo*. Br J Pharmacol 111, 414–418 (1994).

Ewins, A. J. Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. Biochem J 8, 44–49 (1914).

Exley, R. et al. Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit α4 and subunit α6 to the reinforcing effects of nicotine. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7577–7582 (2011).

Faure, P., Tolu, S., Valverde, S. & Naudé, J. Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. Neuroscience 282, 86–100 (2014).

Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W. & Lester, R. A. J. Influence of Subunit Composition on Desensitization of Neuronal Acetylcholine Receptors at Low Concentrations of Nicotine. J. Neurosci. 17, 5747–5759 (1997).

Fernandez, S. P. et al. Mesopontine cholinergic inputs to midbrain dopamine neurons drive stress-induced depressive-like behaviors. Nat Commun 9, 4449 (2018).

File, S. E., Kenny, P. J. & Ouagazzal, A. M. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. Behav Neurosci 112, 1423–1429 (1998).

Fischbach-Weiss, S., Reese, R. M. & Janak, P. H. Inhibiting Mesolimbic Dopamine Neurons Reduces the Initiation and Maintenance of Instrumental Responding. Neuroscience 372, 306–315 (2018).

Forget, B. et al. A Human Polymorphism in CHRNA5 Is Linked to Relapse to Nicotine Seeking in Transgenic Rats. Current Biology 28, 3244-3253.e7 (2018).

Fornasiero, E. F. et al. Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. Nat Commun 9, 4230 (2018).

Forster, G. L. & Blaha, C. D. Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. Eur J Neurosci 12, 3596–3604 (2000).

Fowler, C. D. & Kenny, P. J. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. Neuropharmacology 76, 533–544 (2014).

Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J. & Kenny, P. J. Habenular α5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. Nature 471, 597–601 (2011).

Frahm, S. et al. An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. eLife 4, e11396 (2015).

Frahm, S. et al. Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of β4 and α5 Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. Neuron 70, 522–535 (2011).

Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. Zeitschrift für Zellforschung 65, 573–596 (1965).

Gallego, X., Cox, R. J., Laughlin, J. R., Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. Alternative CHRNB4 3'-UTRs mediate the allelic effects of SNP rs1948 on gene expression. PLoS One 8, e63699 (2013).

Garcia-Rivas, V. & Deroche-Gamonet, V. Not all smokers appear to seek nicotine for the same reasons: implications for preclinical research in nicotine dependence. Addict Biol 24, 317–334 (2019).

GBD 2015 Tobacco Collaborators. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet 389, 1885–1906 (2017).

Gentry, C. L., Wilkins, L. H. & Lukas, R. J. Effects of Prolonged Nicotinic Ligand Exposure on Function of Heterologously Expressed, Human α4β2- and α4β4-Nicotinic Acetylcholine Receptors. J Pharmacol Exp Ther 304, 206–216 (2003).

Girault, J.-A. & Greengard, P. The Neurobiology of Dopamine Signaling. Archives of Neurology 61, 641–644 (2004).

Glassman, A. H. et al. Smoking, smoking cessation, and major depression. JAMA 264, 1546–1549 (1990).

Gonon, F. G. Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by *in vivo* electrochemistry. Neuroscience 24, 19–28 (1988).

Goodwin, A. K., Hiranita, T. & Paule, M. G. The Reinforcing Effects of Nicotine in Humans and Nonhuman Primates: A Review of Intravenous Self-Administration Evidence and Future Directions for Research. Nicotine & Tobacco Research 17, 1297–1310 (2015).

Görlich, A. et al. Reexposure to nicotine during withdrawal increases the pacemaking activity of cholinergic habenular neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 17077–17082 (2013).

Gotti, C. et al. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. Biochemical Pharmacology 74, 1102–1111 (2007).

Gotti, C., Zoli, M. & Clementi, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. Trends in Pharmacological Sciences 27, 482–491 (2006).

Govind, A. P., Vezina, P. & Green, W. N. Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: Underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. Biochemical Pharmacology 78, 756–765 (2009).

Grabus, S. D., Martin, B. R., Brown, S. E. & Damaj, M. I. Nicotine place preference in the mouse: influences of prior handling, dose and strain and attenuation by nicotinic receptor antagonists. Psychopharmacology 184, 456–463 (2006).

Grace, A. A. & Bunney, B. S. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. J Neurosci 4, 2877–2890 (1984).

Grace, A. A. & Bunney, B. S. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. J Neurosci 4, 2866–2876 (1984).

Grace, A. A. & Onn, S. P. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded *in vitro*. J Neurosci 9, 3463–3481 (1989).

Grady, S. R. et al. Rodent Habenulo-Interpeduncular Pathway Expresses a Large Variety of Uncommon nAChR Subtypes, But Only the 3 4 and 3 3 4 Subtypes Mediate Acetylcholine Release. Journal of Neuroscience 29, 2272–2282 (2009).

Grenhoff, J., Aston-Jones, G. & Svensson, T. H. Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. Acta Physiologica Scandinavica 128, 351–358 (1986).

Grieder, T. E. et al. Deletion of α5 nicotine receptor subunits abolishes nicotinic aversive motivational effects in a manner that phenocopies dopamine receptor antagonism. European Journal of Neuroscience 46, 1673–1681 (2017).

Grieder, T. E. et al. CRF neurons in the ventral tegmental area control the aversive effects of nicotine withdrawal and promote escalation of nicotine intake. Nat Neurosci 17, 1751–1758 (2014).

Groenewegen, H. J., Ahlenius, S., Haber, S. N., Kowall, N. W. & Nauta, W. J. H. Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. Journal of Comparative Neurology 249, 65–102 (1986).

Grundey, J. et al. Nicotine modulates human brain plasticity via calcium-dependent mechanisms. J Physiol 596, 5429–5441 (2018).

Hajnal, A., Pothos, E. N., Lénárd, L. & Hoebel, B. G. Effects of feeding and insulin on extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. Brain Res 785, 41–48 (1998).

Harrington, L. et al. Role of β4* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo–Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. Neuropsychopharmacol 41, 1790–1802 (2016).

Harris, A. C. et al. Non-nicotine constituents in e-cigarette aerosol extract attenuate nicotine's aversive effects in adolescent rats. Drug and Alcohol Dependence 203, 51–60 (2019).

Harvey, D. M. et al. Nicotine serves as an effective reinforcer of intravenous drug-taking behavior in human cigarette smokers. Psychopharmacology (Berl) 175, 134–142 (2004).

Hemmendinger, L. M. & Moore, R. Y. Interpeduncular nucleus organization in the rat: Cytoarchitecture and histochemical analysis. Brain Research Bulletin 13, 163–179 (1984).

Henningfield, J. E., Miyasato, K. & Jasinski, D. R. Cigarette smokers self-administer intravenous nicotine. Pharmacology Biochemistry and Behavior 19, 887–890 (1983).

Herkenham, M. & Nauta, W. J. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. J Comp Neurol 173, 123–146 (1977).

Hikosaka, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. Nat Rev Neurosci 11, 503–513 (2010).

Houser, C. R. Cholinergic synapses in the central nervous system: studies of the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. J Electron Microsc Tech 15, 2–19 (1990).

Hsu, Y.-W. A. et al. Medial Habenula Output Circuit Mediated by 5 Nicotinic Receptor-Expressing GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus. Journal of Neuroscience 33, 18022–18035 (2013).

Hsu, Y.-W. A. et al. Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. J Neurosci 34, 11366–11384 (2014).

Hucho, F. & Changeux, J. P. Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from Electrophorus electricus electric tissue. FEBS Lett 38, 11–15 (1973).

Hughes, J. R. & Hatsukami, D. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. Arch Gen Psychiatry 43, 289–294 (1986).

Husson, M. et al. β4-Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. J Neurosci 40, 3465–3477 (2020).

Hyland, B. I., Reynolds, J. N. J., Hay, J., Perk, C. G. & Miller, R. Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. Neuroscience 114, 475–492 (2002).

Imperato, A., Mulas, A. & Di Chiara, G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. European Journal of Pharmacology 132, 337–338 (1986).

Ishibashi, M., Leonard, C. S. & Kohlmeier, K. A. Nicotinic activation of laterodorsal tegmental neurons: implications for addiction to nicotine. Neuropsychopharmacology 34, 2529–2547 (2009).

Jackson, K. J. et al. Role of α5 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Pharmacological and Behavioral Effects of Nicotine in Mice. J Pharmacol Exp Ther 334, 137–146 (2010).

Jensen, K. P. et al. A CHRNA5 Smoking Risk Variant Decreases the Aversive Effects of Nicotine in Humans. Neuropsychopharmacol 40, 2813–2821 (2015).

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

Kauer, J. A. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci 8, 844–858 (2007).

Kawai, H., Lazar, R. & Metherate, R. Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. Nat Neurosci 10, 1168–1175 (2007).

Kawaja, M. D., Flumerfelt, B. A. & Hrycyshyn, A. W. Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the rat interpeduncular nucleus: A light and electron microscope investigation. Neuroscience 30, 741–753 (1989).

Kemp, G. & Morley, B. J. Ganglionic nAChRs and high-affinity nicotinic binding sites are not equivalent. FEBS Letters 205, 265–268 (1986).

Klemm, W. R. Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. Med Sci Monit 10, RA261-273 (2004).

Klenowski, P. M., Zhao-Shea, R., Freels, T. G., Molas, S. & Tapper, A. R. Dynamic activity of interpeduncular nucleus GABAergic neurons controls expression of nicotine withdrawal in male mice. Neuropsychopharmacol. 47, 641–651 (2022).

Klink, R., d'Exaerde, A. de K., Zoli, M. & Changeux, J.-P. Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei. J. Neurosci. 21, 1452–1463 (2001).

Koob, G. F. & Le Moal, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363, 3113–3123 (2008).

Kramer, R. H., Mourot, A. & Adesnik, H. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. Nature Neuroscience 16, 816–823 (2013).

Kutlu, M. G. & Gould, T. J. Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. Biochemical Pharmacology 97, 498–511 (2015).

Lammel, S. et al. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. Neuron 57, 760–773 (2008).

Lammel, S., Lim, B. K. & Malenka, R. C. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. Neuropharmacology 76 Pt B, 351–359 (2014).

Lammel, S. et al. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. Nature 491, 212–217 (2012).

Lanciego, J. L., Luquin, N. & Obeso, J. A. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a009621 (2012).

Laplante, F., Stevenson, C. W., Gratton, A., Srivastava, L. K. & Quirion, R. Effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats on stress-induced acetylcholine release in the prefrontal cortex. Journal of Neurochemistry 91, 1473–1482 (2004).

Lasser, K. et al. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. JAMA 284, 2606–2610 (2000).

Laviolette, S. R. Dopamine Modulation of Emotional Processing in Cortical and Subcortical Neural Circuits: Evidence for a Final Common Pathway in Schizophrenia? Schizophr Bull 33, 971–981 (2007).

Laviolette, S. R. & van der Kooy, D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nat Rev Neurosci 5, 55–65 (2004).

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

Le Novère, N. & Changeux, J. P. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. J Mol Evol 40, 155–172 (1995).

Le Novère, N., Corringer, P.-J. & Changeux, J.-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. Journal of Neurobiology 53, 447–456 (2002).

Lecourtier, L. & Kelly, P. H. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. Neurosci Biobehav Rev 31, 658–672 (2007).

Lenn, N. J. & Hamill, G. S. Subdivisions of the interpeduncular nucleus: A proposed nomenclature. Brain Research Bulletin 13, 203–204 (1984).

Lester, H. A. et al. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. AAPS J 11, 167–177 (2009).

Leventhal, A. M. et al. Association of Electronic Cigarette Use With Initiation of Combustible Tobacco Product Smoking in Early Adolescence. JAMA 314, 700–707 (2015).

Leventhal, A. M. & Zvolensky, M. J. Anxiety, Depression, and Cigarette Smoking: A Transdiagnostic Vulnerability Framework to Understanding Emotion-Smoking Comorbidity. Psychol Bull 141, 176–212 (2015).

Li, X. et al. Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences 115, 415–420 (2018).

Lima, L. B. et al. Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei: L IMA ET AL . J Comp Neurol 525, 2411–2442 (2017).

Lin, W.-C. et al. Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. ACS Chem Biol 9, 1414–1419 (2014).

Lipton, D. M., Gonzales, B. J. & Citri, A. Dorsal Striatal Circuits for Habits, Compulsions and Addictions. Frontiers in Systems Neuroscience 13, (2019).

Liu, C. et al. An inhibitory brainstem input to dopamine neurons encodes nicotine aversion. Neuron (2022a) doi:10.1016/j.neuron.2022.07.003.

Liu, C. et al. An action potential initiation mechanism in distal axons for the control of dopamine release. Science 375, 1378–1385 (2022b).

Lodge, D. J. & Grace, A. A. The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 5167–5172 (2006).

Mameli-Engvall, M. et al. Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors. Neuron 50, 911–921 (2006).

Mangold, J. E., Payne, T. J., Ma, J. Z., Chen, G. & Li, M. D. Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans. Journal of Medical Genetics 45, 578–582 (2008).

Mansvelder, H. D., Keath, J. R. & McGehee, D. S. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. Neuron 33, 905–919 (2002).

Mansvelder, H. D. & McGehee, D. S. Long-Term Potentiation of Excitatory Inputs to Brain Reward Areas by Nicotine. Neuron 27, 349–357 (2000).

Mark, G. P., Rada, P. V. & Shors, T. J. Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. Neuroscience 74, 767–774 (1996).

Marks, M. J., Burch, J. B. & Collins, A. C. Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. J Pharmacol Exp Ther 226, 817–825 (1983).

Maskos, U. The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. British Journal of Pharmacology 153, S438–S445 (2008).

Maskos, U. et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature 436, 103–107 (2005).

Matta, S. G. et al. Guidelines on nicotine dose selection for *in vivo* research. Psychopharmacology 190, 269–319 (2007).

McKendrick, G. & Graziane, N. M. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. Front. Behav. Neurosci. 14, 582147 (2020).

McLaughlin, I., Dani, J. A. & De Biasi, M. The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. J. Neurochem. 142, 130–143 (2017).

Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. Cell Commun Signal 11, 34 (2013).

Melroy-Greif, W. E., Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use: nAChRs: age effects on upregulation and drug use. Genes, Brain and Behavior 15, 89–107 (2016).

Metzger, M. et al. Habenular connections with the dopaminergic and serotonergic system and their role in stress-related psychiatric disorders. Eur J Neurosci 53, 65–88 (2021).

Meye, F. J., Lecca, S., Valentinova, K. & Mameli, M. Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. Front Hum Neurosci 7, 860 (2013).

Millar, N. S. & Gotti, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology 56, 237–246 (2009).

Mirrione, M. M. et al. Increased metabolic activity in the septum and habenula during stress is linked to subsequent expression of learned helplessness behavior. Front Hum Neurosci 8, 29 (2014).

Mohebi, A. et al. Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. Nature 570, 65–70 (2019).

Molas, S. et al. A circuit-based mechanism underlying familiarity signaling and the preference for novelty. Nat Neurosci 20, 1260–1268 (2017a).

Molas, S., DeGroot, S. R., Zhao-Shea, R. & Tapper, A. R. Anxiety and Nicotine Dependence: Emerging Role of the Habenulo-Interpeduncular Axis. Trends in Pharmacological Sciences 38, 169–180 (2017b).

Montagu, K. A. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. Nature 180, 244–245 (1957).

Morales, M. & Margolis, E. B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. Nat Rev Neurosci 18, 73–85 (2017).

Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M. & Hibbs, R. E. X-ray structure of the human α4β2 nicotinic receptor. Nature 538, 411–415 (2016).

Morel, C. et al. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. Mol Psychiatry 19, 930–936 (2014).

Morton, G. et al. Chrna5-Expressing Neurons in the Interpeduncular Nucleus Mediate Aversion Primed by Prior Stimulation or Nicotine Exposure. J. Neurosci. 38, 6900–6920 (2018).

Mulle, C., Vidal, C., Benoit, P. & Changeux, J. P. Existence of different subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in the rat habenulo-interpeduncular system. J. Neurosci. 11, 2588–2597 (1991).

Murphy, C. A., DiCamillo, A. M., Haun, F. & Murray, M. Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. Behavioural Brain Research 81, 43–52 (1996).

Nair-Roberts, R. G. et al. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. Neuroscience 152, 1024–1031 (2008).

Naudé, J. et al. Dopamine Builds and Reveals Reward-Associated Latent Behavioral Attractors. 2022.07.07.499108 Preprint at https://doi.org/10.1101/2022.07.07.499108 (2022).

Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C. H., Zhou, Y. & Lindstrom, J. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol 63, 332–341 (2003).

Nguyen, C. et al. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. Neuron 109, 2604-2615.e9 (2021).

Olds, J. & Milner, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. J Comp Physiol Psychol 47, 419–427 (1954).

Otsu, Y. et al. Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. Science 366, 250–254 (2019).

Otsu, Y. et al. Functional Principles of Posterior Septal Inputs to the Medial Habenula. Cell Reports 22, 693–705 (2018).

Ouagazzal, A.-M., Kenny, P. J. & File, S. E. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. Psychopharmacology 144, 54–60 (1999).

Palmatier, M. I. et al. Dissociating the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine using a rat self-administration paradigm with concurrently available drug and environmental reinforcers. Psychopharmacology 184, 391–400 (2006).

Paoletti, P., Ellis-Davies, G. C. R. & Mourot, A. Optical control of neuronal ion channels and receptors. Nat Rev Neurosci 20, 514–532 (2019).

Parikh, V., Kozak, R., Martinez, V. & Sarter, M. Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. Neuron 56, 141–154 (2007).

Passlick, S., Thapaliya, E. R., Chen, Z., Richers, M. T. & Ellis-Davies, G. C. R. Optical probing of acetylcholine receptors on neurons in the medial habenula with a novel caged nicotine drug analogue: nAChR-mediated $Ca^{2+}$ signalling in medial habenula neurons. J Physiol 596, 5307–5318 (2018).

Pérez-Morales, R. et al. CHRNA3 rs1051730 and CHRNA5 rs16969968 polymorphisms are associated with heavy smoking, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease in a mexican population. Ann Hum Genet 82, 415–424 (2018).

Perry, D. C., Dávila-García, M. I., Stockmeier, C. A. & Kellar, K. J. Increased Nicotinic Receptors in Brains from Smokers: Membrane Binding and Autoradiography Studies. J Pharmacol Exp Ther 289, 1545–1552 (1999).

Perry, D. C. et al. Measuring nicotinic receptors with characteristics of alpha4beta2, alpha3beta2 and alpha3beta4 subtypes in rat tissues by autoradiography. J Neurochem 82, 468–481 (2002).

Picciotto, M. R. et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. Nature 391, 173–177 (1998).

Picciotto, M. R. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. Trends Pharmacol Sci 24, 493–499 (2003).

Picciotto, M. R., Brunzell, D. H. & Caldarone, B. J. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression: Neuroreport 13, 1097–1106 (2002).

Picciotto, M. R., Higley, M. J. & Mineur, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. Neuron 76, 116–129 (2012).

Picciotto, M. R., Lewis, A. S., van Schalkwyk, G. I. & Mineur, Y. S. Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: a potential pathway to modulate aggression and related behavioral states. Neuropharmacology 96, 235–243 (2015).

Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T. & Dani, J. A. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. Nature 390, 401–404 (1997).

Pidoplichko, V. I. et al. Nicotinic Cholinergic Synaptic Mechanisms in the Ventral Tegmental Area Contribute to Nicotine Addiction. Learn Mem 11, 60–69 (2004).

Poewe, W. et al. Parkinson disease. Nat Rev Dis Primers 3, 1–21 (2017).

Pogun, S. & C Collins, A. Oral Nicotine Self-Administration in Rodents. J Addict Res Ther 01, (2012).

Poulin, J.-F. et al. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. Nat Neurosci 21, 1260–1271 (2018).

Quick, M. W. & Lester, R. A. J. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. J Neurobiol 53, 457–478 (2002).

Quina, L. A., Harris, J., Zeng, H. & Turner, E. E. Specific connections of the interpeduncular subnuclei reveal distinct components of the habenulopeduncular pathway: QUINA et al. Journal of Comparative Neurology 525, 2632–2656 (2017).

Ranft, K. et al. Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. Psychol Med 40, 557–567 (2010).

Rapier, C., Lunt, G. G. & Wonnacott, S. Nicotinic Modulation of [3H]Dopamine Release from Striatal Synaptosomes: Pharmacological Characterisation. Journal of Neurochemistry 54, 937–945 (1990).

Ren, J. et al. Habenula "Cholinergic" Neurons Corelease Glutamate and Acetylcholine and Activate Postsynaptic Neurons via Distinct Transmission Modes. Neuron 69, 445–452 (2011).

Rice, M. E. & Cragg, S. J. Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. Nat Neurosci 7, 583–584 (2004).

Risinger, F. O. & Oakes, R. A. Nicotine-induced conditioned place preference and conditioned place aversion in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 51, 457–461 (1995).

Risner, M. E. & Goldberg, S. R. 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 (1983).

Roeper, J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. Trends Neurosci 36, 336–342 (2013).

Rossi, S., Singer, S., Shearman, E., Sershen, H. & Lajtha, A. The Effects of Cholinergic and Dopaminergic Antagonists on Nicotine-Induced Cerebral Neurotransmitter Changes. Neurochem Res 30, 541–558 (2005).

Russo, S. J. & Nestler, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. Nat Rev Neurosci 14, 609–625 (2013).

Saccone, S. F. et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. Human Molecular Genetics 16, 36–49 (2007).

Salas, R., Sturm, R., Boulter, J. & De Biasi, M. Nicotinic Receptors in the Habenulo-Interpeduncular System Are Necessary for Nicotine Withdrawal in Mice. Journal of Neuroscience 29, 3014–3018 (2009).

Salas, R., Pieri, F. & De Biasi, M. Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. J Neurosci 24, 10035–10039 (2004).

Salas, R., Pieri, F., Fung, B., Dani, J. A. & De Biasi, M. Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. J Neurosci 23, 6255–6263 (2003).

Sarter, M. & Parikh, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. Nat Rev Neurosci 6, 48–56 (2005).

Sartor, C. E. et al. Initial Response to Cigarettes Predicts Rate of Progression to Regular Smoking: Findings from an Offspring-of-Twins Design. Addict Behav 35, 771–778 (2010).

Savitz, J. B. et al. Habenula volume in bipolar disorder and major depressive disorder: a high-resolution magnetic resonance imaging study. Biol Psychiatry 69, 336–343 (2011).

Schultz, W. Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey. J Neurophysiol 56, 1439–1461 (1986).

Schultz, W., Dayan, P. & Montague, P. R. A neural substrate of prediction and reward. Science 275, 1593–1599 (1997).

Schultz, W. Multiple dopamine functions at different time courses. Annu Rev Neurosci 30, 259–288 (2007).

Schultz, W. Recent advances in understanding the role of phasic dopamine activity. F1000Res 8, F1000 Faculty Rev-1680 (2019).

Schwartz, R. D., Lehmann, J. & Kellar, K. J. Presynaptic nicotinic cholinergic receptors labeled by [3H]acetylcholine on catecholamine and serotonin axons in brain. J Neurochem 42, 1495–1498 (1984).

Schwartz, R. D. & Kellar, K. J. Nicotinic Cholinergic Receptor Binding Sites in the Brain: Regulation *in Vivo*. Science 220, 214–216 (1983).

Seamans, J. K. & Yang, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. Prog Neurobiol 74, 1–58 (2004).

Semenova, S., Contet, C., Roberts, A. J. & Markou, A. Mice Lacking the β4 Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Show Memory Deficits, Altered Anxiety- and Depression-Like Behavior, and Diminished Nicotine-Induced Analgesia. Nicotine Tob Res 14, 1346–1355 (2012).

Sheffield, E. B., Quick, M. W. & Lester, R. A. Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression and channel function in medial habenula neurons. Neuropharmacology 39, 2591–2603 (2000).

Shen, J. & Yakel, J. L. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. Acta Pharmacol Sin 30, 673–680 (2009).

Shibata, H. & Suzuki, T. Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study. Brain Research 296, 345–349 (1984).

Shih, P.-Y. et al. Differential Expression and Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Subdivisions of Medial Habenula. Journal of Neuroscience 34, 9789–9802 (2014).

Ślimak, M. A. et al. Habenular expression of rare missense variants of the β4 nicotinic receptor subunit alters nicotine consumption. Front. Hum. Neurosci. 8, (2014).

Soria-Gómez, E. et al. Habenular CB1 Receptors Control the Expression of Aversive Memories. Neuron 88, 306–313 (2015).

Srinivasan, R. et al. Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. J Gen Physiol 137, 59–79 (2011).

Stamatakis, A. M. et al. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis circuitry: Implications for addiction-related behaviors. Neuropharmacology 76 Pt B, 320–328 (2014).

Steidl, S. et al. Operant responding for optogenetic excitation of LDTg inputs to the VTA requires D1 and D2 dopamine receptor activation in the NAcc. Behav Brain Res 333, 161–170 (2017).

Steidl, S. & Veverka, K. Optogenetic excitation of LDTg axons in the VTA reinforces operant responding in rats. Brain Res 1614, 86–93 (2015).

Steidl, S., Wang, H., Ordonez, M., Zhang, S. & Morales, M. Optogenetic excitation in the ventral tegmental area of glutamatergic or cholinergic inputs from the laterodorsal tegmental area drives reward. Eur J Neurosci 45, 559–571 (2017).

Steiner, R. C., Heath, C. J. & Picciotto, M. R. Nicotine-induced phosphorylation of ERK in mouse primary cortical neurons: evidence for involvement of glutamatergic signaling and CaMKII: Nicotine-induced ERK phosphorylation in neurons. Journal of Neurochemistry 103, 666–678 (2007).

Stoker, A. K., Olivier, B. & Markou, A. Role of α7- and β4-containing nicotinic acetylcholine receptors in the affective and somatic aspects of nicotine withdrawal: studies in knockout mice. Behav Genet 42, 423–436 (2012).

Stolerman, I. P., Naylor, C., Elmer, G. I. & Goldberg, S. R. Discrimination and self-administration of nicotine by inbred strains of mice. Psychopharmacology (Berl) 141, 297–306 (1999).

Stuber, G. D., Hnasko, T. S., Britt, J. P., Edwards, R. H. & Bonci, A. Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. J. Neurosci. 30, 8229–8233 (2010).

Szijj, P. A., Bahou, C. & Chudasama, V. Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates. Drug Discov Today Technol 30, 27–34 (2018).

Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. & Changeux, J.-P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat Rev Drug Discov 8, 733–750 (2009).

Tansey, E. M. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. Comptes Rendus Biologies 329, 419–425 (2006).

Tapper, A. R. et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science 306, 1029–1032 (2004).

Thompson, R. Interpeduncular Nucleus and Avoidance Conditioning in the Rat. Science 132, 1551–1553 (1960).

Thomsen, M. & Caine, S. B. Intravenous drug self-administration in mice: practical considerations. Behav Genet 37, 101–118 (2007).

Thornton, E. W., Murray, M., Connors-Eckenrode, T. & Haun, F. Dissociation of behavioral changes in rats resulting from lesions of the habenula versus fasciculus retroflexus and their possible anatomical substrates. Behavioral Neuroscience 108, 1150–1162 (1994).

Tidey, J. W. & Miller, M. E. Smoking cessation and reduction in people with chronic mental illness. BMJ 351, h4065 (2015).

Tochitsky, I. et al. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nature Chemistry 4, 105–111 (2012).

Tolu, S. et al. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. Mol Psychiatry 18, 382–393 (2013).

Tritsch, N. X., Oh, W.-J., Gu, C. & Sabatini, B. L. Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. eLife 3, e01936 (2014).

Tritsch, N. X., Ding, J. B. & Sabatini, B. L. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. Nature 490, 262–266 (2012).

Trudeau, L.-E. et al. The multilingual nature of dopamine neurons. Prog Brain Res 211, 141–164 (2014).

Tsai, H.-C. et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. Science 324, 1080–1084 (2009).

Ungless, M. A. & Grace, A. A. Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. Trends Neurosci 35, 422–430 (2012).

Velasquez, K. M., Molfese, D. L. & Salas, R. The role of the habenula in drug addiction. Front. Hum. Neurosci. 8, (2014).

Venniro, M., Banks, M. L., Heilig, M., Epstein, D. H. & Shaham, Y. Improving translation of animal models of addiction and relapse by reverse translation. Nat Rev Neurosci 21, 625–643 (2020).

Volgraf, M. et al. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. Nat Chem Biol 2, 47–52 (2006).

Vorspan, F., Mehtelli, W., Dupuy, G., Bloch, V. & Lépine, J.-P. Anxiety and substance use disorders: co-occurrence and clinical issues. Curr Psychiatry Rep 17, 4 (2015).

Wagner, F., Stroh, T. & Veh, R. W. Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria: Subnuclear organization of the mouse habenula. J. Comp. Neurol. 522, 2650–2662 (2014).

Wang, Q. et al. The Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework: A 3D Reference Atlas. Cell 181, 936-953.e20 (2020).

Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A. & Uchida, N. Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. Neuron 74, 858–873 (2012).

Weber, M., David-Pfeuty, T. & Changeux, J. P. Regulation of binding properties of the nicotinic receptor protein by cholinergic ligands in membrane fragments from Torpedo marmorata. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 3443–3447 (1975).

Wess, J. Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. Trends in Pharmacological Sciences 24, 414–420 (2003).

Wills, L. et al. Neurobiological Mechanisms of Nicotine Reward and Aversion. Pharmacol Rev 74, 271–310 (2022).

Wittchen, H.-U. DSM-III-R Generalized Anxiety Disorder in the National Comorbidity Survey. Arch Gen Psychiatry 51, 355 (1994).

Wolfman, S. L. et al. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. Nat Commun 9, 2710 (2018).

Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. Trends in Neurosciences 20, 92–98 (1997).

Wonnacott, S., Kaiser, S., Mogg, A., Soliakov, L. & Jones, I. W. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. European Journal of Pharmacology 393, 51–58 (2000).

Woolf, N. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. Progress in Neurobiology 37, 475–524 (1991).

World Health Organization (WHO). WHO report on the global tobacco epidemic, 2021: addressing new and emerging products. (2021).

Xiao, C. et al. Cholinergic Mesopontine Signals Govern Locomotion and Reward Through Dissociable Midbrain Pathways. Neuron 90, 333–347 (2016).

Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T. & Nakanishi, S. Distinct Roles of Segregated Transmission of the Septo-Habenular Pathway in Anxiety and Fear. Neuron 78, 537–544 (2013).

Yamaguchi, T., Sheen, W. & Morales, M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. Eur J Neurosci 25, 106–118 (2007).

Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A. & Zahm, D. S. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. Neuroscience 282, 23–48 (2014).

Zhang, J. et al. Presynaptic Excitation via GABA B Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. Cell 166, 716–728 (2016).

Zhao-Shea, R. et al. Increased CRF signalling in a ventral tegmental area-interpeduncular nucleus-medial habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. Nat Commun 6, 6770 (2015).

Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P. D. & Tapper, A. R. Activation of GABAergic Neurons in the Interpeduncular Nucleus Triggers Physical Nicotine Withdrawal Symptoms. Current Biology 23, 2327–2335 (2013).

Zhou, F.-M., Wilson, C. & Dani, J. A. Muscarinic and Nicotinic Cholinergic Mechanisms in the Mesostriatal Dopamine Systems. Neuroscientist 9, 23–36 (2003).

Zoli, M., Pistillo, F. & Gotti, C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. Neuropharmacology 96, 302–311 (2015).

# Annexe

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

Claire Nguyen, Sarah Mondoloni, Tinaïg Le Borgne, Ines Centeno, Maxime Come, Joachim Jehl, Clément Solié, Lauren M. Reynolds, Romain Durand-de Cuttoli, Stefania Tolu, Sébastien Valverde, Steve Didienne, Bernadette Hannesse, Jean-Francois Fiancette, Stéphanie Pons, Uwe Maskos, Véronique Deroche-Gamonet, Deniz Dalkara, Jean-Pierre Hardelin, Alexandre Mourot, Fabio Marti* et Philippe Faure* (*co-derniers auteurs)

**Neuron**, 2021.

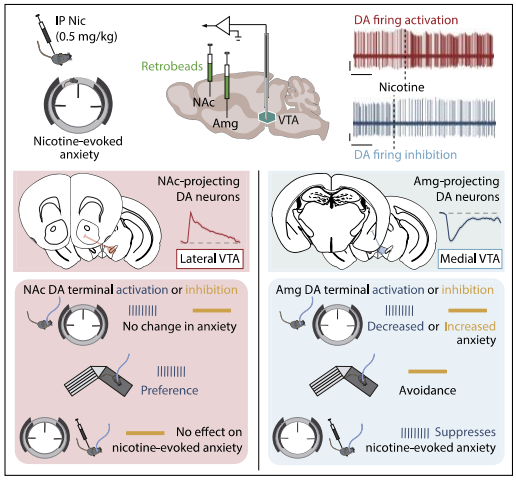
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013

Neuron

Article

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

## Graphical abstract




## Highlights

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


## Authors

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

## Correspondence

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



## In brief

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


Nguyen et al., 2021, Neuron *109*, 2604–2615
August 18, 2021 © 2021 Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013

CellPress

CellPress

Neuron

Article

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

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

[1]ESPCI, Laboratoire de plasticité du cerveau UMR8249, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France
[2]Sorbonne Université, Inserm, UMR8246 CNRS, Neuroscience Paris Seine – IBPS, 75005 Paris, France
[3]Neurocentre Magendie, Inserm U1215, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France
[4]Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Département de neuroscience, 75724 Paris Cedex, France
[5]Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France
[6]These authors contributed equally
[7]Lead contact
*Correspondence: fabio.marti@upmc.fr (F.M.), phfaure@gmail.com (P.F.)
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013

## SUMMARY

Nicotine stimulates dopamine (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) to establish and maintain reinforcement. Nicotine also induces anxiety through an as yet unknown circuitry. We found that nicotine injection drives opposite functional responses of two distinct populations of VTA DA neurons with anatomically segregated projections: it activates neurons that project to the nucleus accumbens (NAc), whereas it inhibits neurons that project to the amygdala nuclei (Amg). We further show that nicotine mediates anxiety-like behavior by acting on β2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors of the VTA. Finally, using optogenetics, we bidirectionally manipulate the VTA-NAc and VTA-Amg pathways to dissociate their contributions to anxiety-like behavior. We show that inhibition of VTA-Amg DA neurons mediates anxiety-like behavior, while their activation prevents the anxiogenic effects of nicotine. These distinct subpopulations of VTA DA neurons with opposite responses to nicotine may differentially drive the anxiogenic and the reinforcing effects of nicotine.

## INTRODUCTION

Nicotine is the principal addictive component that drives continued tobacco use. The initiation of addiction involves the mesocorticolimbic dopamine (DA) system, which contributes to the processing of rewarding stimuli during the overall shaping of successful behaviors (Schultz, 2007). Addictive drugs such as nicotine are assumed to hijack the mechanisms of reinforcement learning, leading to an overvaluation of the drug reward at the expense of natural rewards. Although drug-induced reinforcement learning generally involves an increase in extracellular DA concentration in the nucleus accumbens (NAc), the underlying molecular and cellular mechanisms are drug dependent (Changeux, 2010; Di Chiara and Imperato, 1988; Luscher, 2016). Nicotine exerts its reinforcing effects through the direct activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), a family of pentameric ligand-gated ion channels (Changeux et al., 1998), expressed on midbrain DA and GABA neurons, thus increasing the activity of both neuronal populations (Maskos et al., 2005; Morel et al., 2014; Tolu et al., 2013). Cell-type-specific optogenetic manipulations have confirmed that DA cell activation is sufficient to drive the transition toward addiction and established causal links between DA neuron activation and drug-adaptive behaviors (Pascoli et al., 2015). However, such a view does not take into account the heterogeneity of midbrain DA neurons and the possibility that different messages can be transmitted in parallel from DA neurons of the ventral tegmental area (VTA). Indeed, VTA DA neurons belong to anatomically distinct circuits, differ in their molecular features, and show diverse responses to external stimuli (Lammel et al., 2008; Poulin et al., 2018). DA neurons transmit signals related not only to salience and reward but also to aversive stimuli (Brischoux et al., 2009; de Jong et al., 2019), including the "negative" effects of nicotine at high doses (Grieder et al., 2010, 2019). However, how DA neurons simultaneously drive opposite outcomes in response to the same stimuli remains unclear. Although the vast majority of research groups that have examined nicotine-evoked responses have reported homogeneous activation of DA neurons and an increase in DA release in their projection areas (Di Chiara and

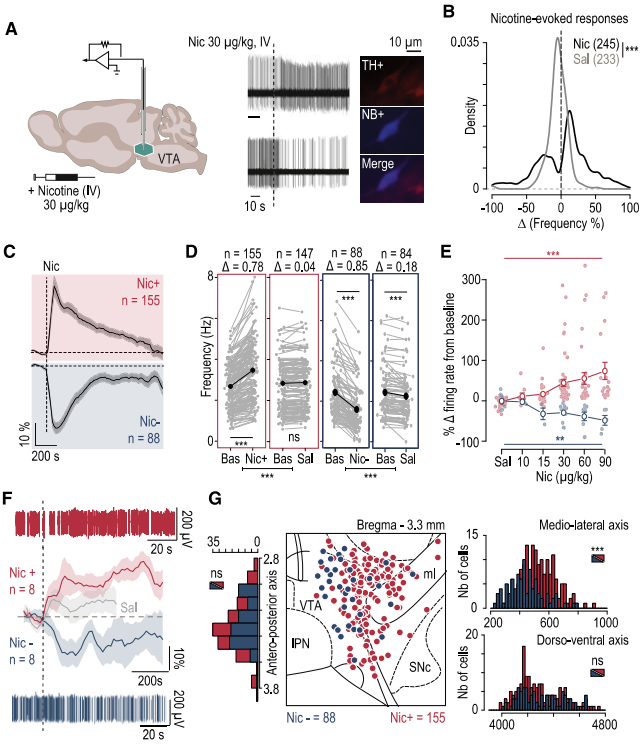



**Figure 1. Nicotine injection evokes opposing responses in distinct VTA DA neuron populations**

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

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

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

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

(E) Dose-response curves in Nic+ (red) and Nic− (blue) DA neurons. Responses to different doses of nicotine (0, 10, 15, 30, 60, and 90 µg/kg, with n = 48, 9, 27, 51, 33, and 17 for activated neurons and n = 11, 3, 3, 12, 9, and 5 for inhibited neurons) are expressed as percentage of variation from baseline. Neurons are classified as activated or inhibited on the basis of their response to the injection of at least 30 µg/kg nicotine (one-way ANOVA for dose effect: Nic+, $F_{[5, 179]} = 7.54$, ***p < 0.001; Nic−, $F_{[5, 37]} = 4.78$, **p = 0.002).

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

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

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

## RESULTS

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

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

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

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

We next asked whether these two populations were anatomically segregated. NB-filled cell bodies of each responding neuron (n = 243) were positioned onto mouse brain atlas plates (Paxinos and Franklin, 2004) (Figure S3) to study their anatomical location. As illustrated by a single atlas plate schematic (bregma − 3.3 mm), anatomical coordinates suggest that the inhibited neurons were located more medially within the VTA than the activated neurons, independently of their anteroposterior or dorsoventral positions (Figure 1G).

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

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

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

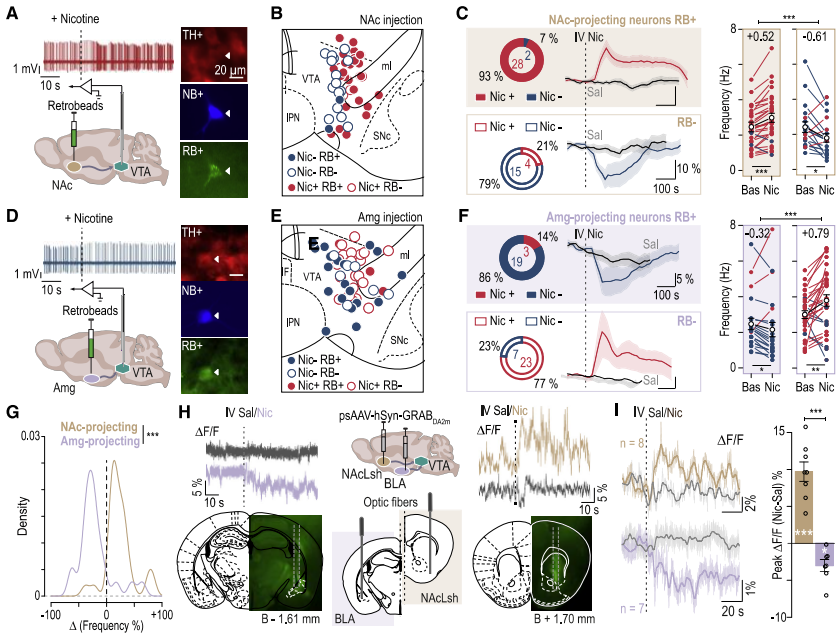



**Figure 2. VTA DA neuron populations activated or inhibited by nicotine belong to anatomically segregated projection pathways**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## The anxiogenic effect of nicotine requires β2-subunit-containing nAChR in the VTA

We next asked whether these two distinct DA sub-circuits are associated with different behavioral outcomes after an acute injection of nicotine. Nicotine is known to have rewarding properties, which require the activation of VTA DA neurons (Durand-de Cuttoli et al., 2018; Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013). However, nicotine can also induce negative outcomes such as anxiety-like behaviors and stress-induced depressive-like states (Kutlu and Gould, 2015; Morel et al., 2018; Picciotto and Mineur, 2013), for which the underlying circuitry remains elusive. We hypothesized that the activation and inhibition of the different DA neuron pathways have distinct roles in nicotine-induced behavior. We first aimed to establish the role of the VTA in the anxiogenic effects of acute nicotine exposure. To this end, mice were placed in an elevated O maze (EOM) after an acute injection of either saline or nicotine (intraperitoneal [i.p.], 0.5 mg/kg, injected 1 min before the test), and we found that nicotine, but not saline, reduced exploration of the open arms over time (Figure 3A; see Figure S7A for individual data). Mice that received nicotine injections also showed fewer entries into the open arms (Figure S7A), and this anxiety-like phenotype was not related to a detectable effect of nicotine on locomotor activity in an open field (OF; Figure S7B). Next, to probe the specific role of the VTA in this anxiogenic effect, we locally infused nicotine into this brain region (Figure S7C) 1 min before the EOM test, using bilaterally implanted cannulas. As with i.p. injections, we found that the infusion of nicotine, but not saline, directly into the VTA decreased exploration of the EOM open arms over time (Figure 3B; see Figure S7D for individual data). Finally, we assessed the involvement of VTA β2 subunit-containing nAChR (β2*nAChR) in the anxiogenic effect of nicotine, as nicotine-evoked responses have been shown to be mediated mainly by β2*nAChR present on the soma of both DA and VTA GABA neurons (Tolu et al., 2013). *In vivo* juxtacellular recordings of VTA DA neurons in mutant mice lacking the β2 subunit of nAChR ($\beta2^{-/-}$ mice) demonstrated the absence of a response to nicotine injection (Figure 3C, left). Lentiviral re-expression of the β2 subunit selectively in the VTA of $\beta2^{-/-}$ mice ($\beta2^{-/-}$Vec mice) globally restored the response to nicotine injection (Figure 3C; Figure S8), allowing the reemergence of nicotine-induced increases or decreases in DA neuron firing (Figure 3C, left). Regarding behavior, $\beta2^{-/-}$ mice were insensitive to the anxiogenic effect of nicotine injection in the EOM test, and lentiviral re-expression of β2 in the VTA ($\beta2^{-/-}$Vec mice) restored this effect (Figure 3D; see Figure S7G for individual data). Together, these results indicate that the anxiogenic effect of an acute nicotine injection requires signaling through β2*nAChR in the VTA but do not allow us to conclude whether the activation and/or inhibition of specific VTA DA neuron populations is required.

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

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

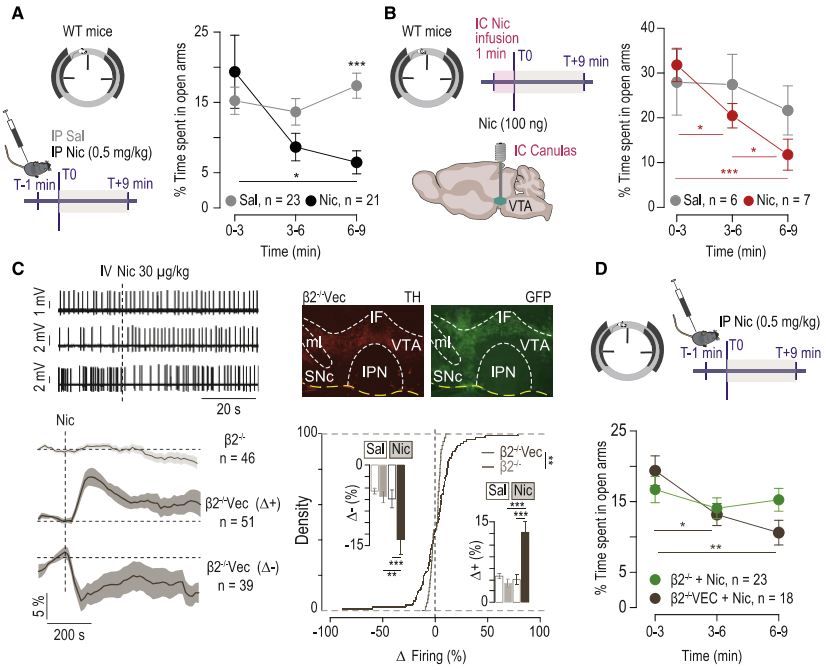



**Figure 3. β2-subunit-containing nAChRs mediate VTA DA neuron responses to nicotine injection and nicotine-induced anxiety-like behavior**

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

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

(C) Top left: representative juxtacellular recording traces of VTA DA neurons in mice lacking the β2 nAChR subunit ($\beta2^{-/-}$) and in $\beta2^{-/-}$-vectorized mice, in which the β2 subunit has been virally re-expressed together with a GFP marker in the VTA ($\beta2^{-/-}$Vec). Bottom left: individual and mean responses (expressed as percentage of firing frequency variation) indicate that there were no Nic-evoked responses in VTA DA neurons of $\beta2^{-/-}$ mice (n = 46 cells from 12 mice) and that both Nic-evoked activation (n = 51 cells from 18 mice) and inhibition (n = 39 cells from 19 mice) of VTA DA neurons were restored in $\beta2^{-/-}$Vec mice. Top right: immunofluorescence for TH and GFP on $\beta2^{-/-}$Vec mice. Bottom right: cumulative distribution of Nic-evoked response amplitude of VTA DA neurons in $\beta2^{-/-}$ mice (n = 46 cells from 12 mice; gray) and $\beta2^{-/-}$Vec mice (n = 90 cells from 24 mice; black) (Kolmogorov-Smirnov test, **p = 0.008). Bar plots show the maximum firing variation induced by Nic (filled bars) and saline (unfilled bars) in the two groups. Nic injection did not alter the firing frequency of VTA DA neurons in $\beta2^{-/-}$ mice, but it induced a significant increase (mean 12.45 ± 13.37) or decrease (mean −13.16 ± 16.31) in the firing frequency of VTA DA neurons in β2Vec mice compared with saline (***p < 0.001,***p < 0.001 or ***p < 0.001, **p = 0.005; Wilcoxon paired test with Bonferroni corrections).

(D) EOM test after i.p. Nic injection (0.5 mg/kg) in a control group of $\beta2^{-/-}$ mice, some of which were sham-transduced with GFP in the VTA (see STAR Methods; $\beta2^{-/-}$, n = 23) and in $\beta2^{-/-}$Vec mice (n = 18). Re-expression of β2 subunit in the VTA ($\beta2^{-/-}$Vec) restored the nicotine-evoked anxiogenic effects in the EOM test, which was absent in the $\beta2^{-/-}$ mice (two-way RM ANOVA: treatment × time interaction, $F_{[2, 78]} = 3.43$, *p = 0.04; main time effect, $F_{[2, 78]} = 6.87$, **p = 0.002; post hoc Student's t test with Bonferroni corrections: **p = 0.003 for 3 versus 9 min, *p = 0.03 for 3 versus 6 min, p = 0.2 for 6 versus 9 min; post hoc Student's t test: $\beta2^{-/-}$ and $\beta2^{-/-}$GFP versus $\beta2^{-/-}$Vec mice at 9 min, p = 0.06). Results are plotted as mean ± S.E.M.

(Tolu et al., 2013), we decided to manipulate the two populations of DA neurons independently, using optogenetics. DAT-Cre mice expressing CatCh, Jaws (Figure S9), or YFP with no opsin (Figures S10A and S10B) were implanted in the BLA (Figure S10C) or in the NAcLSh (Figure S10D) to restrict the effects of the optogenetic stimulation to DA terminals within that region.

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

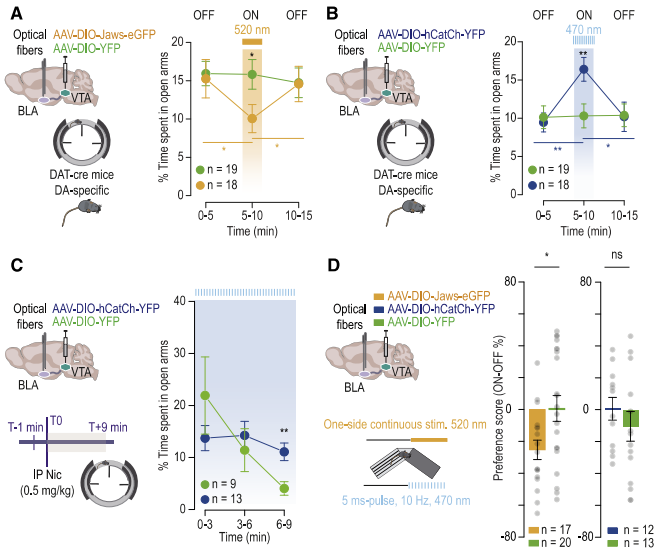



**Figure 4. Inhibition of BLA-projecting DA neurons drives anxiety-like behavior but not place preference**

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

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

(C) Left: AAVs for Cre-dependent expression of CatCh (blue; n = 13) or YFP (green; n = 9) were injected into the VTA of DAT-Cre mice, and optical fibers were placed in the BLA. Nicotine (Nic; 0.5 mg/kg) was injected intraperitoneally (i.p.) 1 min before the 9 min elevated O maze (EOM) test. Right: percentage of time spent in the EOM open arms for mice stimulated in the BLA throughout the test at 10 Hz, 5 ms light pulses after i.p. nicotine injection (two-way RM ANOVA: main effect of time, $F_{[2, 40]} = 4.92$, $^*p = 0.01$; time × opsin interaction, $F_{[2, 40]} = 3.74$, $^*p = 0.03$; post hoc Student's t test for CatCh versus YFP mice at 9 min: $^{**}p = 0.006$).

(D) Preference score in a 20 min real-time place preference (RTPP) test defined by the percentage of time spent in the compartment in which animals are photo-stimulated compared with the compartment in which they are not (ON-OFF). Optical inhibition of the VTA-BLA pathway (orange; n = 17 mice) induced online place avoidance compared with the control mice (YFP, green; n = 20) (Student's t test, $^*p = 0.017$). Mice with optical activation of the VTA-BLA pathway (blue; n = 12) did not display any difference compared with the control mice (YFP, green; n = 13) (Student's t test, p = 0.5). Results are plotted as mean ± S.E.M.

controls, photo-inhibiting DA neuron terminals in the BLA of Jaws-expressing mice reduced the percentage of time spent in the open arms of the EOM (Figure 4A; see Figure S11A for individual data). There were also no detectable effects of the light stimulation on the number of entries in the open arms (Figures S11A and S11B) or on locomotor activity (Figure S11C). Conversely, photo-activating DA terminals in the BLA of CatCh-expressing mice increased the percentage of time spent in the open arms of the EOM in comparison with mice expressing YFP (Figure 4B; see Figure S11B for individual data). Moreover, we also noticed that the position of the animal at the onset of the stimulation did not affect any of the behavior observed in the EOM (Figures S11A and S11B). To determine whether the anxiogenic effect observed during inhibition of DA neuron terminals in the BLA was specific to the BLA nucleus, we used another group of wild-type (WT) mice injected with either Jaws or GFP in the VTA and implanted bilateral optical fibers either in the BLA or in the CeA (Figures S12A and S12B). We found that optogenetically inhibiting VTA neuron terminals in Jaws-expressing WT mice decreased the percentage of time spent in the open arms of the EOM when optical fibers were implanted in the BLA, but not when they were implanted in the CeA (Figures S12C and S12D). There was not a detectable effect of stimulation on locomotor activity in an OF (Figures S12E and S12F). We next asked whether optogenetically activating the terminals of BLA-projecting VTA DA neurons could prevent the anxiogenic effect of nicotine injection. DAT-Cre mice expressing CatCh or YFP only in the VTA received an i.p. injection of nicotine 1 min before the EOM test and received light stimulation in the BLA throughout the 9 min test. Indeed, we found that the light-evoked activation of BLA terminals of DA neurons during the EOM test abolished the anxiogenic effect of the nicotine injection, as the percentage of time spent by CatCh-expressing mice in the EOM open arms did not decrease during the test and was significantly higher in these mice than in YFP-expressing controls during the last 3 min period of the test (Figure 4C). We next explored the behavioral outcome of manipulating the terminals of BLA-projecting VTA DA neurons on motivational valence by using a real-time place preference (RTPP) paradigm. Photo-inhibiting DA terminals in the BLA resulted in a significant avoidance for the compartment where animals were photo-stimulated, in keeping with our previous findings that inhibition of this pathway produces an anxiogenic effect in the EOM test, while photo-activating these terminals had no behavioral effect (Figure 4D). Inhibition of BLA-projecting VTA DA neurons therefore plays a central role in mediating the anxiogenic effect of nicotine.

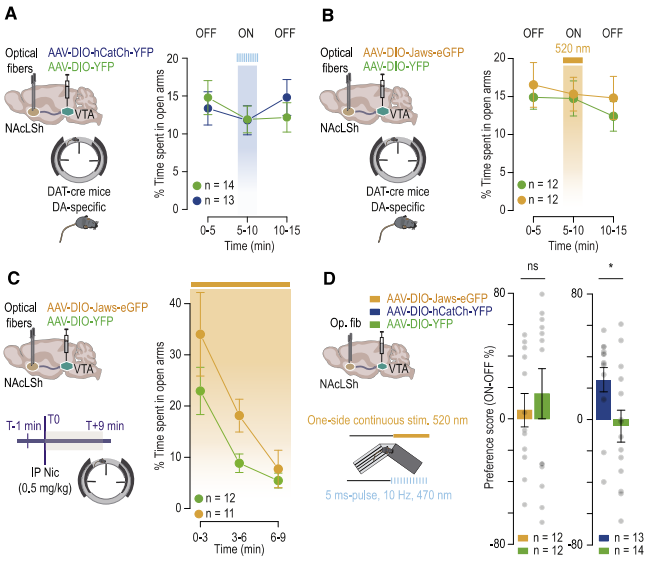



**Figure 5. Activation of NAcLSh-projecting VTA DA neurons drives real-time place preference behavior but has no effect on anxiety-like behavior**

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

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

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

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

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

DA in the NAc has been suggested to be involved in the modulation of anxiety-like behavior (Radke and Gewirtz, 2012; Zarrindast et al., 2012). We thus next assessed whether NAc-projecting neurons also participate in the anxiogenic effects of acute nicotine administration. We examined the behavioral outcome of optogenetic manipulations of DA neuron terminals in the NAc during the EOM test. Light-evoked activation (CatCh-expressing mice; Figure 5A) or inhibition (Jaws-expressing mice; Figure 5B) of DA neuron terminals in the NAcLSh had no effect on the time spent in the open arms of the EOM (see Figures S13A and S13B for individual data). There was also no detectable effect of the light stimulation on the number of entries in the open arms (Figures S13A and S13B) or on locomotor activity (Figure S13C). Moreover, the position of the animal at the onset of the stimulation did not reveal any impact on the behavior observed in the EOM (Figures S13A and S13B). Selectively inhibiting NAcLSh DA terminals using Jaws produced a slight change in basal anxiety levels but, more important, did not attenuate the anxiogenic effect of nicotine in the EOM test, as the drug reduced the exploration of the open arms over time in both control and opsin group (Figure 5C). NAcLSh-projecting VTA DA neurons are therefore not involved in mediating the anxiogenic effect of nicotine. In contrast, activation of DA neuron terminals in the NAcLSh induced significant place preference in the RTPP protocol, indicating that stimulating this pathway is rewarding (Figure 5D). Because medial and lateral NAc areas have different functional roles (de Jong et al., 2019), we further investigated the effect of optogenetic modulation of VTA neuron terminals in the NAcMSh in a separate group of WT mice (Figure S14A). Stimulating these terminals produced an increased number of entries and time spent in the EOM open arms, but this likely results from an increase of locomotor activity, as the distance traveled in an OF was likewise increased (Figures S14B and S14C). Inhibiting these terminals produced a slight decrease in basal anxiety levels but did not induce behavioral change in the EOM test nor prevented the reduction of time spent in open arms over time induced by nicotine (Figures S14B and S14D). Finally, we did not observe a significant effect of activating or inhibiting these terminals on the place preference score in the RTPP (Figure S14E). Our results thus demonstrate that NAcMSh and NAcLSh projections of VTA DA neurons are not involved in the nicotine-induced anxiety-like behavior observed in the EOM test.

## DISCUSSION

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

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

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

Although intrinsic differences may still exist, it is also possible that the emergence of either nicotine-evoked activation or inhibition of these neurons by nicotine arises from network dynamics. Nicotine's primary action is to activate nAChR, which are well-characterized ligand-gated cation channels and cause neuronal depolarization. Within the VTA, nicotine directly activates both DA and GABA neurons, which both express nAChR (Klink et al., 2001; Tolu et al., 2013). In particular, β2*nAChR of the VTA neurons are key mediators of the reinforcement effects of nicotine, as previously shown by re-expressing the β2 subunit of nAChR locally in the VTA of $\beta2^{-/-}$ mice (Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013) or by rendering β2*nAChR insensitive to nicotine using light (Durand-de Cuttoli et al., 2018). Here, we show that β2*nAChR of VTA neurons are also required to evoke, after systemic nicotine injection, the anxiogenic properties of nicotine as well as the inhibition of the subpopulation of DA neurons projecting to Amg. Therefore, nicotine acting through β2* nAChR activates VTA GABAergic interneurons and DA neurons projecting to the NAc, while concurrently inhibiting DA neurons projecting to the Amg. The inhibitory effect of nicotine may be mediated by inhibition through local DA release (Eddine et al., 2015), although no difference in D2R-mediated inhibitory postsynaptic currents or in DA reuptake between NAcMSh-projecting and BLA-projecting DA neurons has been reported (Ford et al., 2006). Alternatively, it could involve either local (interneurons) or long-range GABAergic inhibition of the Amg-projecting DA neuron subpopulation primarily, which is compatible with the recent demonstration of distinct inhibitory networks resulting in specific feedback loops between VTA and NAc sub-regions (Yang et al., 2018).

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

(Grieder et al., 2012), and β2*nAChR have been shown to be necessary for both the aversive and rewarding effects of nicotine by a strategy of β2 subunit re-expression in DA and GABAergic neurons of the VTA in $\beta2^{-/-}$ mice (Grieder et al., 2019). However, the mechanism underlying these opposite effects of the drug has not yet been established. Here, we show that activation of β2*nAChR of VTA neurons is necessary for nicotine to inhibit Amg-projecting DA neurons and induce anxiety-like behavior. This indicates that VTA signaling is critically involved in the acute anxiogenic effect of nicotine and suggests that it could also mediate aversion to nicotine. Our experiments also demonstrate that inhibition of the VTA to Amg DA pathway allows the expression of anxiety-like behavior and that a reduction of this inhibition relieves nicotine-induced anxiety-like behavior. These experiments strongly suggest a driving role for the inhibition of this pathway in nicotine-induced anxiety behavior, yet they do not exclude the possibility that other pathways also transmit the anxiogenic effect of nicotine.

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

## STAR★METHODS

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


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


### SUPPLEMENTAL INFORMATION

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


### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to France Lam and the imaging platform facility (Institut de Biologie Paris-Seine [IBPS]), the animal facilities (IBPS), Victor Gorgievski for behavioral data acquisition, and Jérémie Naudé for technical and statistical advice. We are grateful to the Yulong Li laboratory (Peking University) for providing us with $GRAB_{DA}$ sensor plasmids. We are grateful to Mélissa Desrosiers, Camille Robert, and the AAV production facility of Paris Vision Institute for viral production and purification. This work was supported by Centre national de la recherche scientifique (CNRS; UMR 8246), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm; U1130), Fondation pour la recherche médicale (FRM; DEQ2013326488 to P.F., FDT201904008060 to S.M., ECO20 1806006688 to J.J., and SPF202005011922 to C.S.), French National Cancer Institute grants TABAC-16-022 and TABAC-19-020 (to P.F.), French state funds managed by Agence Nationale de la Recherche (ANR-16 Nicostress to P.F., ANR-19 Vampire to F.M.), and LabEx Bio-Psy (to P.F. and a doctoral fellowship to C.N.). L.M.R. was supported by a National Institute on Drug Abuse (NIDA)-Inserm Postdoctoral Drug Abuse Research Fellowship. P.F. and U.M. are members of LabEx Bio-Psy.


### AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

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

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: August 27, 2020
Revised: March 27, 2021
Accepted: June 9, 2021
Published: July 8, 2021

## REFERENCES

Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., and Baiker, A. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum. Gene Ther. Methods *23*, 18–28.

Balerio, G.N., Aso, E., and Maldonado, R. (2006). Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. Psychopharmacology (Berl.) *184*, 504–513.

Beier, K.T., Steinberg, E.E., DeLoach, K.E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X.J., Kremer, E.J., Malenka, R.C., and Luo, L. (2015). Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. Cell *162*, 622–634.

Beier, K.T., Gao, X.J., Xie, S., DeLoach, K.E., Malenka, R.C., and Luo, L. (2019). Topological organization of ventral tegmental area connectivity revealed by viral-genetic dissection of input-output relations. Cell Rep. *26*, 159–167.e6.

Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *106*, 4894–4899.

Changeux, J.-P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 389–401.

Changeux, J.-P., Bertrand, D., Corringer, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Léna, C., Le Novère, N., Marubio, L., Picciotto, M., and Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. Brain Res. Brain Res. Rev. *26*, 198–216.

Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A., and Samulski, R.J. (2007). Production of recombinant adeno-associated viral vectors. Curr. Protoc. Hum. Genet. *Chapter 12*, Unit 12.9.

Chuong, A.S., Miri, M.L., Busskamp, V., Matthews, G.A.C., Acker, L.C., Sørensen, A.T., Young, A., Klapoetke, N.C., Henninger, M.A., Kodandaramaiah, S.B., et al. (2014). Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. Nat. Neurosci. *17*, 1123–1129.

de Jong, J.W., Afjei, S.A., Pollak Dorocic, I., Peck, J.R., Liu, C., Kim, C.K., Tian, L., Deisseroth, K., and Lammel, S. (2019). A neural circuit mechanism for encoding aversive stimuli in the mesolimbic dopamine system. Neuron *101*, 133–151.e7.

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *85*, 5274–5278.

Doyon, W.M., Dong, Y., Ostroumov, A., Thomas, A.M., Zhang, T.A., and Dani, J.A. (2013). Nicotine decreases ethanol-induced dopamine signaling and increases self-administration via stress hormones. Neuron *79*, 530–540.

Durand-de Cuttoli, R., Mondoloni, S., Marti, F., Lemoine, D., Nguyen, C., Naudé, J., d'Izarny-Gargas, T., Pons, S., Maskos, U., Trauner, D., et al. (2018). Manipulating midbrain dopamine neurons and reward-related behaviors with light-controllable nicotinic acetylcholine receptors. eLife *7*, 15991.

Eddine, R., Valverde, S., Tolu, S., Dautan, D., Hay, A., Morel, C., Cui, Y., Lambolez, B., Venance, L., Marti, F., and Faure, P. (2015). A concurrent excitation and inhibition of dopaminergic subpopulations in response to nicotine. Sci. Rep. *5*, 8184.

Ford, C.P., Mark, G.P., and Williams, J.T. (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. J. Neurosci. *26*, 2788–2797.

Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular α5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. Nature *471*, 597–601.

Frahm, S., Ślimak, M.A., Ferrarese, L., Santos-Torres, J., Antolin-Fontes, B., Auer, S., Filkin, S., Pons, S., Fontaine, J.-F., Tsetlin, V., et al. (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of β4 and α5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. Neuron *70*, 522–535.

Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. J. Neurosci. *4*, 2877–2890.

Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. J. Neurosci. *4*, 2866–2876.

Grenhoff, J., Aston-Jones, G., and Svensson, T.H. (1986). Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. Acta Physiol. Scand. *128*, 351–358.

Grieder, T.E., Sellings, L.H., Vargas-Perez, H., Ting-A-Kee, R., Siu, E.C., Tyndale, R.F., and van der Kooy, D. (2010). Dopaminergic signaling mediates the motivational response underlying the opponent process to chronic but not acute nicotine. Neuropsychopharmacology *35*, 943–954.

Grieder, T.E., George, O., Tan, H., George, S.R., Le Foll, B., Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2012). Phasic D1 and tonic D2 dopamine receptor signaling double dissociate the motivational effects of acute nicotine and chronic nicotine withdrawal. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *109*, 3101–3106.

Grieder, T.E., Besson, M., Maal-Bared, G., Pons, S., Maskos, U., and van der Kooy, D. (2019). β2* nAChRs on VTA dopamine and GABA neurons separately mediate nicotine aversion and reward. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *116*, 25968–25973.

Khabou, H., Garita-Hernandez, M., Chaffiol, A., Reichman, S., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Bertin, S., Forster, V., Desrosiers, M., Winckler, C., et al. (2018). Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. JCI Insight *3*, D358.

Kleinlogel, S., Feldbauer, K., Dempski, R.E., Fotis, H., Wood, P.G., Bamann, C., and Bamberg, E. (2011). Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca2+-permeable channelrhodopsin CatCh. Nat. Neurosci. *14*, 513–518.

Klink, R., de Kerchove d'Exaerde, A., Zoli, M., and Changeux, J.P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. J. Neurosci. *21*, 1452–1463.

Kutlu, M.G., and Gould, T.J. (2015). Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. Biochem. Pharmacol. *97*, 498–511.

Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. Neuron *57*, 760–773.

Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. Nature *491*, 212–217.

Luscher, C. (2016). The emergence of a circuit model for addiction. Annu. Rev. Neurosci. *39*, 257–276.

Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T.H., Changeux, J.-P., and Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. Neuron *50*, 911–921.

Mansvelder, H.D., and McGehee, D.S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. Neuron *27*, 349–357.

Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. J. Neurosci. *28*, 8908–8913.

Margolis, E.B., Hjelmstad, G.O., Fujita, W., and Fields, H.L. (2014). Direct bidirectional μ-opioid control of midbrain dopamine neurons. J. Neurosci. *34*, 14707–14716.

Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature *436*, 103–107.

Mejias-Aponte, C.A., Ye, C., Bonci, A., Kiyatkin, E.A., and Morales, M. (2015). A subpopulation of neurochemically-identified ventral tegmental area dopamine neurons is excited by intravenous cocaine. J. Neurosci. *35*, 1965–1978.

Mineur, Y.S., Fote, G.M., Blakeman, S., Cahuzac, E.L.M., Newbold, S.A., and Picciotto, M.R. (2016). Multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the mouse amygdala regulate affective behaviors and response to social stress. Neuropsychopharmacology *41*, 1579–1587.

Molas, S., DeGroot, S.R., Zhao-Shea, R., and Tapper, A.R. (2017). Anxiety and nicotine dependence: emerging role of the habenulo-interpeduncular axis. Trends Pharmacol. Sci. *38*, 169–180.

Morales, M., and Margolis, E.B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. *18*, 73–85.

Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y.A., Marti, F., Lambolez, B., De Biasi, M., Lathrop, M., Fratta, W., Maskos, U., and Faure, P. (2014). Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. Mol. Psychiatry *19*, 930–936.

Morel, C., Fernandez, S.P., Pantouli, F., Meye, F.J., Marti, F., Tolu, S., Parnaudeau, S., Marie, H., Tronche, F., Maskos, U., et al. (2018). Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. Mol. Psychiatry *23*, 1597–1605.

Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., and Lüscher, C. (2015). Sufficiency of mesolimbic dopamine neuron stimulation for the progression to addiction. Neuron *88*, 1054–1066.

Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2004). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Gulf Professional Publishing).

Picciotto, M.R., and Mineur, Y.S. (2013). Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. Neuropharmacology *76*, 545–553.

Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K., and Changeux, J.P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. Nature *391*, 173–177.

Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. J. Neurosci. Methods *65*, 113–136.

Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., and Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. Nat. Neurosci. *21*, 1260–1271.

Radke, A.K., and Gewirtz, J.C. (2012). Increased dopamine receptor activity in the nucleus accumbens shell ameliorates anxiety during drug withdrawal. Neuropsychopharmacology *37*, 2405–2415.

Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. Annu. Rev. Neurosci. *30*, 259–288.

Su, M., Li, L., Wang, J., Sun, H., Zhang, L., Zhao, C., Xie, Y., Gamper, N., Du, X., and Zhang, H. (2019). Kv7.4 channel contribute to projection-specific autoinhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area. Front. Cell. Neurosci. *13*, 557.

Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S.F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., et al. (2018). A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. Cell *174*, 481–496.e19.

Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Tan, K., Feng, J., et al. (2020). New and improved GRAB fluorescent sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.03.28.013722.

Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., et al. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. Mol. Psychiatry *18*, 382–393.

Turiault, M., Parnaudeau, S., Milet, A., Parlato, R., Rouzeau, J.-D., Lazar, M., and Tronche, F. (2007). Analysis of dopamine transporter gene expression pattern—generation of DAT-iCre transgenic mice. FEBS J. *274*, 3568–3577.

Ungless, M.A., and Grace, A.A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. Trends Neurosci. *35*, 422–430.

Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S.K., Vamanrao, A., and Uchida, N. (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. Neuron *74*, 858–873.

Wolfman, S.L., Gill, D.F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J.G., Bruchas, M.R., and McGehee, D.S. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. Nat. Commun. *9*, 2710.

Yang, H., de Jong, J.W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H.S., and Lammel, S. (2018). Nucleus accumbens subnuclei regulate motivated behavior via direct inhibition and disinhibition of VTA dopamine subpopulations. Neuron *97*, 434–449.e4.

Zarrindast, M.R., Khalifeh, S., Rezayof, A., Rostami, P., Aghamohammadi Sereshki, A., and Zahmatkesh, M. (2012). Involvement of rat dopaminergic system of nucleus accumbens in nicotine-induced anxiogenic-like behaviors. Brain Res. *1460*, 25–32.

Zhao-Shea, R., Liu, L., Soll, L.G., Improgo, M.R., Meyers, E.E., McIntosh, J.M., Grady, S.R., Marks, M.J., Gardner, P.D., and Tapper, A.R. (2011). Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. Neuropsychopharmacology *36*, 1021–1032.

Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P.D., and Tapper, A.R. (2013). Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. Curr. Biol. *23*, 2327–2335.

Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J.A., Rayport, S., and Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. J. Neurosci. Methods *143*, 27–32.