



Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de
L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Faculté des Sciences de la Vie
Ecole Doctorale Vie et Santé

Doctorat en Neurosciences

Jennifer KAUFLING

**La queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale :
Un nouveau centre de contrôle des systèmes
dopaminergiques**

Thèse dirigée par le Dr. Michel BARROT

Soutenue publiquement le 26 février 2010

Devant le jury composé de :

Dr. Anne BEROD

Dr. Erwan BEZARD

Dr. Jean ZWILLER

Pr. Michel LE MOAL

Dr. Pierre VEINANTE

Dr. Michel BARROT

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Ce travail est dédié à Paulette Kaufling et à Elide Zanin
Deux femmes de poigne qui ont façonné ma vie

MERCI

Aux membres du jury

Je remercie le Professeur Michel Le Moal, ainsi que les Dr. Anne Berod, Erwan Bezard et Jean Zwiller qui ont accepté de consacrer de leur précieux temps à l'évaluation de ce travail.

Au Dr. Michel Barrot

Je dois te remercier pour tellement de choses que je ne saurais par quoi commencer et comment l'exprimer. Tu es en grande partie responsable de ce que je suis aujourd'hui, le bon comme le mauvais et j'espère que tu es fier de moi. En tout cas moi, avec un grand « M », je suis fière de te connaître. Merci pour tout, merci tout court.

Au Pr. Marie José Freund- Mercier

Je tiens tout d'abord à vous remercier pour vos enseignements. Je me souviendrai toujours des cours de physiologie de la reproduction en 2^{ème} année de fac, ce sont ces moments là qui ont les premiers guidé mes pas vers les neurosciences et qui plus tard m'ont donné envie de m'essayer au monitorat. Merci aussi pour votre présence, votre écoute et vos précieux conseils pendant toutes ces années de thèse.

Au Dr. Pierre Veinante

Mon maître Jedi de la neuroanatomie. Face à ton savoir immense, je serai toujours ton fidèle Padawan. Merci pour ta présence et ton calme pendant les moments de panique.

A la Barrot team :

Betty ma maman du labo: Merci pour ton aide si précieuse dans les manips mais aussi et surtout pour avoir pris soin de moi.

Les michelettes :

Malika : t'inquiète, je ne suis pas prête de t'oublier, on a encore beaucoup de chose à vivre ensemble!

Ipek : merci pour ton écoute et ton soutien sans jamais me juger.

Sophie : merci pour toutes ces années à tes côtés, des virées dans l'alsace du nord au fin fond de l'Allemagne...

Nada : merci pour avoir supporté mes sautes d'humeur dans le bureau sans jamais t'en plaindre.

Romain : merci pour ton enthousiasme et bonne chance pour la suite. Je ne me fais pas de soucis pour toi.

A tous ceux qui m'ont supportée au labo et plus particulièrement à Yohann, Luc-Henri, Vivianne, Nina, Stéphane, Raymonde, Perrine (ma confidente et amie), Pascal (merci pour toutes ces petites pauses), Jean-Luc (Mc Gyver qui m'a sauvé la mise plus d'une fois), Maya, Alex (mon ami et binôme de toujours)... merci à tous.

A mes amis chers à mon cœur,

Joëlle : Merci pour ton soutien et ton écoute au jour le jour, même par delà les distances tu restes ma fidèle amie.

Marie Jourdain : inoubliable et attachante, reste toujours telle que tu es, you are the best.

Julie, Marie-Alix et Caroline : Déjà 10 ans d'amitié sincère et fidèle, vous êtes mes racines.

Marie Kneib : hey petite sœur, accroche-toi, tu en vaux la peine.

Aurore : trépidante globe trotteuse au grand cœur.

Bien sûr je n'oublie pas **Les Doctoneuro** et surtout l'Estonie, ça restera dans les annales.

A Florent

Merci pour ton soutien si précieux, la vie est belle à tes côtés. Merci de partager ma vie ici et ailleurs.

Et enfin à mes parents Danielle Zanin et Jean-Paul Kaufling

Sans qui je ne serais pas là, pour la confiance et le soutien que vous m'avez toujours accordés. Ce travail est pour vous. Même si je ne l'exprime pas toujours comme il se devrait je vous aime et vous aimerai à jamais.

Enfin je dédie cette thèse à mes deux grands-mères. Où que vous soyez vous voyagez dans mon cœur à tout jamais.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
LISTE DES PUBLICATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	5
I) Neuroanatomie de l'aire tegmentale ventrale.....	7
A) Découverte de l'aire tegmentale ventrale.....	7
B) Aire tegmentale ventrale et aire dopaminergique A10.....	9
C) Subdivisions cytoarchitectoniques de l'aire tegmentale ventrale.....	10
1) Subdivisions classiques de l'aire tegmentale ventrale	10
2) Subdivisions de l'aire tegmentale ventrale selon Ikemoto.....	12
3) Les noyaux médians appartiennent-ils à l'aire tegmentale ventrale ?.....	12
D) connexions de l'aire tegmentale ventrale.....	14
1) Considérations relatives aux afférences à la VTA.....	20
2) Considérations relatives aux efférences de la VTA.....	20
3) Considérations anatomofonctionnelle.....	23
II) Neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale	24
A) Localisation et stéréologie	24
B) Patrons d'activité : tonique versus phasique	25
C) Existe-t-il une signature électrophysiologique des neurones dopaminergiques ?..	26
D) Régulation de l'activité des neurones dopaminergiques.....	28
III) Sous-divisions fonctionnelles de l'aire tegmentale ventrale : aire tegmentale antérieure versus aire tegmentale postérieure	32
A) Evidences comportementales.....	32
B) Mécanismes potentiels sous-tendant la dichotomie fonctionnelle aVTA/pVTA ...	35
IV) La queue de l'aire tegmentale ventrale.....	37
A) De l'expression de Δ FosB à la découverte de la tVTA.....	37
B) Un nouveau regard sur la bibliographie : évidences de l'existence de la tVTA....	38
V) Objectifs du doctorat.....	41
RESULTATS	43
Chapitre 1 : Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area	45

Chapitre 2 : Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons.	77
Chapitre 3 : Influence de la tVTA sur l'activité électrique des neurones dopaminergiques de la VTA.....	89
I) Introduction	89
II) Matériels et méthodes	90
A) Traitement des animaux	90
B) Protocole d'électrophysiologie.....	90
1) Electrodes.....	90
2) Dispositifs d'enregistrement et de stimulation	91
3) Descente des électrodes	93
4) Activité spontanée des neurones, identification des neurones dopaminergiques et stimulation de la tVTA.....	93
5) Marquage des sites d'enregistrement, de stimulation et injections juxtacellulaires.....	94
C) Analyse des données	95
1) Contrôles histologiques	95
2) Révélation en immunofluorescence	95
3) Iconographie	96
4) Analyse des données électrophysiologiques.....	99
III) Résultats	97
A) Caractérisation des neurones dopaminergiques	97
B) Contrôles histologiques	98
C) Influence d'une stimulation électrique de la tVTA	98
IV) Discussion.....	102
A) Limite méthodologique : l'identification des neurones dopaminergiques .	102
B) Contrôle de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la VTA	102
C) Contrôle de la tVTA sur les neurones non dopaminergiques de la VTA ...	103
D) Perspectives	104
Chapitre 4 : Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure	107
DISCUSSION GENERALE.....	139
I) Considérations méthodologiques relatives à l'utilisation de traceurs	141
A) Considérations relatives à l'utilisation des traceurs rétrogrades.....	141

B) Considérations relatives à l'utilisation d'un traceur antérograde.....	143
II) Historique : tVTA et RMTg, deux dénominations pour une même structure.....	144
A) Les deux faces d'une même pièce : tVTA vs. RMTg.....	144
B) Focus sur une projection : de l'habénula latérale à la tVTA/RMTg.....	145
C) Du recrutement de la tVTA : stimulant ou aversif ?	147
III) Rôle fonctionnel de la tVTA et de l'induction locale de FosB/ Δ FosB.....	149
A) Induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA par les psychostimulants	149
B) Conséquences fonctionnelles de l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA	153
1) Effet aigu (à court terme) de la cocaïne sur la tVTA.....	153
2) Effet chronique (à moyen ou long terme) de la cocaïne sur la tVTA	153
C) Autres aspects fonctionnels de la tVTA.....	155
IV) Considérations personnelles	166
A) La tVTA comme sous-région de la VTA.....	156
B) Communication GABAergique vs. monoaminergique.	158
C) La tVTA comme sur-contrôleur de la VTA, ou l'hypothèse phylogénique de la tVTA.....	160
V) Perspectives.....	161
REFERENCES.....	163

ABREVIATIONS

Abréviations neuroanatomiques

aVTA	aire tegmentale ventrale antérieure
CLi	noyau linéaire caudal
DR	raphé dorsal
IF	noyau interfasciculaire
IP	noyau interpédonculaire
LC	locus coeruleus
LDTg	noyau tegmental latérodorsal
LH	hypothalamus latéral
LHb	habénula latérale
ml	lemnisque médian
mp	péduncule mamillaire
NAc	noyau accumbens
PAG	aire périaqueducale
PBP	noyau parabrachial pigmentosus
PFC	cortex préfrontal
PFR	aire du réflexus parafasciculaire
PIF	noyau parainterfasciculaire de la VTA
PN	noyau paranigral
PPTg	noyau pédonculopontin
pVTA	aire tegmentale ventrale postérieure
RLi	noyau linéaire rostral
RMTg	noyau tegmental rostromédial
RRF	champ rétrosubstantiel
SNC	substance noire compacte
STh	noyau sub-thalamique
SuM	noyau supramamillaire
tVTA	queue de l'aire tegmentale ventrale
VTA	aire tegmentale ventrale
VTT	queue de l'aire tegmentale ventrale

Autres abréviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BDA	biotine dextran amine
CPBG	1-(m-chlorophényl)-biguanide
CTB	sous-unité bêta de la toxine cholérique
CREB	élément de réponse liant l'AMPc
FG	Fluoro-Gold®
GABA	acide gamma-amino butyrique
GAD	décarboxylase de l'acide glutamique
GHB	acide γ -hydroxybutyrique
HRP	péroxydase de raifort
mCREB	dominant négatif de CREB
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
MDMA	3,4-méthylènedioxyméthamphétamine
PA	potentiel d'action
PAF	paraformaldéhyde
PB	tampon phosphate
PBS	tampon phosphate salin
PBS-T	tampon phosphate salin avec triton
PCP	phencyclidine
PLC γ	phospholipase C γ
SFN	Society for Neuroscience
TH	tyrosine hydroxylase
THC	Δ 9-tétrahydrocannabinol
1DR	paradigme de tâche de récompense directionnelle

PUBLICATIONS

Ce travail a donné lieu à deux publications :

**Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009)
Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat.
J Comp Neurol 513:597-621.**

**Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010)
gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral
tegmental area innervate mesolimbic neurons.
Biol Psychiatry 67:88-92.**

À une publication en cours d'évaluation :

**Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera Antoine, Veinante P, Freund-
Mercier MJ, Barrot M. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of
the ventral tegmental area by acute drug exposure.**

À une étude en cours de réalisation :

**Kaufling J, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M.
Influence de la tVTA sur l'activité électrique des neurones dopaminergiques de la
VTA.**

Ainsi qu'à une publication issue d'une collaboration :

**Beetz N, Harrison MD, Brede M, Zong X, Urbanski MJ, Sietmann A, Kaufling J,
Barrot M, Seeliger MW, Vieira-Coelho MA, Hamet P, Gaudet D, Seda O,
Tremblay J, Kotchen TA, Kaldunski M, Nüsing R, Szabo B, Jacob HJ, Cowley
AW Jr, Biel M, Stoll M, Lohse MJ, Broeckel U, Hein L (2009).
Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced
hypertension in humans and mice.
J Clin Invest 119:3597-3612.**

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, il est rare de découvrir une région du système nerveux central qui n'ait pas encore été décrite au plan neuroanatomique et fonctionnel. Lors de mon doctorat, j'ai eu la chance d'étudier une telle région : la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA). En effet, lorsque que j'ai débuté ma thèse, peu de choses étaient connues sur cette région. Les seules informations dont nous disposions concernaient l'accumulation des facteurs de transcription FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques d'une zone directement postérieure à l'aire tegmentale ventrale (VTA), après traitement chronique par deux psychostimulants, la cocaïne et l'amphétamine, et par un antagoniste de la recapture de la dopamine (Perrotti et al., 2005). Cette région fut nommée la tVTA.

C'est dans ce contexte que j'ai d'abord caractérisé neuroanatomiquement la tVTA, pour ensuite porter une attention particulière sur son efférence majeure, à savoir la projection sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques. Durant ma thèse, j'ai également réalisé un criblage pharmacologique des drogues induisant FosB dans la tVTA.

Ces résultats me permettent de proposer aujourd'hui la tVTA comme un nouveau centre de contrôle des systèmes dopaminergiques. Cette découverte ouvre de nombreuses perspectives quant à l'implication fonctionnelle de la tVTA. En effet, en tant que modulatrice des systèmes dopaminergiques, cette région pourrait être impliquée dans tous les mécanismes où la dopamine joue un rôle ainsi que dans les pathologies associées, qu'ils s'agissent de troubles psychiatriques tels que la toxicomanie, les troubles de l'humeur ou la schizophrénie ou de troubles moteurs.

Pour traiter ce sujet, il me paraît indispensable de rappeler dans cette introduction les données principales concernant la neuroanatomie de la VTA, les neurones dopaminergiques qui la composent, la dichotomie fonctionnelle existant entre VTA antérieure (aVTA) et VTA postérieure (pVTA) mais également de regrouper les rares informations de la littérature relatives à la tVTA ainsi qu'à l'induction de facteurs de transcription dans cette région.

I) Neuroanatomie de l'aire tegmentale ventrale

A) Découverte de l'aire tegmentale ventrale

La première référence à la VTA est due à Tsai en 1925. Dans sa description du cerveau de l'opossum, il identifie à partir de coloration de Nissl et de Golgi, une région latérale au *nucleus interpeduncularis* (IP : noyau interpédonculaire) : le « *trigonum interpeduncular* ». Cette région est constituée par le *peduncularis corporis mamillaris* (mp : pédoncule mamillaire), le *lemniscus medialis* (ml : lemnisque médian) et le *nucleus tegmenti ventralis* (VTA : aire tegmentale ventrale) (Figure 1). Ce dernier noyau constitue la partie médiale du *trigonum interpeduncular* et s'étend du *pes pedunculi* (pédoncule cérébral) jusqu'à la pointe ventrale de la substance noire.

Kosaka et Hiraiwa en 1915 et Castaldi en 1923 pensaient que la nature fusiforme des cellules du *nucleus tegmenti ventralis* justifiait son appartenance à la substance noire. Le même désir de synthèse incita Hassler en 1937 à le nommer *nucleus niger suboculomotorius*. Tsai par contre n'était pas de cet avis. Pour lui, la petite taille des cellules ainsi que la proche relation avec les tractus *mamillo-* et *olfacto-tegmentalis* témoignaient du caractère anatomiquement et fonctionnellement spécifique du *nucleus tegmenti ventralis* (voir pour revue sur ces aspects historiques : Oades et Halliday, 1987). Toutefois, l'appartenance du *nucleus tegmentis ventralis* à la substance noire fut longtemps discutée à cause de l'hétérogénéité cytoarchitectonique de cette région et de la difficulté, chez les primates par rapport aux rongeurs, à la différencier de la substance noire compacte (SNC). Les travaux de Nauta dans les années 50 donneront finalement raison à Tsai en montrant notamment que certaines structures, dont l'hypothalamus latéral (LH), projettent à la VTA mais pas à la substance noire. L'aire tegmentale de Tsai fut ainsi pour la première fois citée par Nauta en 1958.

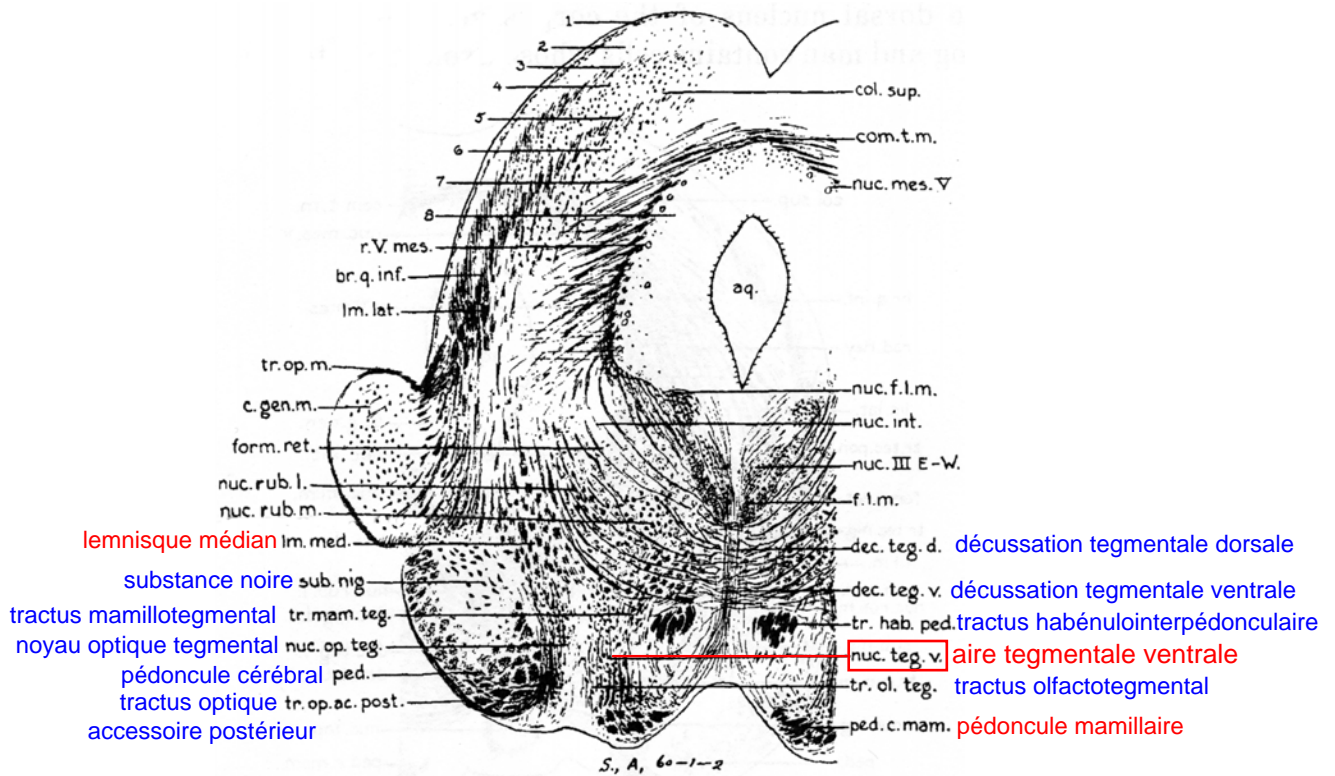


Figure 1 : Première représentation de l'aire tegmentale ventrale par Chiao Tsai en 1925. Reproduction de la figure 13 de l'article original : dessin d'une coupe frontale du mésencéphale de l'opossum. Les structures notées en rouge constituent le "*trigonum interpeduncular*". Pour faciliter la compréhension de ce dessin, les abréviations des structures proches de l'aire tegmentale ventrale ont été ajoutées selon la nomenclature actuelle.

B) Aire tegmentale ventrale et aire dopaminergique A10

La dopamine a été détectée pour la première fois dans le système nerveux central à la fin des années 50 (Montagu, 1957 ; Wei-Malherbe et Bone, 1957), puis dans des neurones en 1962 (Carlsson et al., 1962). Ces démonstrations ont mené à la classification des neurones dopaminergiques de la VTA dans le groupe A10 par Dahlström et Fuxe en 1964.

Les délimitations cytoarchitectoniques des structures cérébrales ne correspondent pas toujours à des groupes de neurones identiques neurochimiquement. Suite à ce constat, Dahlström et Fuxe, en 1964, ont déterminé une série de groupes sur la base de leur neurochimie. Ils ont ainsi décrit chez le rat 12 aires catécholaminergiques A1 à A12. Les aires A1 à A7 correspondent à des régions noradrénergiques et les aires A8 à A12 à des régions dopaminergiques ; depuis, 5 régions dopaminergiques supplémentaires (A13 à A17) ont été identifiées. Dans le mésencéphale, même si les neurones dopaminergiques sont en continuité, ils ont été classifiés en 3 régions : A8 correspond au champ rétrosubstantiel (RRF), A9 à la SNC et A10 à la VTA. L'aire A10 est distinguée des 2 autres sur la base des afférences spécifiques de la VTA, notamment décrites par Nauta (voir pour revue : Ikemoto, 2007). Nauta et ses collègues ont donc fortement influencé la manière dont les noyaux dopaminergiques ont été définis dans le mésencéphale par Dahlström et Fuxe. C'est ainsi que pour Dahlström et Fuxe et leurs contemporains, VTA était synonyme d'aire A10 même si *stricto sensu* l'aire A10 est uniquement constituée des neurones dopaminergiques de la VTA. Par la suite, il y a toujours eu une influence réciproque entre les notions de VTA et d'aire dopaminergique A10.

En 1984, Hökfelt et collaborateurs ont tenté d'étendre la définition de l'aire dopaminergique A10 en y incluant les neurones dopaminergiques du noyau supramammillaire (SuM), de l'habénula latérale (LHb), du raphé dorsal (DR) et de l'aire périaqueducule (PAG). Cette distinction originale séparant les notions de VTA et d'aire A10 n'a pas été acceptée et n'est aujourd'hui plus usitée.

C) Subdivisions cytoarchitectoniques de l'aire tegmentale ventrale

Des sous-divisions de la VTA ont été définies de façon soit neuroanatomique, soit fonctionnelle ou anatomo-fonctionnelle. Historiquement, c'est d'abord une division cytoarchitectonique sur la base de l'hétérogénéité de la morphologie et de l'orientation des corps cellulaires des neurones de la VTA et de leurs neurites qui a été établie. Les distinctions sur des bases plus fonctionnelles et comportementales sont venues bien plus tardivement.

1) Subdivisions classiques de l'aire tegmentale ventrale

Historiquement, c'est Phillipson, qui dans 3 études publiées en 1979 subdivise chez le rat la VTA de Tsai en 5 noyaux (Phillipson, 1979a-c) (Figure 2). Grâce à des colorations de Golgi, on distingue ainsi 2 noyaux latéraux. Riches en neurones dopaminergiques, ce sont les noyaux paranigral (PN) et parabrachial pigmentosus (PBP). On les retrouve sur quasiment toute l'étendue antéropostérieure de la VTA. Dans la zone juste adjacente à la portion antérolatérale du noyau interpedunculaire (IP) on trouve le PN. Les limites du PBP sont plus floues à définir. Cette sous-région de la VTA se place dorsalement puis dorsolatéralement au noyau PN selon le niveau d'antéropostériorité. Elle constitue également la limite latérale de la VTA avec la substance noire. Le PN est majoritairement composé de corps cellulaires de taille moyenne de type fusiforme et de plus petites cellules prolongées de 2 à 4 dendrites épineux. Les corps cellulaires d'un des types neuronaux du PBP sont similaires à ceux des neurones fusiformes que l'on trouve dans le feuillet le plus dorsal de la SNC. Les autres neurones du PBP ont un corps cellulaire globulaire de taille moyenne prolongé de nombreux dendrites radiaux.

Selon Phillipson (Phillipson, 1979a-c), la VTA comprend également 3 noyaux médians : le noyau interfasciculaire (IF), le noyau linéaire rostral (RLi) et le noyau linéaire caudal (CLi). L'IF, dorsal à l'IP, s'étend sur toute l'antéropostériorité de la VTA. Il est surplombé dans sa partie antérieure par le RLi et dans sa partie postérieure par le CLi. Ces noyaux médians sont pauvres en neurones dopaminergiques. L'IF est composé des cellules les plus petites de la VTA, rondes et regroupées en paquets. Le RLi contient les cellules les plus grandes de la VTA alors que celles du CLi sont un peu plus petites.

Cette division architectonique de la VTA en 5 sous-régions est encore valide actuellement, mais de nombreuses autres sont proposées dont celle récemment publiée par Ikemoto (Ikemoto, 2007) (pour revue sur les sous-divisions de la VTA : Halliday et Törk 1986 ; Oades et Halliday 1987 ; Fallon et Loughlin, 1995 ; Ikemoto 2007).

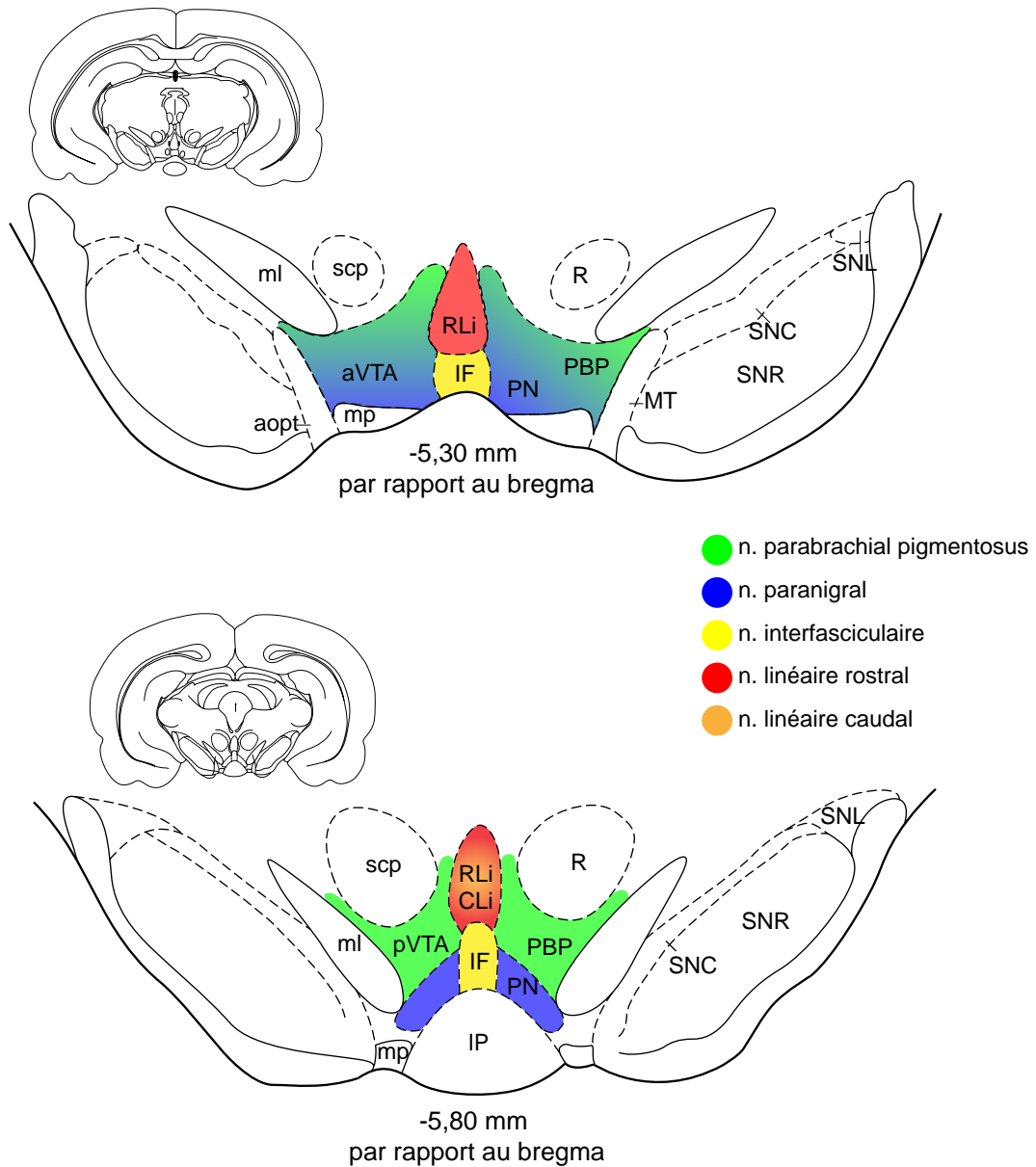


Figure 2 : Représentation en sections frontales des 5 subdivisions de la VTA telles que décrites pour la première fois chez le rat par Phillipson en 1979. Ces illustrations ont été réalisées à partir de l'atlas de Paxinos et Watson (4th édition, 1998). **En haut :** illustration au niveau de l'aire tegmentale ventrale antérieure. **En bas :** illustration au niveau de l'aire tegmentale ventrale postérieure.

Abréviations : aopt : tractus optique accessoire ; aVTA : aire tegmentale ventrale antérieure ; CLi : n. linéaire caudal ; IF : n. interfasciculaire ; IP : n. interpedonculaire ; ml : lemnicus médian ; mp : pédoncule mammillaire ; MT : n. médial terminal du tractus optique accessoire ; PBP : n. parabrachial pigmentosus ; PN : n. paranigral ; pVTA : aire tegmentale ventrale postérieure ; R : n. rouge ; RLi : n. linéaire rostral ; scp : pédoncule cérébelleux supérieur ; SNC : substance noire compacte ; SNL : substance noire latérale ; SNR : substance noire réticulée.

2) Subdivisions de l'aire tegmentale ventrale selon Ikemoto

Pour Ikemoto (2007), qui considère uniquement la dimension cytoarchitectonique de la VTA, elle est constituée de 4 noyaux latéraux (Figure 3). On retrouve la nomenclature classique des noyaux riches en neurones dopaminergiques que sont les noyaux PN et PBP (Phillipson, 1979a-c ; Halliday et Törk, 1986 ; Oades et Halliday ; 1987), ainsi que 2 noyaux spécifiques à ses travaux : l'aire du réflexus parafasciculaire (PFR) et la queue de l'aire tegmentale ventrale (VTT).

Le PFR constitue la partie la plus antérieure de la VTA et recèle une faible densité de cellules dopaminergiques. Celles-ci sont en continuité avec les cellules dopaminergiques du LH et du SuM, c'est-à-dire des structures antérieures à la VTA. Cette zone semble composée de la partie antérieure du PN et du PBP. C'est dans le tiers latéral moyen de la VTA qu'Ikemoto distingue classiquement les 2 noyaux que sont le PN et le PBP. Enfin, on trouve la VTT, une sous-région de la VTA pauvre en neurones dopaminergiques et localisée dans la zone juste latérale et postérieure à l'IP. Cette région définie sur la base de la coloration de Nissl semble être une sous-division de la partie la plus postérieure du PN dans sa vision classique.

3) Les noyaux médians appartiennent-ils à l'aire tegmentale ventrale ?

La vision d'Ikemoto (2007) met en lumière un problème de nomenclature récurrent dans la définition de la VTA. Celle-ci se compose-t-elle uniquement des noyaux latéraux ? Autrement dit, les noyaux médians que sont l'IF, le RLi et le CLi appartiennent-ils à la VTA ? Sont-ils indépendants de la VTA ? Sont-ils associés à d'autres structures comme le Raphé ?

Pour Swanson (1982), comme pour Kalivas (1993) ou pour Ikemoto (2007), les noyaux médians ne semblent pas appartenir à la VTA. Ainsi, bien que VTA et aire dopaminergique A10 soient souvent synonymes dans leur emploi courant, Kalivas considère que le terme VTA renvoie uniquement aux noyaux latéraux que sont le PN et le PBP tandis que l'aire dopaminergique A10 inclut aussi les noyaux médians IF, RLi et CLi. Dans sa revue, Ikemoto désigne le RLi et le CLi comme les noyaux rostral linéaire (RL) et caudal linéaire (CL) du raphé et non de la VTA. Ce rattachement au raphé des noyaux médians de la VTA n'est pas nouveau puisque les 4^{ème} (1998) et 5^{ème} (2007) éditions de l'atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson désignent aussi le CLi et le RLi comme les noyaux caudal et rostral linéaires du raphé. D'autres difficultés de nomenclature se rajoutent à la question de l'appartenance des noyaux médians à la VTA, comme l'existence d'autres dénominations cytoarchitectoniques de la VTA ou l'utilisation concomitante de différentes nomenclatures.

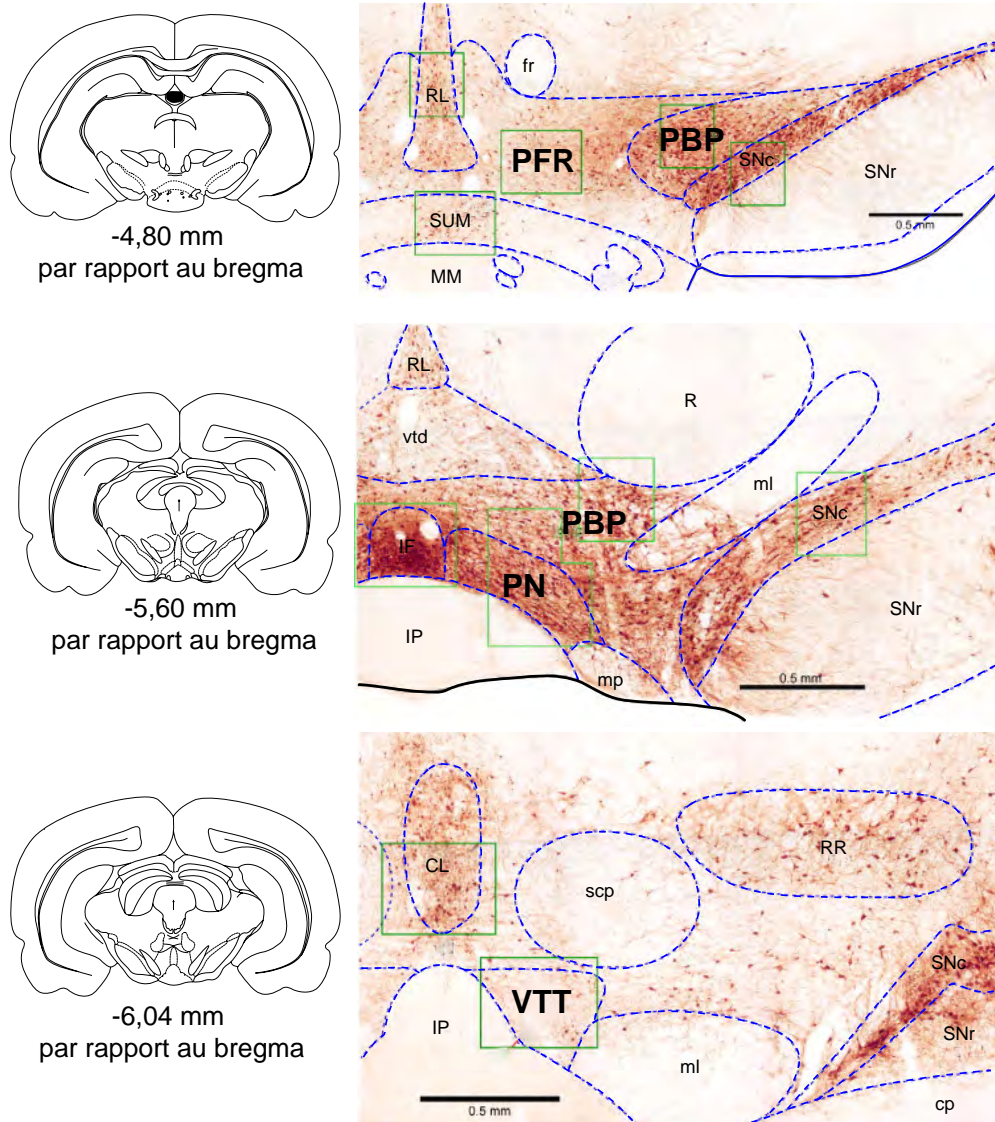


Figure 3 : Illustration des 4 subdivisions de la VTA telles que décrites par Ikemoto en 2007.

A droite : photographies à trois niveaux d'antéropostériorité de coupes frontales de mésencéphale de rat après révélation de la tyrosine hydroxylase en brun. Les rectangles verts correspondent aux limites de vues plus large de la publication initiale.

A gauche : dessin de 3 coupes frontales de cerveau de rat illustrant les niveaux d'antéropostériorité des photographies. Ces dessins ont été réalisés à partir de l'atlas de Paxinos et Watson (4th édition, 1998).

Abréviations : CL : n. linéaire caudal du raphé ; cp : pédoncule cérébral ; fr : fasciculus rétroflexus ; IF : n. interfasciculaire ; IP : n. interpédonculaire ; ml : lemnisque médian ; MM : partie médiale du n. mamillaire médiale ; mp : pédoncule mamillaire ; PBP : n. parabrachial pigmentosus ; PFR : aire du rétroflexus parafasciculaire ; PN : n. paranigral ; R : n. rouge ; RL : n. linéaire rostral du raphé ; RR : n. rétrorubral ; scp : pédoncule cérébelleux supérieur ; Snc : substance noire compacte ; SNr : substance noire réticulée ; SUM : n. supramamillaire ; vtd : décussation tegmentale ventrale ; VTT : queue de l'aire tegmentale ventrale.

On trouve ainsi, selon les planches de l'atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson (2007), à la fois le terme VTA mais aussi PN, PBP, RLi, CLi, IF, ainsi qu'un noyau parainterfasciculaire de la VTA (PIF). Ce dernier noyau n'est en fait référencé qu'une fois sur Pubmed, renvoyant à une publication du groupe de Ungless en 2008 (Nair-Roberts et al., 2008). Dans cet article ce noyau n'est pas explicitement défini mais correspondrait à une région ventrale du PBP et dorsale du PN dans la partie moyenne de la VTA.

En conclusion, il n'est pas aisé de définir simplement les sous-régions cytoarchitectoniques de la VTA. Lors de cette thèse, j'ai considéré celle-ci comme étant composée des 5 noyaux classiques décrit par Phillipson, mais je me suis surtout basée sur des subdivisions fonctionnelles de la VTA. Il est également à noter que dans la suite de ce manuscrit le terme A10 sera utilisé pour désigner les neurones dopaminergiques de la VTA composant le système dopaminergique mésolimbique.

D) connexions de l'aire tegmentale ventrale

Devant l'étendue des connexions de la VTA, il a été choisi de résumer en 2 tableaux les afférences (Tableau 1) et les efférences (Tableau 2) de cette région. Ce choix a permis de regrouper les nombreuses études de traçage impliquant la VTA. Dans un premier temps, ont été recherchés les travaux où l'injection d'un traceur antérograde ou rétrograde dans la VTA caractérisait l'ensemble des entrées et/ou sorties de cette région. A partir de ces travaux de référence, un travail bibliographique de « vérification » a alors été entrepris. Pour chaque région marquée de manière antérograde ou rétrograde, la confirmation par « traçage réciproque » a été recherchée. Ainsi, quand l'injection d'un traceur rétrograde dans la VTA induisait un marquage dans une région X, j'ai recherché les études caractérisant les efférences de la région X par injection d'un traceur antérograde dans cette région. Si un marquage antérograde était observé dans la VTA, la projection de la région X à la VTA était vérifiée. Dans ces tableaux, a également été indiquée la neurochimie des projections.

Tableau 1 : Résumé des afférences à la tVTA (1ère partie)

a Cartographie générale selon Geisler et Zahm (2005). - absence d'afférences ; + peu d'afférences ; ++ afférences modérées ; +++ nombreuses afférences ; ? non observé.

b Vérifications et neurochimie : ? absence de vérification significative ; + vérification positive ; - vérification négative

Structures	^a Cartographie de référence	^b Contrôle, vérification et neurochimie
cortex		
cingulaire	+	+ Au-Young et al., 1999 Gabbott et al., 2005
prélimbique	++	+ Au-Young et al., 1999 Carr et Sesack, 2000 Glu Geisler et Zahm, 2005
infralimbique	++	+ Au-Young et al., 1999 Carr et Sesack, 2000 Glu Geisler et Zahm, 2005
pédonculaire dorsal	++	+ Au-Young et al., 1999 Gabbott et al., 2005
agranulaire insulaire	+	+ Gabbott et al., 2005
hippocampe	?	
claustrum	++	?
n. endopiriforme	++	?
tubercule olfactif	+	- Zhou et al., 2003
septum		
latéral, partie dorsale	+	+ Swanson et Cowan, 1979 Geisler et Zahm, 2005
latéral, partie intermédiaire	+++	+ Swanson et Cowan, 1979 Geisler et Zahm, 2005
latéral, partie ventrale	+	+ Swanson et Cowan, 1979
n septofimbrial	++	+ Geisler et Zahm, 2005
n. vert./horiz. de la bande diag	+++	+ Kalivas et al., 1993 GABA/Enk Geisler et Zahm, 2005
n. accumbens		+ Walaas et Fonnum, 1980 GABA Yim et Mogenson, 1980b GABA Zhou et al., 2003 GABA/Dyn
pôle rostral	++	+ Zahm et Heimer, 1993
coquille	+++	+ Heimer et al., 1991 Usuda et al., 1998 Berendse et al., 1992 Kalivas et al., 1993 GABA/Enk Geisler et Zahm, 2005
coeur	+	+ Heimer et al., 1991 Usuda et al., 1998 Berendse et al., 1992 Zahm et Heimer, 1993 Geisler et Zahm, 2005
pallidum ventral	+++	+ Zahm, 1989 Groenewegen et al., 1993 Kalivas et al., 1993; GABA/Enk Geisler et Zahm, 2005
n. du lit de la strie terminale	+++	+ Swanson et Cowan, 1979 Georges et Aston-Jones, 2002 Glu Dong et Swanson, 2006a/b Rodaros et al., 2007 CRF
zona incerta	++	- Ricardo, 1981
substantia innominata sublenticulaire	++	+ Geisler et Zahm, 2005

Tableau 1 : Résumé des afférences à la tVTA (2ème partie)

Structures	^a cartographie de référence	^b Contrôle, vérification et neurochimie
amygdale		
aire amygdaloïde antérieure	++	?
n. médian	++	+ Canteras et al., 1995
n. central	+	+ Gonzales et Chesselet, 1990 Geisler et Zahm, 2005 Rodaros et al., 2007 CRF
thalamus		
n. paraventriculaire	++	- Vertes et Hoover, 2008
n. parafasciculaire	+	?
n. reuniens	-	+ Vertes et al., 1996
n. rhomboïde	-	+ Vertes et al., 1996
habénula latérale	+++	+ Herkenham et Nauta 1979 Zahm et al., 2006; Kim 2009
habénula médiane	+++	- Herkenham et Nauta 1979
hypothalamus		
aire préoptique latérale	+++	+ Geisler et Zahm, 2005 Reynolds et al., 2006 NT
n. préoptique médian	+	+ Luo et Aston-Jones, 2009
aire préoptique médiale	+++	+ Conrad et Pfaff, 1976a Chiba et Murata, 1985 Simerly et Swanson, 1988 Reynolds et al., 2006 NT Luo et Aston-Jones, 2009
aire préoptique magnocellulaire	+	?
aire hypothalamique latérale	+++	+ Fadel et Deutch, 2002 O _{xr} Geisler et Zahm ., 2005 Balcita-Pedicino et al., 2007 O _{rx} Reynolds et al., 2006 NT
aire hypothalamique antérieure	++	+ Conrad et Pfaff, 1976b Risold et al., 1994
n. hypothalamique ventromédian	+	+ Saper et al., 1976 Krieger et al., 1979
aire hypothalamique postérieure	++	+ Vertes et Crane, 1996
aire hypothalamique dorsale	++	+ Roeling et al., 1993
n. paraventriculaire	++	+ Roeling et al., 1993 Rodaros et al., 2007 CRF
tuber cinereum	++	?
n. périfornical	++	?
n. supramammilaire	+	?
substance noire		
partie compacte	++	?
partie réticulée	+	?
raphé		
n. pontique	+	?
n. dorsal	+++	+ Conrad et al., 1974 Vertes, 1991 Gervais et Rouillard, 2000 5HT
n. paramédian	++	?
n. médian	++	+ Conrad et al., 1974 Vertes et al., 1999
collicule supérieur	++	+ Coizet et al., 2003 McHaffie et al., 2006
substance grise périaqueducale	+++	+ Cameron et al., 1995
n. parabrachial	++	+ Saper et Loewy, 1980

Tableau 1 : Résumé des afférences à la tVTA (3ème partie)

Structures	^a cartographie de référence	^b Contrôle, vérification et neurochimie
locus coeruleus	++	+ Simon et al., 1979b Jones et Yang, 1985 Grenhoff et al., 1993 Nor Mejías-Apont et al., 2009 Nor
n. cunéiforme	+	?
formation réticulée		
n. profonds du mésencéphale	++	- Veazey et Severin, 1980, 1982
n. réticulaire pontique, partie orale	++	+ Jones et Yang, 1985 Vertes et Martin, 1988
n. réticulaire pontique, partie caudale	++	- Jones et Yang, 1985 + Vertes et Martin, 1988
noyau réticulaire latéral	+	?
noyau réticulaire intermédiaire	+	?
noyau gigantocellulaire	+	+ Jones et Yang, 1985 Vertes et al., 1986
n. tegmentaux		
n. pédonculopontin	+	+ Sugimoto et Hattori, 1984 Oakman et al., 1995 ach Charara et al., 1996 Glu/ GABA
n. tegmental ventral	++	?
n. antérotegmental	++	?
n. tegmental dorsal	+	?
n. tegmental latérodorsal	++	+ Cornwall et al., 1990 Oakman et al., 1995 ach Omelchenko et Sesack, 2005
A1	?	+ Mejías-Apont et al., 2009 Nor
A2	?	+ Mejías-Apont et al., 2009 Nor
A5	?	+ Mejías-Apont et al., 2009 Nor
C1	?	+ Mejías-Apont et al., 2009 Adre

Tableau 2 : Résumé des efférences à la tVTA (1ère partie)

a Cartographie générale selon Fallon et Moore 1978 et Beckstead et al., 1979. - absence d'efférences ; + peu d'efférences ; ++ afférences modérées ou importantes ; ? non observé.

b Vérifications et neurochimie : ? absence de vérification significative ; + vérification positive ; - vérification négative

Structures	^a cartographie de référence	^b Contrôle, vérification et neurochimie
cortex		
cingulaire	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Albanese et Minciacchi, 1983
prélimbique	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Albanese et Minciacchi, 1983 Pirrotet al., 1992 DA/GABA
infralimbique	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Albanese et Minciacchi, 1983 Pirrotet al., 1992 DA/GABA
pédonculaire dorsal	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Albanese et Minciacchi, 1983
insulaire agranulaire entorhinal	-	+ Ohara et al., 2003 DA
	+	+ Fallon et Loughlin, 1987 Santiago et Shammah-Lagnado, 2005
hippocampe dorsal	+	+ Scatton et al., 1980
tubercule olfactif	++	+ Fallon et Moore, 1978b Haglund et al., 1979 DA Mooney et al., 1987 DA Ikemoto, 2007
ilôts de Calleja septum	+	+ Fallon et al., 1978a + Ikemoto, 2007
latéral, partie intermédiaire	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Fallon et Moore, 1978a Albanese et Minciacchi, 1983
médian	+	+ Fallon and Moore, 1978a
n. vert./horiz. de la bande diag	++	+ Ikemoto, 2007
striatum dorsolatéral	++	+ Fallon et Moore, 1978a
n. accumbens	+	+ Carter et Fibiger, 1977 Fallon and Moore, 1978a Haglund et al., 1979 Phillipson et Griffiths, 1985
pôle rostral	+	+ Tan et al., 1995
coquille	+	+ Tan et al., 1995 Hasue et al., 2002; Ikemoto, 2007
coeur	++	+ Tan et al., 1995 Ikemoto, 2007
pallidum ventral	++	+ Klitenick et al., 1992 DA
n. du lit de la strie terminale	+	+ Shammah-Lagnado et al., 2000 Hasue et al., 2002 Shin et al., 2008
substantia innominata sublenticulaire	++	+ Shammah-Lagnado et al., 2000
IPAC	++	+ Shammah-Lagnado et al., 1999 Shammah-Lagnado et al., 2000 Shammah-Lagnado et al., 2001

Tableau 2 : Résumé des efférences à la tVTA (2ème partie)

Structures	a cartographie de référence	b Contrôle, vérification et neurochimie
amygdale		+ Carter et Fibiger, 1977 Fallon et al., 1978b DA Haglund et al., 1979 Usunoff et al., 2006
aire amygdalopiriforme	-	+ Santiago et Shammah-Lagnado, 2005
Aire amygdaloïde antérieure	+	+ Shammah-Lagnado et al., 2000
n. central	+	+ Hasue et al., 2002
n. subthalamique	-	+ Hassani et al., 1997
zona incerta	+	?
thalamus		
n. médiodorsal	+	+ Cornwall et Phillipson, 1988
n. ventromédian	+	0
n. central médian	+	0
n. reuniens	+	+ McKenna et Vertes, 2004
n. paraventriculaire	+	0
n. parafasciculaire	+	0
habénula latérale	++	+ Herkenham et Nauta 1977 Phillipson et Pycoc, 1982 Li et al., 1993 DA
habénula médiane	-	+ Phillipson et Pycoc, 1982
hypothalamus		
aire préoptique latérale	++	+ Duva et al., 2005
aire préoptique médiane	-	- Duva et al., 2005, + Miller et Lonstein, 2009
aire préoptique magnocellulaire	++	?
aire hypothalamique latérale	++	+ Barone et al., 1981 Albanese et Minciacchi, 1983
aire hypothalamique postérieure	++	?
substance noire		
partie compacte	++	?
partie réticulée	+	?
n. oculomoteur	++	?
substance grise périaqueducale	++	+ Kirouac et Pittman 2000 DA Kirouac et al., 2004 GABA
raphé dorsal	++	+ Kalén et al.; 1988 Kirouac et al., 2004 GABA
n. parabrachial	+	+ Tokita et al., 2009
locus coeruleus	+	+ Simon et al., 1979b Ornstein et al., 1987 DA
n. profonds du mésencéphale	++	?
n. de Barrington	+	?
n. tegmental latérodorsal	+	?
cervelet		
cortex cérébelleux	?	+ Ikai et al., 1992 DA
noyaux profonds	?	+ Ikai et al., 1992

1) Considérations relatives aux afférences à la VTA

Les travaux d'utilisés comme référence concernant les entrées de la VTA sont ceux de Phillipson en 1979c et la révision récente de cette étude par le groupe de Daniel Zahm (Geisler et Zahm, 2005). Une autre étude, de la fin des années 70 (Simon et al., 1979a) décrivant aussi les entrées de la VTA, ainsi qu'une revue sur la connectivité de la VTA par Oades et Halliday en 1987 confirment les résultats des travaux choisis comme référence.

Après injection de traceurs rétrogrades dans la VTA, on remarque que les neurones marqués ne sont pas confinés à quelques structures bien définies mais constituent plutôt un long continuum au sein de l'encéphale. D'après Geisler et Zahm (2005), ce continuum est centré dans le cerveau antérieur sur le faisceau médian du télencéphale et sur le fasciculus rétroflexus et s'étend dans le tronc cérébral jusqu'au bulbe rachidien. De manière générale, il est également à noter que la plupart des structures qui projettent à la VTA le font bilatéralement avec une préférence ipsilatérale.

Il me semble important de noter qu'il existe néanmoins une différence majeure entre les travaux de Phillipson et ceux du groupe de Zahm (Phillipson, 1979c ; Geisler et Zahm, 2005). En effet, suite à l'injection de traceur rétrograde dans la VTA, Phillipson observe 20 à 50 fois moins de neurones marqués que Geisler et Zahm. Cette différence est principalement due aux propriétés de ces traceurs. En effet, Phillipson utilise la peroxydase de raifort (HRP) comme traceur rétrograde alors que Zahm utilise le Fluoro-Gold® (FG). Or, la capture de la HRP est directement couplée à l'activité synaptique terminale et est fortement réduite quand l'activité est inhibée (Singer et al., 1977 ; Turner, 1977). Le FG, quant à lui, est incorporé par les terminaisons synaptiques indépendamment de l'activité neuronale (Köbbert et al., 2000). Ces considérations suggèrent que les travaux de Phillipson ont fortement sous-estimé les entrées à la VTA.

2) Considérations relatives aux efférences de la VTA

Avant de discuter des considérations anatomo-fonctionnelles relatives à la VTA il me semble important de souligner que contrairement aux afférences à la VTA, les sorties de cette région n'ont pas été revue de façon globale depuis la fin des années 70. Les travaux de référence utilisés datent donc de cette époque (Fallon et Moore, 1978a ; Beckstead et al., 1979). Ces études utilisent toutes les deux une méthode de traçage antérograde par les acides aminés tritiés. Cette technique sous-estime sans doute le nombre des sorties de la VTA. Une révision de ces études, en utilisant des traceurs plus récents comme la BDA (biotine dextran amine) par exemple, semble aujourd'hui nécessaire. Néanmoins on peut tout de même dire

que, bien que très dispersées et couvrant la majeure partie de l'encéphale, les sorties de la VTA sont moins importantes quantitativement que les entrées.

La sortie la plus étudiée est sans conteste celle de la VTA vers le noyau accumbens (NAc) l'efférence majeure des neurones dopaminergiques mésolimbiques. Ces projections sont réciproques et présentent grossièrement une topie régionale médiolatérale (Phillipson et Griffiths, 1985 ; Heimer et al., 1991 ; Berendse et al., 1992 ; Hasue et Shammah-Lagnado, 2002). Elles s'insèrent dans ce qui est appelé la « spirale striatonigrostriatale » (Haber et al., 2000) (Figure 4) qui inclut les projections de la VTA et de la SNC vers le NAc et le striatum dorsal. De façon simple, cette spirale comprend des boucles de rétrocontrôle fermées (« feedback ») associées à des projections antérogrades (« feedforward ») qui évoluent de manière médiolatérale et permettent une interaction entre les circuits striataux limbiques et moteurs par l'intermédiaire du système dopaminergique.

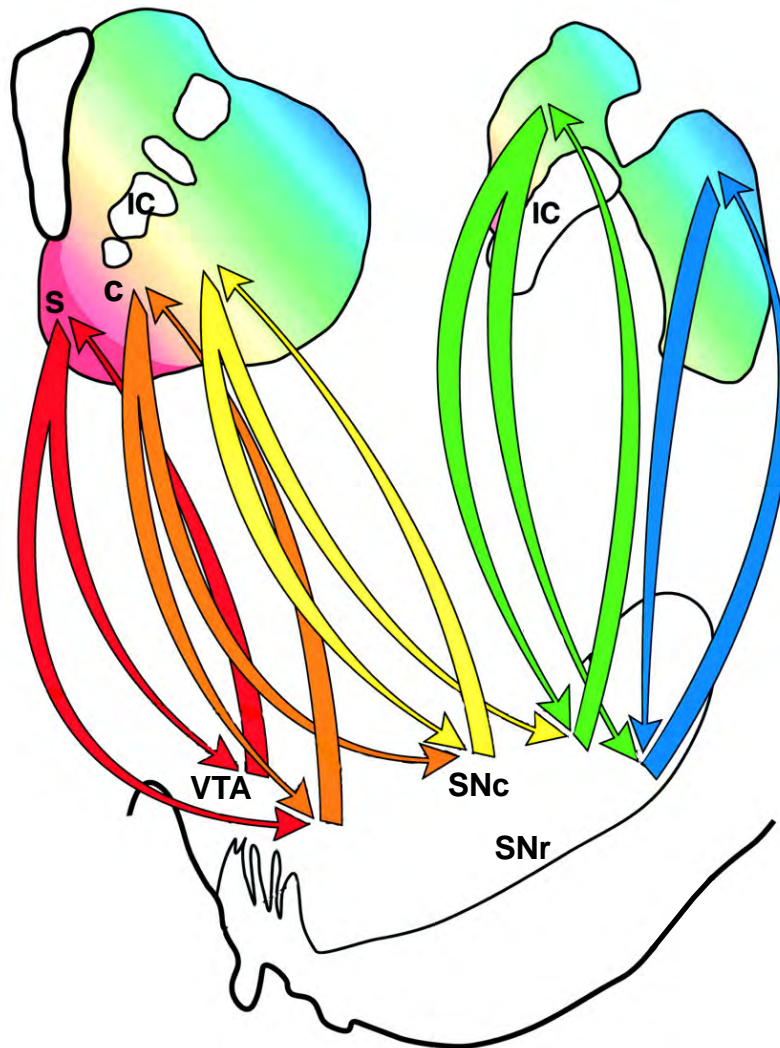


Figure 4 : Diagramme de l'organisation des projections striatonigrostriales chez le primate. Illustration réalisée d'après la figure 12 d'un article de Haber et collaborateurs de 2000.

La coquille du noyau accumbens (S) projette sur la VTA et sur la partie ventromédiale de la substance noire compacte (SNc) (flèches rouges). Les projections de la VTA sur la coquille du noyau accumbens (C) forment des boucles de rétrocontrôle réciproques (flèches rouges). La partie médiale de la substance noire projette en "feedforward" vers le cœur du noyau accumbens formant ainsi la première partie de la spirale (flèche orange). Cette spirale se poursuit à travers les projections striatonigrostriales (flèches jaunes à vertes) avec des voies originaires du cœur du noyau accumbens et projetant plus dorsalement (flèches bleues). Grâce à ces projections striatonigrostriales spiralées le striatum ventral influence le striatum dorsal.

Abréviations : C: cœur du n. accumbens ; IC : capsule interne ; S: coquille du n. accumbens ; SNc : partie compacte de la substance noire ; SNr : partie réticulée de la substance noire ; VTA : aire tegmentale ventrale.

3) Considérations anatomofonctionnelles

L'observation majeure concernant les entrées à la VTA est qu'elles ne se limitent pas à quelques régions bien délimitées mais qu'elles sont issues d'une zone très allongée s'étendant du cortex préfrontal (PFC) au bulbe rachidien. Dans ce continuum d'afférences, il est difficile d'identifier une ou plusieurs zones projetant plus que les autres à la VTA. Les entrées à cette région sont très diffuses et d'intensité globalement uniforme. C'est cette organisation des projections sur la VTA qui amène Zahm (Geisler et Zham., 2005) à associer la VTA au concept « de cœur isodendritique » décrit par Ramon-Moliner et Nauta en 1966 ou à la notion de « formation réticulée » décrite par Leontovich et Zhukova en 1963 et Scheibel et Scheibel en 1958. « Selon ces auteurs, le « cœur isodendritique » (ou « formation réticulée ») consiste en un continuum neuronal où se chevauchent les champs dendritiques. » (Citation de Geisler et Zham, 2005). Pour Geisler et Zahm (2005), la VTA, à la fois par la morphologie des neurones qui la constituent et par ses connexions afférentes quantitativement supérieures aux connexions efférentes, s'intègre totalement à ces concepts. Ces considérations anatomofonctionnelles de Zahm prennent encore plus de valeur quand on les associe aux théories plus comportementales de Schultz (Schultz et al., 1998). En effet, ces deux groupes s'accordent pour dire que la VTA serait une structure permettant un tri global des nombreuses informations qu'elle reçoit mais n'est en aucun cas une structure discriminative. Dans le cadre de ses travaux sur les processus récompensants, Schultz suggère ainsi que les neurones de la VTA ont pour rôle d'identifier un stimulus récompensant mais pas d'en définir la nature. En effet, ces neurones ne sont pas capables, à l'inverse de ceux du PFC, de différencier une récompense primaire d'un stimulus conditionnel appétitif ou de discriminer les différentes modalités sensorielles d'un stimulus récompensant (Schultz et al., 1998).

Par ses entrées, la VTA est donc un centre intégrateur d'informations relatives à de nombreuses modalités, non seulement récompensantes ou aversives, mais de façon plus générale sensorielles. C'est pourquoi la VTA, notamment via la dopamine, est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment psychiatriques, telles que les troubles de l'humeur, la toxicomanie ou la schizophrénie (pour revues : Simon et Le Moal, 1988 ; Le Moal et Simon, 1991 ; Sesack et Carr. 2002 ; Ikemoto et Wise 2004 ; Nestler et Carlezon, 2006 ; Feltenstein et See, 2008 ; Koob et le Moal 2008a).

II) Neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale

A) Localisation et stéréologie

Les neurones dopaminergiques sont le groupe neuronal majoritaire dans la VTA. Ils sont notamment connus pour projeter au NAc et au PFC et constituent ainsi le système dopaminergique mésocorticolimbique (Swanson, 1982 ; Björklund et Dunnet, 2007 ; voir chapitre afférences VTA). Les neurones dopaminergiques représentent environ les 2/3 de la population neuronale de la VTA (Swanson, 1982 ; German et Manaye, 1993 ; Harris et Nestler, 1996 ; Nair-Roberts et al., 2008). Swanson (1982) a estimé à 14 000 (évaluation unilatérale) le nombre de neurones de la VTA chez le rat, environ 10 000 étant dopaminergiques d'après leur immunoreactivité pour la tyrosine hydroxylase (TH). Cette estimation a été faite en utilisant la technique de correction d'Abercrombie, prenant en compte la possibilité que des cellules puissent s'étendre sur plus d'une section histologique. Une dizaine d'années plus tard, German et Manaye (1993) utilisèrent une méthode de comptage assistée par ordinateur après marquage des neurones dopaminergiques par immunohistochimie TH. Ils évaluèrent à 10 400 (évaluation unilatérale) le nombre de neurones dopaminergiques de la VTA, ce qui est proche des données de Swanson. Mais plus récemment, une étude stéréologique évaluant les populations neuronales dopaminergiques, GABAergiques et glutamatergiques de la substance noire, du RRF et de la VTA, a remis en cause les comptages précédents (Nair-Roberts et al., 2008). Ces auteurs estiment en effet à 20 000 (évaluation unilatérale, immunoreactivité TH) le nombre de neurones dopaminergiques de la VTA, c'est-à-dire le double de l'évaluation classique.

Malgré la variété des délimitations et des dénominations des sous-régions de la VTA, la répartition différentielle des neurones dopaminergiques selon les axes rostrocaudal ou médiolatéral fait consensus (Swanson, 1982 ; Fallon et Loughlin, 1995 ; Ikemoto, 2007 ; Nair-Roberts et al., 2008). Les neurones dopaminergiques sont présents sur toute l'étendue rostrocaudale de la VTA, mais sont prévalents dans sa partie postérieure ou pVTA. L'immunoreactivité TH est maximale dans la partie antérolatérale de la pVTA, correspondant aux noyaux PN et PBP. La densité des cellules dopaminergiques décroît progressivement rostralement et caudalement à cette région. Il existe aussi un gradient décroissant latéromédial mais, sur la ligne médiane, se trouve une zone riche en neurones dopaminergiques correspondant aux noyaux IF et CLi. Les corps cellulaires de ces neurones dopaminergiques médians sont morphologiquement plus petits mais aussi arrangés de manière plus dense que les neurones latéraux.

B) Patrons d'activité : tonique versus phasique

Les enregistrements intracellulaires montrent que les neurones dopaminergiques de la VTA possèdent une activité pacemaker intrinsèque, activité qui n'est pas en bouffées (Grace et Onn, 1989). Cette activité pacemaker est due à une dépolarisation spontanée, permise notamment par des canaux cationiques de la rectification retardée ou canaux I_h (Mercuri et al., 1995 ; Neuhoff et al., 2002 ; Korotkova et al., 2004 ; Marinelli et al., 2006).

In vivo, certains neurones dopaminergiques sont silencieux alors que d'autres montrent une activité spontanée (Kalivas, 1993 ; Korotkova et al., 2004 ; Marinelli et al., 2006). Cette activité spontanée peut être lente et régulière, lente et irrégulière ou rapide en bouffées de potentiels d'action. Le patron de décharge en bouffées ne s'observe qu'*in vivo*, mais pas *in vitro*. En effet, les entrées excitatrices sont nécessaires à l'activité en bouffées des neurones dopaminergiques de la VTA (Marinelli et al., 2006), mais celles-ci sont coupées lors d'études *in vitro*. Les entrées excitatrices responsables de l'activité en bouffées seraient issues du PFC (Gao et Wolf, 2007), du noyau pédonculopontin (PPTg) (Scarnati et al., 1984 ; Kelland et al., 1993 ; Floresco et al., 2003), de l'hypothalamus latéral (LH) ou du noyau sub-thalamique (STh) (Lodge et Grace, 2006). Les bouffées sont le plus souvent irrégulières, caractérisées par des groupes de potentiels d'action à haute fréquence qui montrent une accommodation. L'activité en bouffées induit une augmentation de la libération de dopamine, aux niveaux somatodendritique et axonal, plus importante qu'une activité spontanée régulière (Gonon, 1988 ; Sonders et al., 2009).

On considère ainsi que l'activité **tonique** des neurones dopaminergiques de la VTA correspond à l'activité spontanée (pacemaker) régulière ou irrégulière de ces cellules et que la transition vers un patron de décharge en bouffées correspond à l'activité dite **phasique** de ces neurones. Cette réponse phasique peut être observée lors de la présentation d'un nouveau stimulus récompensant ou, après conditionnement, lors de la présentation d'un stimulus prédisant la récompense (Schultz, 2006, 2007a). Néanmoins, les travaux sur les relations entre dopamine et réponses comportementales indiquent que la vision simpliste d'une relation directe entre augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques, libération de dopamine et récompense doit être dépassée. Ces phénomènes sont bien plus complexes. On sait aujourd'hui, notamment grâce aux travaux de Schultz (Schultz, 2006, 2007a), que la transition d'un patron de décharge tonique des neurones dopaminergiques de la VTA vers une activité en bouffées code des informations complexes, comme l'erreur de prédiction de récompense ou la pertinence motivationnelle (« incentive salience »). Mais pour Schultz, ce

n'est pas juste la transition entre patrons de décharge qui est importante, mais surtout le moment où elle a lieu (Schultz, 2007b) : le déroulement temporel des réponses d'un neurone dopaminergique suite à un stimulus influence fortement la réponse comportementale associée. Toujours pour illustrer la complexité des liens entre activité dopaminergique et comportement, alors que l'on pensait que l'activité de fond tonique des neurones dopaminergiques de la VTA n'avait qu'une influence comportementale limitée, il a été élégamment montré par Tsai et collaborateurs que l'activité tonique des neurones dopaminergiques de la VTA est suffisante pour permettre une réponse comportementale conditionnée (Tsai et al., 2009).

C) Existe-t-il une signature électrophysiologique des neurones dopaminergiques ?

Les enregistrements électrophysiologiques unitaires *in vivo* de neurones de la VTA ont montré qu'ils répondent notamment à la présentation de stimulus nouveaux, à une récompense imprédictible ou prédite par des indices sensoriels (Schultz, 1998). Des critères fiables d'identification des neurones dopaminergiques sont essentiels à de telles études fonctionnelles et à leur interprétation. Néanmoins, l'identification d'une signature électrophysiologique de ces neurones reste incertaine et largement discutée (Marinelli et al., 2006 ; Margolis et al., 2006).

Historiquement, les critères d'identification des neurones dopaminergiques du mésencéphale ont été établis à partir d'enregistrements dans la SNC. Des études utilisant des enregistrements *in vivo* ou *ex vivo* associées à des techniques cytochimiques ont montré que les neurones dopaminergiques de la SNC ont des potentiels d'action extracellulaires, relativement longs, une fréquence de décharge lente, une activité pacemaker *in vitro*, ou une activité en bouffées de potentiels d'action *in vivo*. Ces neurones sont également inhibés par des agonistes des récepteurs D₂ (Guyenet et Aghajanian, 1978 ; Grace et Bunney, 1980, 1983 ; Grace et Onn, 1989). Vu la difficulté à délimiter précisément la VTA, et surtout à cause de la continuité médiolatérale entre la VTA et la SNC, il a tout d'abord été admis que les neurones dopaminergiques de la VTA possédaient des propriétés électrophysiologiques comparables à ceux de la SNC. Cette simplification a été rapidement mise en cause et c'est ainsi qu'une liste de paramètres électrophysiologiques plus fins permettant d'identifier les neurones dopaminergiques de la VTA a été proposée (Aghajanian et Bunney, 1973 ; Johnson et North, 1992 ; pour revue : Marinelli et al., 2006).

Un neurone de la VTA est électrophysiologiquement défini comme dopaminergique s'il remplit plusieurs conditions. *In vivo*, cette « signature » est caractérisée par :

- un potentiel d'action extracellulaire triphasique d'une durée totale supérieure à 2,5 msec, avec un segment initial souvent visible ;
- une fréquence de décharge relativement faible (<10 PA/s) ;
- une inhibition provoquée par des agonistes des autorécepteurs dopaminergiques D₂ ;
- une inhibition induite par une stimulation nociceptive (pincement de la patte).

In vitro, en patch clamp, c'est la présence d'un important courant potassique de la rectification retardée, ou courant I_h, qui est utilisée pour identifier les neurones dopaminergiques de la VTA.

Ces paramètres restent largement utilisés mais, au fur et à mesure des années, de nombreuses études sont venues contredire leur fiabilité. En effet, c'est en associant des enregistrements électrophysiologiques, c'est-à-dire des preuves indirectes, avec des techniques de marquage des neurones enregistrés, c'est-à-dire des preuves directes, que l'on a vu apparaître de nombreuses contradictions. Pour exemple, on peut citer le cas d'études montrant que des neurones définis comme dopaminergiques peuvent être activés par des stimulus aversifs (Schultz et Romo, 1987 ; Mantz et al., 1989). En 1980, Yim et Mogenson montraient déjà, *in vivo*, que des neurones identifiés comme dopaminergiques ou non dopaminergiques (différenciés grâce à la durée de leurs potentiels d'action et leurs fréquences de décharge) étaient tous deux inhibés par l'injection de quinpirole, un agoniste des récepteurs D₂. Il en est de même pour les études de patch clamp où différents groupes ont montré que tous les neurones de la VTA, dopaminergiques ou non, possèdent un courant I_h (Johnson et North, 1992 ; Margolis et al., 2003, 2006). Au vu de ces données, il est clair que l'identification électrophysiologique des neurones dopaminergiques de la VTA représente un challenge et, comme Margolis et collaborateurs (2006), on est en droit de se demander s'il existe un marqueur électrophysiologique fiable.

C'est dans ce contexte qu'une étude élégante d'Ungless et collaborateurs (2004) semble avoir mis en évidence un paramètre électrophysiologique robuste d'identification des neurones dopaminergiques de la VTA. En associant l'enregistrement unitaire de neurones à l'injection juxtacellulaire de neurobiotine, ils montrent que la durée de la première partie du potentiel d'action, du début de ce potentiel au début de la phase négative, est plus longue pour les neurones dopaminergiques que pour les autres types neuronaux de la VTA. Ils observent ainsi que tous les neurones ayant des potentiels d'action d'une durée totale supérieure à 2,5 msec et une première partie supérieure à 1,1 msec sont TH-positifs. Ces neurones sont

dopaminergiques et tous inhibés par la stimulation mécanique nociceptive des pattes. Ces critères sont aujourd'hui largement utilisés. Il est par contre important de préciser que ces paramètres sont valables *in vivo* mais pas *in vitro* et qu'ils ont été définis, comme le souligne Marinelli et collaborateurs (2006), en filtrant le signal obtenu entre 300 Hz et 5 kHz au lieu du filtrage classique entre 50 Hz et 0,8 kHz.

D) Régulation de l'activité des neurones dopaminergiques

La régulation de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA est très complexe. Elle met non seulement en jeu de nombreuses structures mais également une grande variété de neurotransmetteurs et neuropeptides. Néanmoins, si l'on se place d'un point de vue anatomique, cette régulation peut se scinder en trois catégories : (pour revues : Kalivas, 1993 ; Marinelli, 2006)

- *Des régulations intrinsèques à la VTA* : elles consistent en de courtes boucles de rétrocontrôles des neurones dopaminergiques, impliquant notamment la libération somatodendritique locale de dopamine (autorégulation) ou la libération de GABA par les interneurons GABAergiques de la VTA. Ces régulations intrinsèques sont notamment capables de moduler la capacité des neurones dopaminergiques à produire des potentiels d'action spontanés en changeant la polarisation de leur membrane.

- *Des régulations issues des structures innervées par les neurones dopaminergiques* : ce sont souvent des boucles de rétrocontrôle longues régulées par la libération axonale terminale de dopamine. Elles impliquent notamment le PFC ou le NAc. Elles mettent en jeu différents types de neurotransmission, les plus courantes étant glutamatergiques et GABAergiques.

- *Des régulations issues de régions non directement influencées par la libération axonale de dopamine* : ces afférences correspondent à des réponses hautement intégrées et polysynaptiques issues de tout le système nerveux central.

Vu la variété et la complexité de ces régulations, plus que l'élaboration d'un catalogue qui ne pourrait être exhaustif, j'ai choisi d'en détailler quelques exemples :

- *Régulations intrinsèques : la libération somatodendritique de dopamine*. Elle entraîne un rétrocontrôle sur les neurones dopaminergiques de deux façons, selon la localisation et le type de récepteur dopaminergique impliqué. Les récepteurs **D₂/D₃** sont présents en forte densité dans le mésencéphale ventral (Bouthenet et al., 1987 ; Wamsley et al., 1989 ; Sesack, 1994). Des études lésionnelles ont montré que la majorité d'entre eux sont localisés sur les

neurones dopaminergiques (Bouthenet et al., 1987 ; Chen et al., 1991 ; Black et al., 1992), ce que confirme l'expression de l'ARNm codant le récepteur **D₂** (Meador-Woodruff et al., 1991 ; Mansour, 1992 ; Haber et al., 1995). Ils constituent ainsi des autorécepteurs dopaminergiques dont l'activation, par la libération somatodendritique de dopamine, réduit l'activité des neurones dopaminergiques. Cette réduction d'activité serait due à une activation de conductances potassium, et plus précisément des canaux potassiques de la rectification retardée (GIRK) (White et al., 1984 ; Lacey et al., 1987 ; Davila et al., 2003), conduisant à l'hyperpolarisation de la cellule dopaminergique (pour revue : Kalivas, 1993). Dans la VTA, les récepteurs dopaminergiques **D₁** sont quant à eux localisés sur des terminaisons axonales, notamment sur des entrées glutamatergiques et GABAergiques issues du cerveau antérieur (Cameron et al., 1993 ; Kalivas et al., 1995 ; Lu et al., 1997). En effet, les neurones de la VTA et de la substance noire n'expriment pas l'ARNm codant le récepteur **D₁** alors que la protéine est présente dans ces régions (Mansour et al., 1992). La stimulation de ces récepteurs par la dopamine somatodendritique entraîne ainsi une augmentation de la libération de neurotransmetteurs autres que la dopamine, qui vont alors moduler l'activité des neurones dopaminergiques (pour revues : Kalivas, 1993 ; Adell et Artigas, 2004).

- *Régulations intrinsèques et extrinsèques : le cas du GABA.* Le GABA est responsable de la majorité des inhibitions synaptiques des neurones dopaminergiques. Il provient soit d'une population d'interneurones GABAergiques intrinsèques à la VTA (Bayer et Pickel, 1991 ; Omelchenko et al., 2009b), soit d'entrées GABAergiques extrinsèques, dont le complexe striatal et le pallidum ventral. (Smith et Bolam, 1990 ; Von Krosigk et al., 1992 ; Groenewegen et al., 1993 ; Kalivas, 1993 ; Marinelli et al., 2006).

Les entrées GABAergiques issues du complexe striatal sont souvent qualifiées de « boucles GABAergiques longues ». Elles peuvent être directes, provenant du NAc, ou indirectes, via le pallidum ventral. En réponse à la libération terminale de dopamine dans le NAc, ces boucles inhibitrices libèrent du GABA directement en regard des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral (Yim et Mogenson, 1980b ; Grace et Bunney, 1985 ; Klitenick et al., 1992). Elles jouent un rôle important dans différentes situations, dont l'inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques suite à l'administration de psychostimulants (Bunney et Aghajanian, 1976 ; Einhorn et al., 1988). L'hémitranssection de ces boucles longues n'affecte cependant pas l'activité basale des neurones dopaminergiques de la substance noire et de la VTA (Einhorn et al., 1988 ; Pucak et Grace, 1994). Toutefois, comme le maintien de la fonctionnalité de ces boucles sous anesthésie reste controversé, il reste difficile de statuer sur leur rôle phasique ou tonique.

L'inhibition directe des neurones dopaminergiques de la VTA par le GABA peut se faire via les récepteurs GABAA ou GABAB (Johnson et North, 1992). Les entrées synaptiques sur ces 2 récepteurs semblent avoir des origines neuroanatomiques distinctes (Figure 5). Elles proviendraient des interneurons GABAergiques locaux pour les entrées sur les récepteurs GABAA et des projections extrinsèques sur la VTA pour les entrées sur les récepteurs GABAB (Johnson et North, 1992 ; Klitenick et al., 1992 ; Sugita et al., 1992). Comme le soulignent plusieurs auteurs (pour revues : Kalivas et al., 1993 ; Marinelli et al., 2006), l'activation de ces récepteurs entraîne une inhibition des neurones dopaminergiques avec un décalage temporel différent.

Si la stimulation systémique des récepteurs GABAA augmente l'activité des neurones dopaminergiques (Waszczak et al., 1980), cet effet est indirect et une activation des récepteurs GABAA portés par les neurones dopaminergiques induit quant à elle une inhibition rapide des neurones dopaminergiques. En effet, l'application péricellulaire de l'agoniste muscimol hyperpolarise la cellule (Waszczak et al., 1980), alors que celle d'antagonistes, comme la bicuculline ou la picrotoxine, augmente la fréquence de décharge et l'activité en bouffées de potentiels d'action (Johnson et North 1992 ; Sugita et al., 1992 ; Paladini et al., 1999). La rapidité de ces effets est au moins pour partie expliquée par la nature ionotrope des récepteurs GABAA (Seabrook et al., 1990 ; Johnson and North, 1992).

En contraste, l'activation des récepteurs GABAB localisés sur les neurones dopaminergiques du mésencéphale conduit à une inhibition sur une échelle temporelle plus longue. L'administration intra-VTA de l'agoniste baclofène réduit la fréquence de décharge et l'activité en bouffée de potentiels d'actions des neurones dopaminergiques, mais normalise également leur rythme d'activité (Erhardt et al., 2002). A l'opposé, l'application d'antagoniste augmente l'activité en bouffée de potentiels d'action et prévient les effets d'une application subséquente d'agoniste (Chen et al., 2005). La lenteur relative de la mise en place de l'inhibition associée à l'activation des récepteurs GABAB est pour partie due au fait que ces récepteurs sont métabotropiques. Des études sur tranche ont montré que des agonistes des récepteurs GABAB modulent l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale en activant des protéines G_i/G_o . Le dimère $\beta\gamma$ dissocié de sa protéine hétérotrimérique lie ainsi les canaux GIRK, ce qui a pour conséquence leur ouverture et la sortie de potassium, conduisant à l'hyperpolarisation la cellule et par la suite à l'inhibition de l'activité neuronale (Cruz et al., 2004). On remarquera que les mécanismes qui mènent à cette inhibition médiée par les récepteurs GABAB sont similaires à ceux induits par l'activation des autorécepteurs dopaminergiques D_2 .

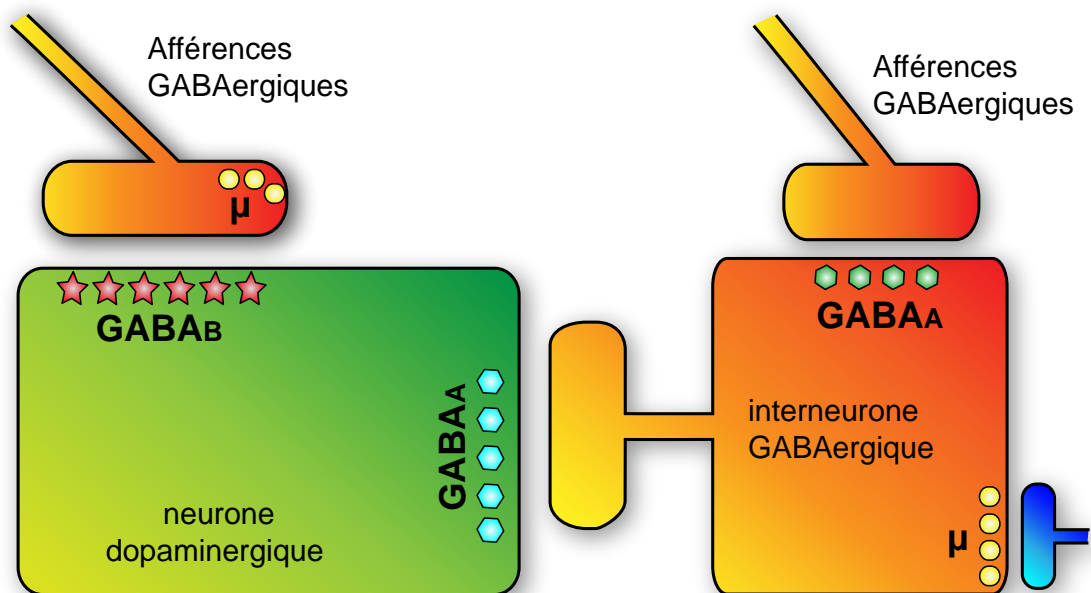


Figure 5: Schéma du système GABAergique de l'aire tegmentale ventrale. Cette illustration est réalisée d'après la figure 10 d'une publication de Klitenick et collaborateurs de 1992.

III) Sous-divisions fonctionnelles de l'aire tegmentale ventrale : aire tegmentale antérieure versus aire tegmentale postérieure

A) Evidences comportementales

La VTA est connue pour être une structure clé impliquée dans les mécanismes de récompense. Chez les rongeurs, de nombreuses drogues comme les opiacés (Bozarth et Wise, 1981 ; Welzl et al., 1989 ; Devine et Wise, 1994), la cocaïne (David et al., 2004), ou l'alcool (Gatto et al., 1994) induisent ainsi un effet renforçant quand elles sont directement injectées dans la VTA. Mais l'effet comportemental de drogues appliquées dans la VTA est en fait plus complexe. Une 1^{ère} étude d'Arnt et Scheel-Krüger en 1979 avait déjà montré que l'administration de modulateurs du système GABAergique dans différentes parties de la VTA provoquait des réponses locomotrices différentes. Ce n'est qu'à partir des années 2000 que de nombreux travaux ont montré une hétérogénéité fonctionnelle de la VTA. Cette région peut ainsi, en parallèle à ses sous-divisions morphologiques, se subdiviser en une VTA dite antérieure ou rostrale (aVTA) et une VTA dite postérieure ou caudale (pVTA). Cette distinction s'est faite sur des bases comportementales s'appuyant notamment sur le paradigme de préférence de place conditionnée et sur l'autoadministration intracérébrale de drogues. Ainsi, la cocaïne (Rodd et al., 2005 ; Lee et al., 2007), la nicotine (Ikemoto et al., 2006), les cannabinoïdes (Zangen et al., 2006), les opioïdes comme l'endomorphine 1 (Zangen et al., 2002), un peptide agoniste endogène des récepteurs μ , mais aussi l'éthanol (Rodd-Henricks et al., 2000 ; Ding et al., 2009a) ou l'un de ses métabolites, l'acétaldéhyde (Rodd-Henricks et al., 2002), s'autoadministrent dans la pVTA mais pas ou peu dans l'aVTA. De la même façon, les opiacés (Shabat-Simon et al., 2008) ou les cannabinoïdes (Zangen et al., 2006) n'entraînent une préférence de place que lorsqu'ils sont injectés dans la pVTA mais pas dans l'aVTA. Ces études montrent l'existence d'une hétérogénéité fonctionnelle antéropostérieure au sein de la VTA, la pVTA étant impliquée dans l'effet récompensant des drogues.

En parallèle à ces études sur les substances addictives, d'autres travaux confirment l'hétérogénéité fonctionnelle de la VTA. Ainsi, l'implication de nombreux systèmes de neurotransmission comme les systèmes dopaminergique (Ikemoto et al., 2002, 2006 ; Rodd et al., 2005, 2007, 2008 ; Ding et al., 2009b), sérotonergique (Rodd-Henricks et al., 2003 ; Rodd et al., 2005, 2007, 2008 ; Liu et al., 2006 ; Ding et al., 2009a) GABAergique (Ikemoto et al., 1997, 1998 ; Lee et al., 2007 ; Ding et al., 2009b) mais aussi cholinergique (Ikemoto et al., 2002) ou glutamatergique (Carlezon et al., 2000 ; Ikemoto, 2004 ; Shabat-Simon et al., 2008) ont été explorés. Des molécules comme le carbachol, un agoniste cholinergique (Ikemoto et

al., 2002, 2006), la néostigmine, un inhibiteurs de choline estérase (Ikemoto et al., 2002), mais aussi le CPBG (1-(m-chlorophényl)-biguanide), un agoniste 5-HT₃ (Rodd et al., 2007), ou encore le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Ikemoto, 2004) s'autoadministrent là encore dans la pVTA mais pas dans l'aVTA.

Finalement, une dernière série d'études utilisant la surexpression par vecteurs viraux de différentes protéines dans l'aVTA ou la pVTA semble importante à mentionner. Ces études sont intéressantes parce qu'elles suggèrent que ces deux sous-régions de la VTA ne médieraient pas simplement les propriétés récompensantes d'une substance mais plus largement les réponses à des stimulus émotionnels. Ainsi les surexpressions de la sous-unité GluR₁ du récepteur AMPA (Carlezon et al., 2000), de la phospholipase C γ (PLC γ) impliquée dans les cascades intracellulaires activées par les facteurs neurotrophiques (Bolaños et al., 2003) ou du facteur de transcription CREB (Olson et al., 2005) modulent de façons opposées les propriétés récompensantes des drogues ainsi que certains paramètres émotionnels selon que leurs surexpression a lieu dans l'aVTA ou la pVTA. Quand GluR₁, PLC γ ou CREB sont surexprimés dans l'aVTA, les propriétés récompensantes de la morphine mesurées grâce au paradigme de préférence de place sont augmentées, alors que la même dose de morphine devient aversive quand ces molécules sont surexprimées dans la pVTA (Carlezon et al., 2000 ; Bolaños et al., 2003 ; Olson et al., 2005). Des résultats semblables s'observent avec la cocaïne pour CREB (Olson et al., 2005) et avec le sucrose pour la PLC γ , même si dans ce dernier cas le sucrose ne devient pas aversif après surexpression dans la pVTA (Bolaños et al., 2003). Ces données sont renforcées par le fait qu'une surexpression de mCREB, un dominant négatif de CREB qui agit comme antagoniste, entraîne dans l'aVTA et la pVTA des conséquences opposées à celles d'une surexpression de CREB (Olson et al., 2005). Carlos Bolaños et collaborateurs montrent que cette différence aVTA/pVTA ne se limite pas à l'effet de molécules récompensantes. En effet, la surexpression de la PLC γ dans l'aVTA augmente l'anxiété, alors que la surexpression de cette molécule dans la pVTA diminue la latence d'immobilité dans le test de la nage forcée et augmente la sensibilité nociceptive.

Il reste à noter que la seule étude qui définit la limite entre aVTA et pVTA est celle de Valerie Olson (Olson et al., 2005). Pour ce faire, elle a injecté à différents niveaux antéropostérieurs de la VTA des vecteurs viraux permettant la surexpression de CREB ou de mCREB. Elle a ensuite testé l'effet d'injections systémiques de cocaïne dans un paradigme de préférence de place conditionnée. Elle a ainsi montré un point d'inflexion entre les effets récompensants et aversifs de la morphine. Ce point se situe à environ -5,5 mm du bregma et correspond neuroanatomiquement à l'apparition de l'IP (Figure 6).

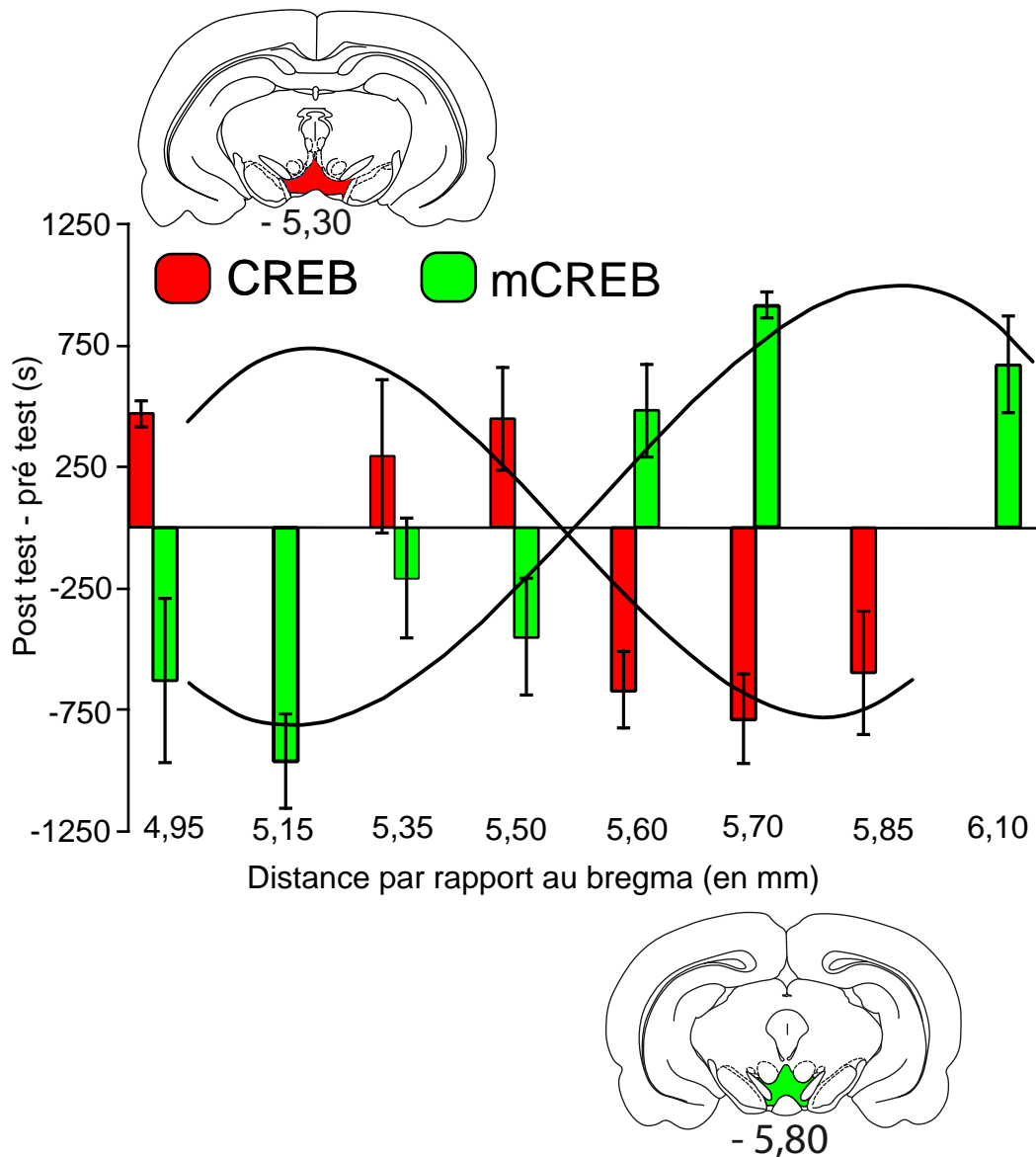


Figure 6 : Graphique illustrant les effets différentiels de la cocaïne après surexpression de CREB ou de mCREB dans l'aire tegmentale ventrale antérieure ou postérieure. Illustration réalisée d'après la figure 10 de l'article de Olson et collaborateurs de 2002. Les animaux ont reçu des injections d' HSV-CREBGFP ou d'HSV-mCREBGFP à divers niveaux de l'axe antéro-postérieur de l'aire tegmentale ventrale et ont été testés dans un paradigme de préférence de place conditionnée à la cocaïne. Les scores de préférence de place sont donnés en fonction du niveau d'injection des particules virales et révèlent un point d'inflexion à -5,5 mm par rapport au bregma. Ce point correspond à la limite entre aire tegmentale ventrale antérieure et aire tegmentale ventrale postérieure.

B) Mécanismes potentiels sous-tendant la dichotomie fonctionnelle aVTA/pVTA

Les discussions des articles portant sur les différences a/pVTA suggèrent 3 pistes d'explications potentielles à l'hétérogénéité fonctionnelle antéropostérieure de la VTA.

On trouve d'abord des théories neuroanatomiques. Elles se basent sur l'hypothèse que les connexions, afférences et/ou efférences, de l'aVTA et de la pVTA sont différentes. On sait par exemple que les projections de la VTA sur le NAc suivent une topie (Phillipson et Griffiths, 1985 ; Heimer et al., 1991 ; Berendse et al., 1992 ; Haber et al., 1997, 2000 ; Hasue et Shammah-Lagnado, 2002 ; Ikemoto, 2007), la pVTA projetant de façon importante sur la coquille (« shell ») connue pour médier les propriétés récompensantes des drogues (Ikemoto, 2007), alors que l'aVTA projette surtout sur le cœur (« core ») (Hasue et Shammah-Lagnado, 2002 ; Ikemoto, 2007). Ce patron de projection pourrait en partie expliquer pourquoi la pVTA semble plus importante que l'aVTA pour les phénomènes récompensants. D'autres études discutent l'hypothèse de connexions différentielles mettant en jeu des régions sérotonergiques comme le raphé (Hervé et al., 1987 ; Rodd et al., 2007), ou cholinergiques comme le PPTg ou le LDTg (noyau tegmental latérodorsal) (Shabat-Simon et al., 2008).

Une 2^{ème} théorie, mêlant neuroanatomie et neurochimie, se base sur la répartition des deux principaux types cellulaires de la VTA que sont les neurones dopaminergiques et GABAergiques. En effet, l'aVTA est plus riche en neurones GABAergiques qu'en neurones dopaminergiques alors que c'est l'inverse pour la pVTA (Olson et al., 2005 ; Ikemoto, 2007). Les gradients rostrocaudaux inverses entre ces 2 types neuronaux (Olson et al., 2005, 2007) (voir Introduction II) pourraient en partie expliquer l'hétérogénéité fonctionnelle de la VTA.

La 3^{ème} série de théories repose sur l'hypothèse que les neurones de l'aVTA et de la pVTA porteraient différents types de récepteurs voire différentes sous-unités d'un même récepteur. Divers systèmes de neurotransmission pourraient être mis en jeu. Si l'on considère par exemple le système GABAergique, deux études d'Ikemoto et McBride (Ikemoto et al., 1997, 1998) montrent que des rats s'autoadministrent la picrotoxine, un antagoniste GABAA, dans l'aVTA mais pas dans la pVTA. A l'opposé le muscimol, un agoniste GABAA s'autoadministre dans la pVTA mais pas dans l'aVTA. L'inactivation des récepteurs GABAA dans l'aVTA est donc renforçante alors que l'activation de ces mêmes récepteurs dans la pVTA l'est également. Ces travaux sont à l'origine d'une hypothèse, basée sur une régulation différente de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA liée à une localisation différentielle des récepteurs GABAA. Ainsi, il serait possible que dans l'aVTA, les récepteurs GABAA soient localisés directement sur les neurones dopaminergiques. Bloquer ces

récepteurs lèverait ainsi l'inhibition tonique des neurones dopaminergiques. A l'opposé dans la pVTA, les récepteurs GABA_A seraient plutôt sur les interneurons inhibiteurs GABAergiques. Dans ce cas, l'activation de ces récepteurs inhiberait les interneurons GABAergiques, induisant une levée d'inhibition tonique, c'est-à-dire une désinhibition des neurones dopaminergiques. Mais une telle localisation différentielle des récepteurs GABAergiques reste à prouver. On peut également citer l'implication des récepteurs dopaminergiques D₂/D₃ ou du récepteur serotonergique 5-HT₃. En effet, dans une de leurs études, Rodd et McBride montrent qu'une coadministration d'antagoniste 5-HT₃ ou de quinpirole, un antagoniste des récepteurs D₂/D₃, bloque l'autoadministration de cocaïne dans la pVTA (Rodd et al., 2004). Ils observent également que l'infusion par microdialyse inverse d'agoniste 5-HT₃ dans la pVTA augmente les taux locaux de dopamine extracellulaire, alors que ce n'est pas le cas après infusion dans l'aVTA (Liu et al., 2006). Ces résultats suggèrent une distribution hétérogène des récepteurs 5-HT₃ fonctionnels dans la VTA, avec une prévalence dans la pVTA, ce qui pourrait là encore participer à l'hétérogénéité fonctionnelle de la VTA.

Ces diverses théories ne sont bien sûr pas exclusives les unes des autres.

IV) La queue de l'aire tegmentale ventrale

A) De l'expression de Δ FosB à la découverte de la tVTA

Grâce à de nombreuses études réalisées chez le rat ou la souris, il est connu que l'exposition aiguë à une drogue entraîne l'expression transitoire des facteurs de transcription cFos et FosB (Graybiel et al., 1990 ; Young et al., 1991 ; Hope et al., 1992), alors qu'une exposition chronique induit l'accumulation d'une forme tronquée de FosB issue d'un épissage alternatif : Δ FosB. (Hope et al., 1994b ; Nye et al., 1995 ; Moratalla et al., 1996 ; Nye et Nestler, 1996 ; Hiroi et al., 1997 ; Pich et al., 1997). Cette accumulation de Δ FosB a aussi été observée avec d'autres types de traitements chroniques, par exemple après thérapie électroconvulsive (Hope et al., 1994a ; Hiroi et al., 1998), lors d'un stress chronique (Perrotti et al., 2004) ou après traitement par des antipsychotiques (Hiroi et Graybiel, 1996 ; Vahid-Ansari et al., 1996 ; Atkins et al., 1999 ; Rodriguez et al., 2001a,b ; Kontkanen et al., 2002 ; Andersson et al., 2003). Par des techniques d'immunotransfert (Western blot), l'induction de Δ FosB après exposition chronique à des drogues a été observée dans de nombreuses structures incluant le NAc, l'amygdale, le PFC (Hope et al., 1994a ; Nye et al., 1995 ; Nye et Nestler, 1996 ; Pich et al., 1997), mais jamais dans la VTA. Ceci semblait paradoxal sachant que cette région est fortement impliquée dans les comportements motivés et plus particulièrement dans les mécanismes liés aux effets des drogues (Wise, 1988, 1996).

En utilisant une technique plus précise neuroanatomiquement, l'immunohistochimie, Linda Perrotti et Michel Barrot ont en fait pu observer l'accumulation de Δ FosB dans la VTA suite à des traitements chroniques par différentes drogues chez le rat (Perrotti et al., 2005). Elle était toutefois limitée à une région spécifique, très postérieure, de la VTA. Et de plus restreinte aux neurones GABAergiques, ne touchant pas les neurones dopaminergiques de la VTA. Cette sous-région fut ainsi nommée queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale ou tVTA.

Contrairement à d'autres régions cérébrales, comme le complexe striatal ou le PFC pour lesquelles l'accumulation de Δ FosB s'observe non seulement avec toute drogue provoquant une dépendance mais aussi avec diverses autres stimulations chroniques (McClung et al., 2004), l'accumulation de Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA semble spécifique aux psychostimulants : elle s'observe après administration répétée de cocaïne ou d'amphétamine, mais pas après morphine chronique ou stress chronique (Perrotti et al., 2005). Par contre, comme dans les autres régions cérébrales, cette accumulation de

Δ FosB semble stable puisqu'elle reste encore détectable deux semaines après la dernière injection de cocaïne (Perrotti et al., 2005). Cette présence de Δ FosB persistante même après sevrage, contraste avec l'induction de cFos et de FosB en général rapide, transitoire et sujette à une désensibilisation avec la chronicité du stimulus (Chen et al., 1997 ; Alibhai et al., 2007). Les bases moléculaires de cette accumulation de Δ FosB sont complexes mais commencent néanmoins à être mieux connues. La stabilité de cette protéine viendrait de l'absence en position C-terminale de régions promotrices de la dégradation protéique (Carle et al., 2007), ainsi que de phosphorylations, notamment d'un résidu sérine (Ser27) par la caséine kinase II, protégeant de l'adressage aux protéosomes (Ulery et al., 2006 ; Ulery-Reynolds, 2009).

Dans la première publication décrivant la tVTA, Linda Perrotti et collaborateurs (2005) montrent aussi qu'un traitement systémique chronique au GRB12909, inhibiteur spécifique de la recapture de la dopamine, entraîne l'accumulation de Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA, ce qui n'est pas le cas d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ou de la noradrénaline. Ceci suggère que la capacité de recapture de la dopamine par la cocaïne ou l'amphétamine est suffisante pour induire ce phénomène.

B) Un nouveau regard sur la bibliographie : évidences de l'existence de la tVTA

Grâce aux recherches bibliographiques effectuées lors de cette thèse, je me suis vite rendue compte que, préalablement à la définition explicite de la tVTA, cette région avait déjà été observée par le passé. Un des exemples les plus marquants vient d'une étude de référence d'Herkenham et Nauta en 1979 sur les efférences de la LHb. Dans la figure 7, on découvre une très belle photo d'un marquage antérograde observé dans la décussation du *brachium conjunctivum*, suite à l'injection d'acide aminé tritié dans la LHb. La région de ce marquage correspond à ce que nous nommons maintenant tVTA. C'est la plus ancienne photo illustrant la tVTA trouvée dans la bibliographie. Elle met en outre en évidence la projection de la LHb sur la tVTA, une projection au centre d'une émulation scientifique très intense ces deux dernières années (voir Discussion Générale II-B). En dehors de cette étude neuroanatomique, on retrouve également deux travaux qui observent, comme nous-mêmes, l'induction de facteurs de transcription de la famille Fos dans la tVTA suite à un traitement par des molécules psychostimulantes. Ainsi, une injection aiguë de nicotine (Pang et al., 1993) ou de modafinil (Provigil®) (Scammell et al., 2000), un psychostimulant non addictif utilisé dans le traitement de la narcolepsie, induit l'expression de c-Fos dans une région correspondant à la

tVTA. De manière très intéressante, Scammel et collaborateurs la désigne même comme « retro-VTA ».

Rétrospectivement, ces considérations me permettent aujourd'hui de réaliser que l'étude bibliographique est un formidable outil de recherche. De très nombreuses données permettant l'identification et la compréhension du ou des rôles de la tVTA sont vraisemblablement présentes dans l'abondante littérature existante, mais devant cette multitude de données scientifiques accumulées il faut faire preuve de persévérance mais surtout avoir beaucoup de chance pour « re »-découvrir ces informations.

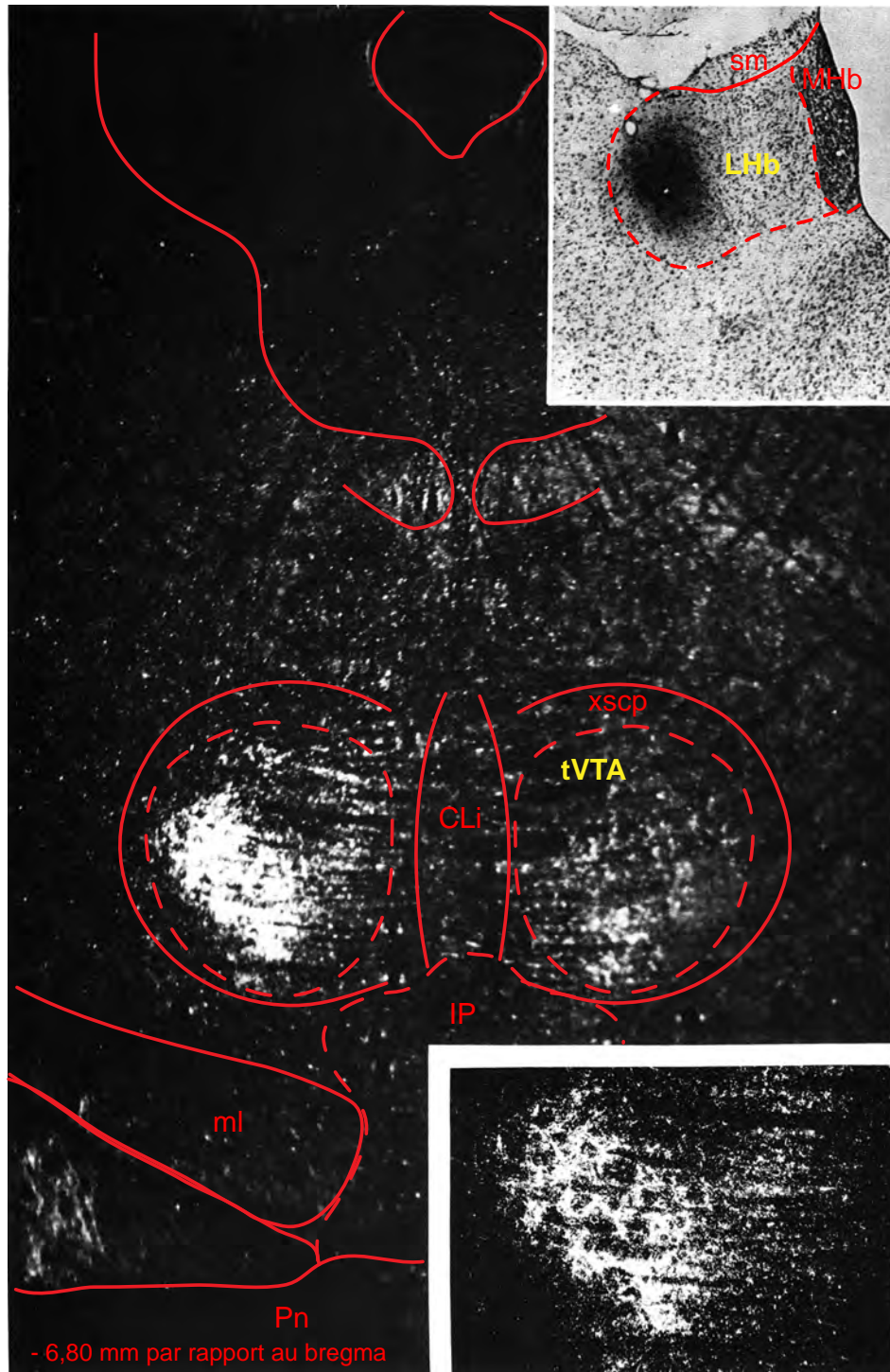


Figure 7 : Illustration de la projection de l'habénula latérale sur la queue de l'aire tegmentale ventrale. Ces photographies sont issues de la figure 9 d'une publication de Herkenham et de Nauta de 1979. Après une injection de traceur antérograde (acides aminés tritiés) dans l'habénula latérale (illustration en haut à droite), ils observent un important marquage antérograde dans la décussation du pédoncule cérébelleux supérieur (illustration au centre et détail en bas à droite). Cette région correspond à la queue de l'aire tegmentale ventrale connue pour être enchassée dans la décussation du pédoncule cérébelleux supérieur. Cette photographie représente la première illustration connue de ce qui est aujourd'hui désigné comme la queue de l'aire tegmentale ventrale.

Abréviations : Cli : n. linéaire caudal ; IP : n. interpédonculaire ; LHb : habénula latérale ; MHb : habénula médiale ; ml : lemnisque médian ; Pn : pont ; tVTA : queue de l'aire tegmentale ventrale ; xscp : décussation du pédoncule cérébelleux supérieur.

V) Objectifs du doctorat

Afin de mieux comprendre cette région jusqu'alors non explorée de l'encéphale qu'est la queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale, mon travail de doctorat a consisté dans un premier temps en sa caractérisation neuroanatomique. J'ai ensuite commencé à entrevoir les potentialités fonctionnelles de la tVTA, grâce d'une part à l'étude électrophysiologique de la projection de la tVTA sur la VTA dopaminergique, mais également en identifiant les stimulus pharmacologiques induisant les facteurs de transcription de la famille Fos dans les neurones GABAergiques de cette région.

La 1^{ère} partie de mon travail est double. J'ai tout d'abord cherché à définir la localisation et les limites de la tVTA chez le rat. Pour cela, j'ai réalisé une série d'immunohistochimies sur coupes frontales et sagittales de cerveaux. L'immunoréactivité FosB induite dans la tVTA par la cocaïne et l'immunoréactivité GAD, permettant l'identification des neurones GABAergiques, ont permis de visualiser la tVTA. L'immunoréactivité TH a permis de révéler les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA, ce qui sert de repère visuel à la localisation de la tVTA par rapport au reste de l'encéphale. Ces marquages ont également permis de montrer qu'un traitement aigu à la cocaïne est suffisant à l'induction de FosB dans la tVTA.

Dans un second temps, j'ai caractérisé les entrées ou afférences à la tVTA. Cela a été réalisé en utilisant la technique de traçage neuroanatomique. Le Fluoro-Gold® (FG) et la sous-unité bêta de la toxine cholérique (CTB), deux traceurs rétrogrades injectés directement dans la tVTA ou dans les régions adjacentes, sont à la base de ce travail. Certaines projections ont également été vérifiées grâce à des injections de BDA, un traceur antérograde. Ces études ont mené à la publication d'un premier article.

→ **Chapitre 1** : Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597-621.

La 2^{ème} partie de mon travail a consisté en l'identification des sorties ou efférences de la tVTA. Ceci a été réalisé, là aussi, grâce à la technique de traçage neuroanatomique et plus particulièrement grâce à l'injection de BDA dans la tVTA. Une étude neuroanatomique plus poussée de la sortie majeure de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA a également été effectuée. En combinant traçage neuroanatomique multiple et

immunohistochimie nous avons notamment caractérisé la projection de la tVTA sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques. Cette étude a abouti à une seconde publication.

→ **Chapitre 2** : Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67:88-92.

La 3^{ème} partie de mon travail porte sur l'étude électrophysiologique de la projection de la tVTA sur l'a/pVTA. Grâce à l'enregistrement unitaire, de neurones dopaminergiques et non dopaminergiques de l'a/pVTA, couplé à la stimulation de la tVTA, j'ai évalué l'influence de la tVTA sur ces neurones. Ces données restent à compléter et constituent le troisième chapitre de ce manuscrit.

→ **Chapitre 3** : Kaufling J, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Influence de la tVTA sur l'activité électrique des neurones dopaminergiques de la VTA.

Finalement la 4^{ème} partie de mon travail est une caractérisation pharmacologique des substances provoquant l'induction de FosB dans la tVTA. Comme décrit précédemment, Linda Perrotti et Michel Barrot (Perrotti et al., 2005) ont montré qu'un traitement chronique par deux psychostimulants, cocaïne et amphétamine, accumule FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA alors que ce n'est pas le cas pour la morphine. Ils ont également observé qu'un traitement chronique par le GBR12909, inhibiteur de la recapture de la dopamine, mais pas par la fluoxétine ou la nortriptyline, respectivement inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, accumule FosB/ Δ FosB dans la tVTA.

Mon travail a consisté à élargir et à étoffer ces résultats. Nous avons déjà observé qu'un traitement aigu par la cocaïne était suffisant à l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA (Kaufling et al., 2009). Ce résultat a permis de réduire considérablement la durée des expérimentations et de tester l'effet d'injections aiguës d'un grand nombre de molécules sur l'induction de FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA. Nous avons ainsi testé plusieurs psychostimulants, d'autres « groupes » de drogues que sont les sédatifs et les perturbateurs mais également des anticonvulsivants. Un intérêt particulier pour les molécules bloquant la recapture des monoamines a complété ce travail. Ces études ont mené à un manuscrit en cours d'évaluation.

→ **Chapitre 4** : Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure.

RESULTATS

- Chapitre 1 :** AFFERENTS TO THE GABAERGIC TAIL OF THE VENTRAL TEGMENTAL AREA IN THE RAT.
- Chapitre 2 :** GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID CELLS WITH COCAINE-INDUCED DELTAFOSB IN THE VENTRAL TEGMENTAL AREA INNERVATE MESOLIMBIC NEURONS.
- Chapitre 3 :** INFLUENCE DE LA tVTA SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA VTA.
- Chapitre 4 :** PHARMACOLOGICAL RECRUITMENT OF THE GABAERGIC TAIL OF THE VENTRAL TEGMENTAL AREA BY ACUTE DRUG EXPOSURE.

Chapitre 1

AFFERENTS TO THE GABAERGIC TAIL OF THE VENTRAL TEGMENTAL AREA IN THE RAT

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

The Journal of Comparative Neurology (2009) 513:597-621.

Afférences à la queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale

L'aire tegmentale ventrale est une région impliquée notamment dans la dépendance aux drogues et dans les comportements motivés (Robbins and Everitt, 1996 ; Chao and Nestler, 2004). Cependant, contrairement au noyau accumbens (NAc) ou au cortex préfrontal (PFC), l'induction des facteurs de transcription FosB/ Δ FosB dans la VTA n'avait jusqu'à récemment pas été observée suite à l'injection de drogues. En 2005, Linda Perrotti et collaborateurs ont montré qu'un traitement chronique par deux psychostimulants, la cocaïne et l'amphétamine, entraîne l'accumulation de FosB/ Δ FosB dans une sous-population de neurones GABAergiques présents dans le tiers postérieur de la VTA. Cette région fut alors nommée queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA).

Devant le peu de connaissances sur cette nouvelle région de l'encéphale, j'ai dans un premier temps réalisé une série d'immunohistochimies et de représentations graphiques permettant une meilleure localisation de la tVTA et de ses limites au sein de l'encéphale. Cette « définition » de la tVTA a été facilitée par la découverte qu'une injection aiguë de cocaïne est suffisante à l'induction du marqueur de plasticité FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA.

Nous avons ensuite, grâce à l'injection de différents traceurs, caractérisé les afférences à la tVTA. Nous avons ainsi montré que les entrées à la tVTA sont globalement les mêmes que celles décrites pour le reste de la VTA (Geisler et Zahm, 2005). Celles-ci sont nombreuses et issues d'un continuum allant du PFC au tronc cérébral. Ces résultats corroborent l'appartenance de la tVTA à la VTA.

Dans une dernière partie nous avons aussi montré que les entrées à la tVTA, issues du locus coeruleus (LC) et du raphé dorsal (DR) ne sont pas monoaminergiques. Nous observons également que les afférences à la tVTA issues de l'hypothalamus latéral (LH) ne sont pas orexinergiques.

Afferents to the GABAergic Tail of the Ventral Tegmental Area in the Rat

JENNIFER KAUFLING, PIERRE VEINANTE, SOPHIE A. PAWLOWSKI, MARIE-JOSE FREUND-MERCIER,
AND MICHEL BARROT*

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Strasbourg,
F-67084 Strasbourg, France

ABSTRACT

We previously showed that chronic psychostimulant exposure induces the transcription factor DeltaFosB in γ -aminobutyric acid (GABA)ergic neurons of the caudal tier of the ventral tegmental area (VTA). This subregion was defined as the *tail of the VTA* (tVTA). In the present study, we showed that tVTA can also be visualized by analyzing FosB/DeltaFosB response following acute cocaine injection. This induction occurs in GABAergic neurons, as identified by glutamic acid decarboxylase (GAD) expression. To characterize tVTA further, we mapped its inputs by using the retrograde tracers Fluoro-Gold or cholera toxin B subunit. Retrogradely labeled neurons were observed in the medial prefrontal cortex, the lateral septum, the ventral pallidum, the bed nucleus of the stria terminalis, the substantia innominata, the medial and lateral preoptic areas, the lateral

and dorsal hypothalamic areas, the lateral habenula, the intermediate layers of the superior colliculus, the dorsal raphe, the periaqueductal gray, and the mesencephalic and pontine reticular formation. Projections from the prefrontal cortex, the hypothalamus, and the lateral habenula to the tVTA were also shown by using the anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA). We showed that the central nucleus of the amygdala innervates the anterior extent of the VTA but not the tVTA. Moreover, the tVTA mainly receives non-aminergic inputs from the dorsal raphe and the locus coeruleus. Although the tVTA has a low density of dopaminergic neurons, its afferents are mostly similar to those targeting the rest of the VTA. This suggests that the tVTA can be considered as a VTA subregion despite its caudal location. *J. Comp. Neurol.* 513:597–621, 2009.

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: cocaine; connections; Fluoro-Gold; inputs; DeltaFosB; VTA

The ventral tegmental area (VTA) is a ventromedial group of cells that belongs to the mesencephalic reticular formation and includes the A10 dopaminergic area. It was first defined in the opossum by Tsai in 1925, and later identified in a variety of other species, including rodents and humans (Phillipson, 1979; Swanson, 1982; Oades and Halliday, 1987). The dopaminergic projection from the VTA to the nucleus accumbens (Acb) and prefrontal cortex (PFC), known as the mesolimbic projection, is widely studied in the context of drug abuse and other motivated behaviors (Robbins and Everitt, 1996; Chao and Nestler, 2004).

Exposure to drugs of abuse induces the accumulation of DeltaFosB, a stable truncated splice variant of the *fosB* gene (Nestler et al., 2001; McClung et al., 2004). This was reported for different brain regions, including the Acb, the dorsal striatum, or the PFC (Hope et al., 1992; Nye and Nestler, 1996; Pich et al., 1997). More recently, we showed that DeltaFosB is also expressed in the VTA following chronic exposure to psychostimulants, such as cocaine or amphetamine (Perrotti et al., 2005). This psychostimulant-induced expression of DeltaFosB in the VTA displays two important features: it is essentially present in γ -aminobutyric acid (GABA)ergic neu-

rons and it is specifically localized in the most caudal extent of the VTA (Perrotti et al., 2005). This specific localization led to the naming of this subregion *tail of the VTA* (tVTA).

The functional heterogeneity of the VTA along its rostrocaudal extent was first assessed in behavioral studies by using local injections or local intracranial self-administration procedures (Carlezon et al., 2000; Rodd-Henricks et al., 2000; Ikemoto and Wise, 2002; Zangen et al., 2002; Bolanos et al., 2003; Olson et al.,

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: the Fondation pour la Recherche Médicale; Grant sponsor: the Université de Strasbourg; Grant sponsor: the Centre National de la Recherche Scientifique; Grant number: UMR7168; Grant sponsor: the European Commission (ENINET project); Grant number: LHSM-CT-2005-019063.

*Correspondence to: Michel Barrot, Ph.D., Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France. E-mail: mbarrot@neurochem.u-strasbg.fr

Received 30 October 2007; Revised 3 July 2008; Accepted 23 December 2008

DOI 10.1002/cne.21983

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

2005; Rodd et al., 2005a,b; Ikemoto et al., 2006). These studies led to functional differentiation of the anterior VTA (aVTA) from the posterior VTA (pVTA, enriched in dopaminergic neurons). The aVTA and the pVTA can be anatomically differentiated by their position with respect to the interpeduncular nucleus (IP) (Olson

et al., 2005). However, these two subregions only cover the rostral and central tiers of the VTA. The caudalmost tier, corresponding to the tVTA, is mainly GABAergic and remains poorly known. It can be functionally identified by DeltaFosB induction following treatment with psychostimulants (Perrotti et al., 2005).

Abbreviations

3	oculomotor nucleus	M2	secondary motor cortex
A8	A8 dopamine cells	MA3	medial accessory oculomotor nucleus
ABC	avidin-biotin-peroxidase complex	MCPO	magnocellular preoptic nucleus
ac	anterior commissure	MGP	medial globus pallidus
Acb	accumbens nucleus	MHb	medial habenular nucleus
AcbC	accumbens nucleus, core	ml	medial lemniscus
AcbSh	accumbens nucleus, shell	ML	medial mammillary nucleus, lateral
AH	anterior hypothalamic area	mlf	medial longitudinal fasciculus
AHC	anterior hypothalamic area, central part	MM	medial mammillary nucleus, medial
AI	agranular insular cortex	MnR	median raphe nucleus
AP	anteroposterior	mp	mammillary peduncle
Aq	aqueduct (Sylvius)	MPB	medial parabrachial nucleus
aVTA	anterior VTA	MPO	medial preoptic nucleus
BDA	biotinylated dextran amine	mt	mammillothalamic tract
BLA	basolateral amygdaloid nucleus, anterior part	MT	medial terminal nucleus of the accessory optic tract
BST	bed nucleus of the stria terminalis	opt	optic tract
CeA	central nucleus of the amygdala	OX	prepro-orexin
CeC	central nucleus of the amygdala, capsular	Pa	paraventricular hypothalamic nucleus
CeL	central nucleus of the amygdala, lateral division	PaV	paraventricular hypothalamic nucleus, ventral part
CeM	central nucleus of the amygdala, medial division	PAG	periaqueductal gray
Cg	cingulate cortex	PB	parabrachial nucleus
ChAT	choline acetyltransferase	PBS	phosphate-buffered saline
CI	claustrum	PF	parafascicular thalamic nucleus
CLi	caudal linear nucleus of the raphe	PFC	prefrontal cortex
cp	cerebral peduncle, basal part	PH	posterior hypothalamic area
CPu	caudate putamen (striatum)	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin
DA	dorsal hypothalamic area	Pn	pontine nuclei
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride	PN	paranigral nucleus
DMTg	dorsomedial tegmental area	PnC	pontine reticular nucleus, caudal part
DP	dorsal peduncular cortex	PnO	pontine reticular nucleus, oral part
DpMe	deep mesencephalic nuclei	PnR	pontine raphe nucleus
DpSC	deep layers of the superior colliculus	PMnR	paramedian raphe nucleus
DR	dorsal raphe nucleus	PPTg	pedunculopontine tegmental nucleus
DTg	dorsal tegmental nucleus	pVTA	posterior VTA
ec	external capsule	PR	prerubral field
FG	Fluoro-Gold	PrL	prelimbic cortex
f	fornix	PV	paraventricular thalamic nucleus
fmi	forceps minor corpus callosum	R	red nucleus
fr	fasciculus retroflexus	RLi	rostral linear nucleus of raphe
GABA	γ -aminobutyric acid	RR	retrobulbar nucleus
GAD	glutamic acid decarboxylase	RS	retrosplenial agranular cortex
Gl	gigantocellular reticular nucleus	S	subiculum
HBD	nucleus of the horizontal limb of the diagonal band	S1	primary somatosensory cortex
ic	internal capsule	S1J	primary somatosensory cortex, jaw region
IF	interfascicular nucleus	SC	superior colliculus
IL	infralimbic cortex	scp	superior cerebellar peduncle
InSC	intermediate layers of the superior colliculus	SI	substantia innominata
i.p.	intraperitoneal	SIB	substantia innominata, basal part
IP	interpeduncular nucleus	sm	stria medullaris of thalamus
IPAC	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure	SNC	substantia nigra, compact part
IPAC(M)	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure, medial part	SNCD	substantia nigra, compact part, dorsal tier
L	lateral	SNL	substantia nigra, lateral part
LC	locus coeruleus	SNR	substantia nigra, reticular part
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus	SuM	supramammillary nucleus
lfp	longitudinal fasciculus of pons	SuSc	superficial layers of the superior colliculus
LGP	lateral globus pallidus	TC	tuber cinereum area
LH	lateral hypothalamic area	TH	tyrosine hydroxylase
LHb	lateral habenula	tth	trigeminothalamic tract
LM	lateral mammillary nucleus	TrpH	tryptophan hydroxylase
LPB	lateral parabrachial nucleus	tVTA	tail of the ventral tegmental area
LPO	lateral preoptic area	V	vertical
LS	lateral septum	VP	ventral pallidum
LSI	lateral septal nucleus, intermediate part	VTA	ventral tegmental area
M	medial mammillary nucleus	VTg	ventral tegmental nucleus
M1	primary motor cortex	VTRZ	visual tegmental relay zone
		xscp	superior cerebellar peduncle decussation
		ZI	zona incerta

The aim of the present study was to identify the neuroanatomical inputs to the tVTA, which is critical for a better understanding of this subregion. We show that FosB/DeltaFosB induction following an acute cocaine injection allows a clear identification of the tVTA. By using tract-tracing and immunohistochemical approaches, we then did a mapping and characterization of the tVTA afferents.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The results were obtained from 66 male Sprague-Dawley rats (280–340 g, Janvier, Le Genet-St-Isle, France). Animals were housed under standard conditions (22°C, 12/12-hour light/dark cycle with lights on at 7 a.m.), with food and water available ad libitum. The procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/6609/EEC.

Intraperitoneal (i.p.) cocaine hydrochloride injection (20 mg/kg in 0.9% NaCl; 1 mL/kg) (Cooper, Melun, France) was used to identify the tVTA by FosB-like immunohistochemistry (Perrotti et al., 2005). Acute cocaine injection was performed 3 hours before the animal was perfused. For the mapping of FosB-like immunostaining, the control animals received an i.p. injection of 0.9% NaCl.

Tracer injection

Rats were anesthetized with an i.p. injection of ketamine (87 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg), and were placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). The stereotaxic injection coordinates relative to bregma (Paxinos and Watson, 1998) were as follows: tVTA, anteroposterior (AP) = -6.3 mm, lateral (L) = +1.6 mm, vertical (V) = -7.6 mm, with a 6° lateral angle; control injection dorsal to tVTA, AP = -6.3 mm, L = +1.6 mm, V = -6.8 mm, with a 6° lateral angle; control injection caudal to tVTA, AP = -7.8 mm, L = +1.6 mm, V = -8.6 mm, with a 6° lateral angle; control injection lateral to tVTA, AP = -6.3 mm, L = +2.4 mm, V = -7.6 mm, with a 6° lateral angle; prefrontal cortex (PFC), AP = -2.7 mm, L = +0.6 mm, V = -5 mm; lateral habenula (LHb), AP = -3.5 mm, L = +0.7 mm, V = -4.8 mm; central nucleus of the amygdala (CeA), AP = -2.2 mm, L = +4.3 mm, V = -7.2 mm; medial mammillary nucleus (M), AP = -4.6 mm, L = +0.5 mm, V = -8.7 mm; continuum from the preoptic area to the lateral hypothalamic area (LH), AP between 0.0 mm and -1.5 mm, L between +1.6 mm and +2.0 mm, V = -8.0 mm. Verticality was taken from the dura.

We first used either aminostilbamidine methanesulfonate (2% in 0.45% NaCl; FluoProbes, Montluçon, France) or hydroxystilbamidine methanesulfonate (Fluoro-Gold, 2% in 0.9% NaCl; Fluorochrome, Englewood, CO) as retrograde tracers. These molecules display similar properties; we therefore used the abbreviation FG for both tracers in the following text. These tracers were unilaterally delivered into the tVTA by using a glass micropipette (tip diameter: 10–40 μm) and iontophoretic ejection (Midgard source, +1 μA to +3 μA, 7-second on/off cycles for 10–20 minutes). After ejection, the micropipette was left in place for 10 minutes before removal. Control injections of FG were also performed dorsal, caudal, and lateral to the tVTA. tVTA is partially embedded within a region with a large number of fibers of passage, which increases the risk of artifacts due to the capture of the tracer by

these fibers. In a separate set of animals, we thus injected another retrograde tracer in the tVTA, the cholera toxin B subunit (CTB; 0.25% in 0.1 M Tris, 0.1% NaCl; Sigma, St. Louis, MO), which is less prone to uptake by passing fibers. CTB was delivered by using glass micropipettes (tip diameter: 15–30 μm) and iontophoretic ejection (Midgard source, +5 μA or +6 μA, 7-second on/off cycles for 15 minutes).

The anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA; MW 10,000; 5% in 0.25 M potassium acetate; Molecular Probes, Eugene, OR) was either microinjected by pressure or iontophoretically delivered (Midgard source, +1 μA to +3 μA, 7-second on/off cycles for 10–20 minutes). Pressure injection (0.5 μL delivered at 0.1 μL/30 seconds with a 33-G Hamilton syringe) was used for large injections in the PFC. For all other brain areas, we used iontophoretic injections with glass micropipettes (tip diameter: 10–40 μm).

Histochemistry

One week following tracer injection and/or 3 hours following cocaine injection, rats were perfused under deep chloral hydrate anesthesia (800 mg/kg) with 100 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) followed by 500 mL of a paraformaldehyde solution (4% in phosphate buffer). Brains were removed and postfixed overnight in the same fixative. They were subsequently cut following the frontal plane on a Vibratome (VT 1000S, Leica, Deerfield, IL) at 50, 40, or 30 μm depending on the experiment. Sections were done from the prefrontal cortex to the level of the parabrachial nucleus. They were serially collected in phosphate buffer with 0.9% NaCl (PBS). The brains of three cocaine-injected animals were cut following the sagittal plane (50-μm thickness) to illustrate the ventro-dorsal shift of tVTA location along the rostrocaudal axis (see Supplementary Fig. S1).

For immunohistochemistry, sections were washed in PBS (3 × 10 minutes), incubated for 15 minutes in a 1% H₂O₂/50% ethanol solution if used for a peroxidase reaction, washed in PBS (3 × 10 minutes), and incubated in PBS containing Triton X-100 and 5% donkey serum for 45 minutes. Sections were then incubated overnight at room temperature in PBS with Triton X-100, 1% donkey serum, and primary antibody. Triton X-100 was used at 0.5%, except for glutamic acid decarboxylase (GAD) immunohistochemistry, for which it was lowered to 0.2% to reduce process staining and facilitate cell body identification.

We used the following primary antibodies:

1. Rabbit anti-FG polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, cat. no. AB153; dilution 1:50,000) (Geisler and Zahm, 2005). The immunogen used to produce this antibody was hydroxystilbamidine (Chemicon datasheet), which is not physiologically present in the organism. No positive cell was detected on brain sections of animals without FG injection. In rats with stereotaxic injection of FG, the staining was restricted to the injection site and to positive cells that were thus considered retrogradely labeled.
2. Rabbit anti-cholera toxin polyclonal antibody (Sigma, cat. no. C 3062; dilution 1:20,000). The immunogen used to produce this antibody was the purified toxin from *Vibrio cholerae* (Sigma datasheet), which is not physiologically present in the organism. No positive cell was detected on brain sections of animals without CTB injection.

3. Rabbit anti-FosB polyclonal antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, cat. no. SC-48; dilution: 1:2,000 for peroxidase reaction and 1:200 for immunofluorescence). This antibody was raised against amino acids 102–117 of the transcription factor FosB. It recognizes a band at 45 kDa corresponding to FosB and bands at 35 and 37 kDa corresponding to DeltaFosB isoforms on Western blot from rat striatum after repeated cocaine exposure. The staining obtained with this antibody is restricted to nuclei, and the preincubation with the blocking peptide (Santa-Cruz Biotechnology, cat. no. SC-48P) results in lack of signal.
 4. Goat anti-FosB polyclonal antibody (Santa-Cruz Biotechnology, cat. no. SC-48G; dilution 1:200 for immunofluorescence). This antibody was raised against the same immunogen as the above rabbit anti-FosB antibody (Santa-Cruz Biotechnology datasheet). Cocaine-induced staining in tVTA obtained with SC-48G was similar to that observed with SC-48. The goat antibody was specifically used to confirm the location of the CTB injection sites within tVTA by double immunofluorescence.
 5. Sheep anti-tyrosine hydroxylase (TH) polyclonal antibody (Chemicon, cat. no. AB1542; dilution 1:1,000). This antibody was raised against a sodium dodecyl sulfate-denatured TH from rat pheochromocytoma (Chemicon datasheet; Pavon et al., 2006). It recognizes a single band of 62 kDa molecular weight on Western blot from PC12 cells stimulated with okadaic acid (Chemicon datasheet). The staining obtained with this antibody is cytoplasmic and is present in both cell bodies and fibers. The specificity of this antibody is supported by the neuroanatomical location of the staining: for example, we observed TH-positive cell bodies and fibers in the VTA, in the compact part of the substantia nigra (SNc) or in the locus coeruleus (LC), but not in the surrounding areas; we also observed a dense staining of TH-positive fibers in the brain regions that constitute the striatal complex, with no cell body staining in these brain regions.
 6. Mouse anti-GAD 67-kDa monoclonal antibody (Chemicon, cat. no. MAB5406; dilution 1:10,000). This antibody was raised against a recombinant fusion protein containing the N-terminal regions (amino acids 4–101) of human GAD 67 kDa that are not shared by GAD 65 kDa (Chemicon datasheet; King et al., 2006). It recognizes a single band of 67 kDa molecular weight on Western blot from rat brain lysate (Chemicon datasheet). The staining obtained with this antibody is cytoplasmic and is present in both cell bodies and fibers. We used cerebellum sections to confirm that Purkinje cells were positive for GAD staining with this antibody, whereas granule cells were negative.
 7. Rabbit anti-prepro-orexin (OX) polyclonal antibody (Chemicon, cat. no. AB3096; dilution 1:400). This antibody was raised against the last 17 amino acids (CPTATATALA-PRGGSRV, also designed as PPOXA11-A) of the C-terminus region of mouse OX (Chemicon datasheet; Georgescu et al., 2003). It recognizes a single band of 16 kDa molecular weight on Western blot from rat tissue. The staining obtained with this antibody is cytoplasmic. The neuroanatomical location of the staining is in agreement with the literature (Peyron et al., 1998). The OX staining of cell bodies was restricted to the perifornical nucleus and to the dorsal (DA) and lateral (LH) hypothalamic areas, and no cellular staining was observed in other brain regions. We previously showed that the hypothalamic cell population stained by this OX antibody was distinct from the cell population expressing melanin-concentrating hormone (Georgescu et al., 2003, 2005).
 8. Sheep anti-tryptophan hydroxylase (TrpH) polyclonal antibody (Chemicon, cat. no. AB1541; dilution 1:500). This antibody was raised against a recombinant rabbit TrpH (full protein) (Chemicon datasheet; Benarroch et al., 2005). It recognizes a major band of 55 kDa molecular weight on Western blot from rat dorsal raphe that corresponds to TrpH; a less intense band can be observed at 62–65 kDa, indicating a partial cross-reactivity with TH (Chemicon datasheet). The staining obtained with this antibody is cytoplasmic. TrpH-positive cell bodies were present in the raphe nucleus. The cross-reactivity with TH did not affect our conclusions, as 99% of FG-positive cells within the raphe nucleus were TrpH negative.
 9. Goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) affinity-purified immunoglobulin (Chemicon, cat. no. AB144P; dilution 1:500). This antibody was raised against human placental ChAT (full protein). It recognizes a single band of 68–70 kDa molecular weight on Western blot from rat brain lysate. The staining obtained with this antibody is cytoplasmic, and its neuroanatomical location is in agreement with the known pattern of ChAT expression (Kimura et al., 1980). In the rostral forebrain, the highest concentration of ChAT-positive cells was found in the septal area and in the basal part of the diagonal band.
- The optimal antibody concentrations were individually determined for each antibody. Control experiments omitting primary antibodies confirmed the absence of immunostaining in these conditions.
- Sections for immunohistochemistry were washed in PBS (3 × 10 minutes), incubated with a donkey fluorescein isothiocyanate (FITC), CY2, or CY3 fluorophore-labeled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:400) for 1 hour and 30 minutes, and washed in PBS (3 × 10 minutes) before mounting in Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Sections for peroxidase reaction were washed in PBS (3 × 10 minutes), incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL; 1:200 in PBS, 0.5% Triton X-100, 1% donkey serum) for 1 hour and 30 minutes, washed in PBS (3 × 10 minutes), and incubated with PBS containing the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) (ABC Elite, 0.2% A and 0.2% B; Vector) for 1 hour and 30 minutes. After washing in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.5; 3 × 10 minutes), bound peroxidase was revealed either by incubation in 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.0006% H₂O₂ (Sigma) in Tris-HCl buffer or by using the peroxidase substrate Vector SG kit (Vector). Sections were incubated for approximately 10 minutes and washed again. Finally, sections were serially mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded alcohols, cleared in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped with Eukitt.
- The BDA histochemistry procedure was done as previously described (Sarhan et al., 2005). Sections were washed in phosphate buffer (3 × 10 minutes) and directly incubated overnight in phosphate buffer containing ABC (ABC Elite, 0.8% A and 0.8% B; Vector) with 0.5% Triton X-100. After

TABLE 1. Retrogradely Labeled Neurons in Various Brain Structures After Fluoro-Gold (FG) or Cholera Toxin B (CTB) Injection in the Tail of the Ventral Tegmental Area (tVTA)¹

Structure	Mean FG	CTB	Structure	Mean FG	CTB
Cortex			Prerubral field	++	Yes
Cingulate	+++	Yes	Red nucleus	+++	Yes
Prelimbic	++++	Yes	Retrorubral field	++	Yes
Infralimbic	+++	Yes	Superior colliculus	+++++	Yes
Dorsal peduncular	+++	Yes	Substantia nigra		
Agranular insular	+	Yes	Compacta part	+++	Yes
Clastrum	++	Yes	Reticulata part	+	Yes
Septum			Ventral tegmental area		
Lateral septal nucleus, intermediate part	++	Yes	Anterior part	++	Yes
Nucleus of the horizontal limb of diagonal band	+++	Yes	Posterior part	+	Yes
Dorsal striatum	0	No	Raphe		
Accumbens nucleus			Raphe magnus nucleus	0	No
Accumbens nucleus, core	+ / 0	No	Pontine raphe nucleus	+	Yes
Accumbens nucleus, shell	+++	Yes	Dorsal raphe nucleus	+++++	Yes
Ventral pallidum	+++	Yes	Paramedian raphe nucleus	+++	Yes
Bed nucleus of the stria terminalis	++	Yes	Median raphe nucleus	+	Yes
Zona incerta	++++	Yes	Periaqueductal gray	++++	Yes
Substantia innominata	+++	Yes	Parabrachial nucleus	++++	Yes
IPAC(M)	+	Yes	Locus coeruleus	++	Yes
Hippocampus	0	No	Deep mesencephalic nucleus	+++	Yes
Amygdala	0	No	Interpeduncular nucleus	+++	Yes
Thalamus/epithalamus			Oculomotor nucleus	++	No
Paraventricular thalamic nucleus	+ / 0	No	Tegmental nucleus		
Parafascicular thalamic nucleus	++	Yes	Pedunculopontine tegmental nucleus	++	Yes
Lateral habenular nucleus	+++++	Yes	Ventral tegmental nucleus	0	No
Medial habenular nucleus	+	No	Laterodorsal tegmental nucleus	+++++	Yes
Hypothalamus			Dorsal tegmental nucleus	0	No
Lateral preoptic area	+++++	Yes	Dorsomedial tegmental area	++	Yes
Medial preoptic nucleus	+++	Yes	Pontine/reticular nucleus		
Magnocellular preoptic nucleus	+	Yes	Pontine reticular nucleus, oral part	+++	Yes
Lateral hypothalamic area	++++	Yes	Pontine reticular nucleus, caudal part	+++	Yes
Anterior hypothalamic area	0	No			
Posterior hypothalamic area	++++	Yes			
Dorsal hypothalamic area	++++	Yes			
Paraventricular hypothalamic nucleus	+	Yes			
Tuber cinereum area	+	Yes			
Subthalamic nucleus	0	No			

¹Three cases of FG injection were considered for a semiquantitative analysis (cases 70, 71, and 72; see Fig. 4). For each brain region, three sections per case were analyzed, covering the rostrocaudal extent of the region. The mean number of FG-positive cells is given per frontal section, independently of the surface of the considered brain region. Number of FG-positive cells per section: +, 1–5; ++, 5–10; +++, 10–20; ++++, 20–50; +++++, 50–100; ++++++, > 100. +/0 indicates that FG-positive cells were present in some, but not all, animals. Three cases of CTB injection in the tVTA were also analyzed to control for the specificity of FG results. “Yes” indicates the presence of CTB-positive cells, and “No” indicates the absence of CTB-positive cells. IPAC(M), interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure (medial part).

washing in Tris-HCl buffer (3 × 10 minutes), bound peroxidase was revealed by incubation in 0.05% DAB, 0.0006% H₂O₂, 0.1% nickel ammonium sulfate, 0.025% cobalt chloride, in Tris-HCl buffer. BDA was revealed by the immunohistochemistry protocol when doing FosB/DeltaFosB-BDA co-staining. Sections were washed again in Tris-HCl buffer, mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped with Eukitt.

Analysis

Coded slides were used to analyze the number of FosB/DeltaFosB-positive nuclei throughout the whole VTA of animals, which received either saline (n = 5) or cocaine (n = 5) injection. Blind counting was done by using a Nikon Eclipse E600 microscope and a hand-held counter. We counted the number of FosB/DeltaFosB-positive nuclei between –4.80 mm to –7.30 mm from bregma, analyzing a 40- μ m section every 160 μ m. According to Perrotti et al. (2005), we considered as tVTA a VTA region between –6.04 mm and –7.04 mm from bregma. Data are expressed as mean \pm SEM of positive nuclei per section. To provide a delineation of the tVTA, section drawings presenting the FosB/DeltaFosB signal from a cocaine-injected rat were done by using a microscope equipped with a camera lucida (Nikon Eclipse E600).

To analyze FG tract-tracing experiments, section drawings were done by using the camera lucida-equipped microscope. The analysis was done from the PFC to the level of the para-

brachial nucleus; more caudal sections corresponding to the medulla were not analyzed. Structures were identified by using anatomical landmarks (fiber tracts, ventricles, etc.) and differences in background staining. To enhance contrast and facilitate the identification of brain region limits and fiber tracts, we also used darkfield photographs. When needed, TH or ChAT immunohistochemistry or cresyl violet-stained sections were used for finer analysis of structure boundaries. In all cases, abbreviations and structure limits are based on the frontal diagrams from the atlas of Paxinos and Watson (1998). Animal numbering throughout the manuscript (case numbers) corresponds to the one used in our laboratory experimental notebooks.

Three animals (cases 70, 71, and 72) injected with FG in the tVTA were used to produce Table 1. A semiquantitative analysis was done on three equidistant sections (30 μ m thick) per structure and per animal, from the PFC to the beginning of the cerebellum. For each animal, the number of retrogradely labeled neurons was manually counted in the whole surface for each structure. The mean was expressed by number of crosses in Table 1 (from none to 6). This characterization was done independently of the size of the structures. For each region showing FG-positive cells following FG injection in the tVTA, we controlled for whether CTB-positive cells were present following CTB injection in the tVTA. This analysis was done on three animals with correct placement for the CTB

injection sites, as controlled by cocaine-induced FosB/DeltaFosB staining.

The analysis of double-labeling fluorescence was done on three to six frontal sections per animal by using an epifluorescence microscope (Leica DMRD). For each cell retrogradely labeled (FG positive) following FG injection in the tVTA, we determined whether it was positive or negative for the neurochemical marker considered. More than 50–200 cells per animal were identified, depending on the brain region considered. Data in the figures are presented as total number of cells analyzed.

Figure preparation

Pictures were taken by using a microscope (Leica) with a digital camera (Cool-snap, Princeton, NJ). Adobe (San Jose, CA) Photoshop 7.0 was used to adjust contrast, brightness, and sharpness. For fluorescent microphotographs, red-green images were converted to magenta-green to allow for color discrimination by red-green color-blind readers. The color channels were individually adjusted for the merged pictures.

RESULTS

Delineation of the tVTA by cocaine-induced FosB/DeltaFosB

We previously reported that chronic psychostimulant treatment induced DeltaFosB accumulation in GABAergic cells of the tVTA (Perrotti et al., 2005). In the present study, we showed that local FosB/DeltaFosB induction is also produced by an acute cocaine injection (Figs. 1–3 and Supplementary Fig. S1). We found a robust FosB-like immunoreactivity localized in the most posterior region of the VTA (Figs. 1, 2) in animals perfused 3 hours after cocaine injection. This continuous staining was bilateral and intense, and it defined the tVTA boundaries between -6.04 mm and -7.04 mm from bregma (Figs. 1, 2). As observed with chronic treatment (Perrotti et al., 2005), few FosB/DeltaFosB-positive nuclei were found in the aVTA and pVTA (Figs. 1A,B,K, 2A–F), where TH immunoreactivity was dense (Fig. 2A–F). The tVTA first appeared as a dense cluster of FosB/DeltaFosB-positive nuclei within the end of the pVTA (Fig. 2G,H). Between -6.04 mm and -6.30 mm from bregma, the tVTA did not cover the full extent of the VTA as described by Paxinos and Watson (1998), but was limited to a subregion posterior to the paranigral nucleus (PN) and dorsolateral to the interpeduncular nucleus (IP; Figs. 1C–E, 2G,H). More caudally, the position of the tVTA shifted dorsally and slightly laterally to become embedded within the superior cerebellar peduncle decussation (xscp; Figs. 1F–I, 2J–O and Supplementary Fig. S1). The FosB/DeltaFosB induction defining the tVTA was interrupted posterior to -7.04 mm from bregma (Fig. 1I–K).

Double-labeling immunofluorescence revealed that the FosB/DeltaFosB signal induced by the acute cocaine administration was mainly present in GABAergic neurons (92%), without detectable expression in dopaminergic neurons (Fig. 3).

Retrograde labeling with FG

Among the 27 animals injected for FG retrograde tracing studies, the observation of FG autofluorescence allowed the selection of 11 cases with a correct placement of the injection

site in the tVTA (Fig. 4 and Supplementary Fig. S2). For six of the animals (cases 8, 34, 69, 70, 71, and 72), the detection of cocaine-induced FosB/DeltaFosB immunoreactivity was also used to confirm that the core of FG injections was centered in the tVTA, with a limited spread in adjacent structures (see example in Fig. 4). Five of the brains were cut frontally with a $50\text{-}\mu\text{m}$ section thickness (cases 2, 4, 5, 8, and 34), and six were cut with a $30\text{-}\mu\text{m}$ section thickness (cases 42, 43, 69, 70, 71, and 72). For these 11 cases, retrogradely labeled neurons were visualized by immunoperoxidase reaction against FG, from the prefrontal cortex (PFC) to the pons. Case 4 was used to illustrate the labeling, by using camera lucida reconstitution of 17 significant sections (Figs. 5–7). Three other animals were used (cases 70, 71, and 72) for the neuronal counting presented in the Table 1.

Telencephalon (Figs. 5, 6). FG injection in the tVTA induced a labeling of neurons in the cingulate cortex (Cg), the prelimbic (PrL), infralimbic (IL), and dorsal peduncular (DP) regions of the PFC (see also Fig. 9), and more laterally in the agranular insular cortex (AI). Positive neurons were also observed along the rostrocaudal extent of the claustrum (Cl). In the septal region, FG-positive cells were mainly present in the intermediate part of the lateral septum nucleus (LSI) and in the nucleus of the horizontal limb of diagonal band (HBD). FG labeling was also present in the shell of the nucleus accumbens (AcbSh) and in the ventral pallidum (VP). No positive cells were found in the dorsal striatum. Finally, components of the extended amygdala such as the substantia innominata (SI), the bed nucleus of the stria terminalis (BST), and the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure (IPAC) were also labeled. However, no staining was found in the central nucleus of the amygdala (CeA). When present, the staining was usually bilateral with a stronger labeling ipsilateral to the injection site (80–90%). The staining was only ipsilateral to the injection for some structures (the AI, AcbSh, LSI, and HBD).

Diencephalon (Figs. 5, 6). The hypothalamic nuclei were strongly stained. Medially and in continuity with the VP, the labeling was present in the lateral (LPO), medial (MPO), and magnocellular (MCPO) preoptic nuclei. In continuity, dense labeling was also found in the lateral (LH), posterior (PH), and dorsal (DA) hypothalamic areas and in the tuber cinereum (TC). Positive neurons were found in the paraventricular hypothalamic nucleus (Pa) and in the zona incerta (ZI) dorsally to the LH. Strong labeling was observed in the medial mammillary nucleus (M), which was, however, confirmed as an artifact by local BDA injection (see also Fig. 13). Dorsal to the thalamus, the lateral habenula (LHb) was intensely labeled (see also Fig. 10A,B). For all these regions, the staining was bilateral with a strong ipsilateral prevalence.

Mesencephalon and pons (Fig. 7). In the mesencephalon, the substantia nigra was labeled mainly in the pars compacta (SNc). Medially to this structure, the aVTA, the pVTA, and the interpeduncular nucleus (IP) were also labeled. FG staining was present in the periaqueductal gray (PAG) and more rostrally in the oculomotor nuclei (3). For these regions the labeling was bilateral. A mainly contralateral labeling was found in the deep mesencephalic nuclei (DpMe), prerubral field (PR), red nucleus (R), and retrorubral field. Contralateral FG-positive cells were observed in the intermediate layers of the superior colliculus (SC).

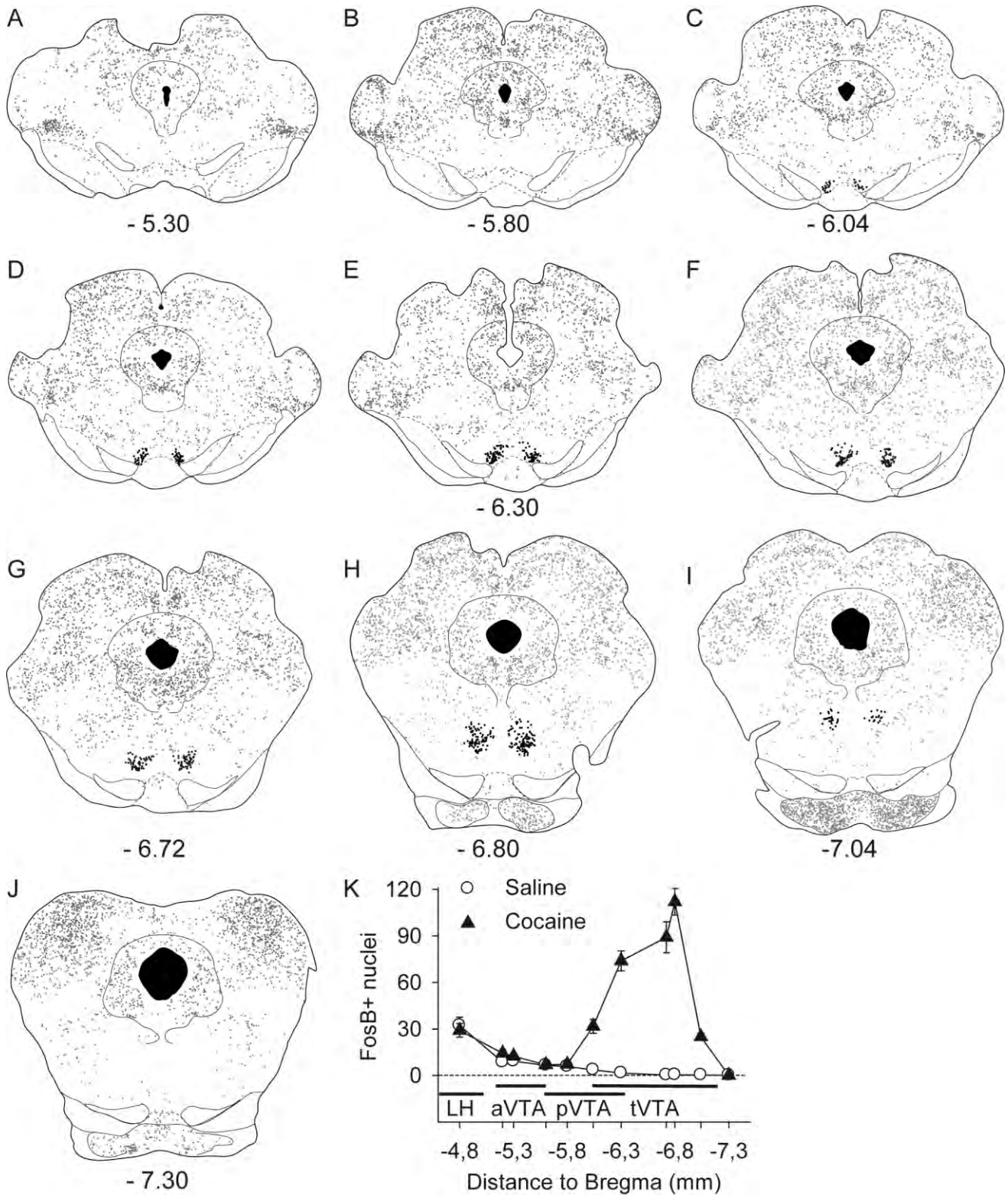


Figure 1. Distribution of cocaine-induced FosB/DeltaFosB-positive nuclei in the ventral tegmental area. **A–J:** Camera lucida drawings of 10 frontal sections illustrating the distribution of FosB/DeltaFosB-positive nuclei in the midbrain from an animal following an acute cocaine injection (20 mg/kg, i.p.). Drawings are ordered from rostral (A) to caudal (J). The approximate anteroposterior distance to the bregma (in mm) is indicated for sections corresponding to plates from the Paxinos and Watson atlas (1998). Each dot represents a positive nucleus for FosB/DeltaFosB immunohistochemistry. The positive nuclei within the tVTA are in black; the positive nuclei outside the tVTA are in gray. Whereas positive nuclei are numerous in the dorsal two tiers of the section, their density is low in the ventral tier, in which the tVTA appeared as a dense cluster of FosB/DeltaFosB-positive nuclei (C–I). Rostrally, the tVTA was limited to a subregion, posterior to the paranigral nucleus and dorsolateral to the interpeduncular nucleus (C–E). More caudally, the position of the tVTA shifted dorsally and slightly laterally to become embedded within the superior cerebellar peduncle decussation (F–I). **K:** Quantification of FosB/DeltaFosB-positive nuclei (FosB+) in the VTA subdivisions. Rats received a cocaine (20 mg/kg, i.p., n = 5) or saline injection (n = 5) and were perfused 3 hours later. Sections were stained for FosB/DeltaFosB immunohistochemistry. The mean number of Fos+ nuclei is given per bregma level, according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). The extent of aVTA and of pVTA is defined according to Olson et al. (2005), and the tVTA is defined according to Perrotti et al. (2005). Note that there is an overlap between pVTA and tVTA extents. For abbreviations, see list.

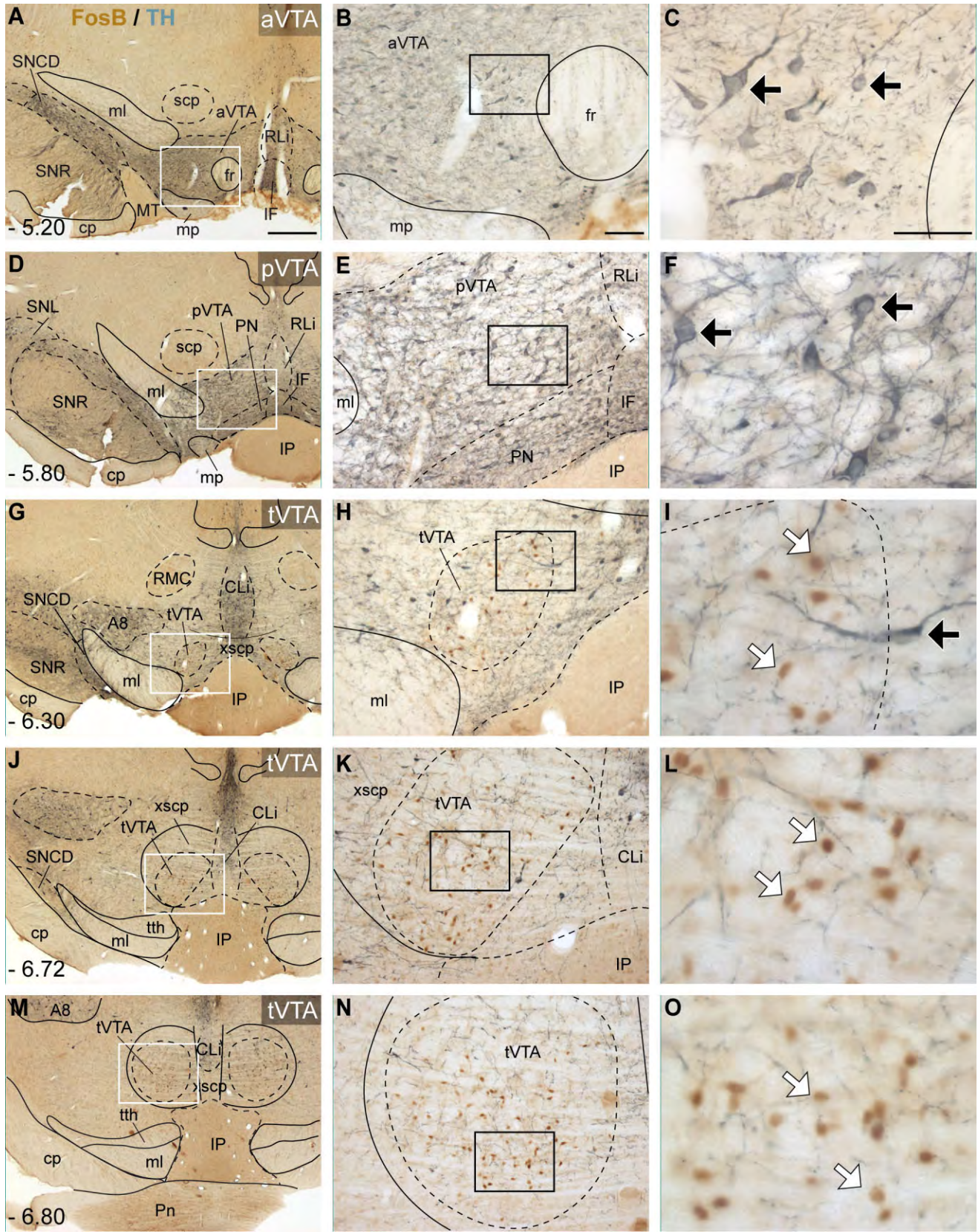


Figure 2. Microphotographs illustrating the induction of FosB/DeltaFosB in the VTA by acute cocaine (20 mg/kg, i.p.) in a representative case. The double immunostaining for FosB/DeltaFosB (DAB, brown nuclei, white arrows) and for tyrosine hydroxylase (TH; Vector SG, blue-gray soma and processes, black arrows) showed that FosB-like staining was mostly induced by cocaine in non-dopaminergic neurons of the caudalmost part of the VTA. A–F: Microphotographs illustrating frontal sections at the level of the aVTA (A, larger view; B and C, details of boxed areas) and pVTA (D, larger view; E and F, details of boxed areas). G–O: Microphotographs illustrating frontal sections at three rostrocaudal levels of tVTA (G–I, larger view and corresponding details; idem for J–L and for M–O). FosB/DeltaFosB-positive nuclei defined the extent of the tVTA; note the progressive disappearance of TH-immunoreactive elements from rostral (I) to caudal levels (L,M). Approximate rostrocaudal levels relative to the bregma (in mm) are indicated in A, D, G, J, and M. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm in A (also applies to D,G,J,M); 100 μm in B (also applies to E,H,K,N); 50 μm in C (also applies to F,I,L,O).

We observed labeling of the dorsal raphe nucleus (DR), the median and paramedian raphe nuclei (MnR, PMnR), and more caudally the pontine raphe nucleus (PnR). No FG-positive cells were found in the raphe magnus nucleus. In the pons, labeling was observed in the pontine reticular nuclei, oral and

caudal part (PnO, PnC); FG-positive cells were found in the pedunclopontine tegmental nucleus (PPTg), in the laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), and in the dorsomedial tegmental area (DMTg). FG-positive cells were also found in the locus coeruleus (LC) and in the parabrachial nucleus (PB). The staining of these regions was bilateral, with an ipsilateral prevalence, except for the PnO and PnC, which mainly presented contralateral staining.

Control injections of FG

Control injections were performed outside the boundaries of the tVTA (Fig. 8) to assess the potential contribution of surrounding structures to the retrograde labeling. FG injections lateral to the tVTA (cases 80 and 83), dorsal to the tVTA (cases 81 and 84), and caudal to the tVTA (cases 82, 85 and 86) resulted in patterns of retrograde labeling different from those observed after FG injection into the tVTA.

For case 83, the FG injection was done at the level of the rostral extent of the tVTA, lateral to the tVTA, inside the medial part of the substantia nigra (Fig. 8A, case 83). The pattern of FG staining was in agreement with previously published mappings (Geisler and Zahm, 2005). The highest density of retrogradely labeled neurons was observed in the medial caudate-putamen (Fig. 8A2,A3), the globus pallidus (Fig. 8A3), and the subthalamic nucleus (Fig. 8A4). It is to be noted that none of these structures was labeled after FG injections into the tVTA. The FG injection into the medial substantia nigra also resulted in labeling of the primary motor cortex (M1). Similarly, a more caudal injection of FG, lateral to the tVTA and encompassing the ventrolateral mesopontine tegmentum (Fig. 8B, case 80), resulted in labeling of the M1 area. However, this cortical area was not labeled after tVTA injections.

The injections dorsal to the tVTA (cases 81 and 84) were localized within the mesencephalic reticular tegmentum, in a subregion that was not explicitly delimited or named within the atlas (Paxinos and Watson, 1998). These injections were dorsal to the decussation of the superior cerebellar peduncle (xscp), medial to the retrorubral field, and ventral to the PAG (Fig. 8C, case 81). The FG staining induced by the injections dorsal to the tVTA was scarce, particularly in the telencephalon (Fig. 8C1-3). Retrogradely

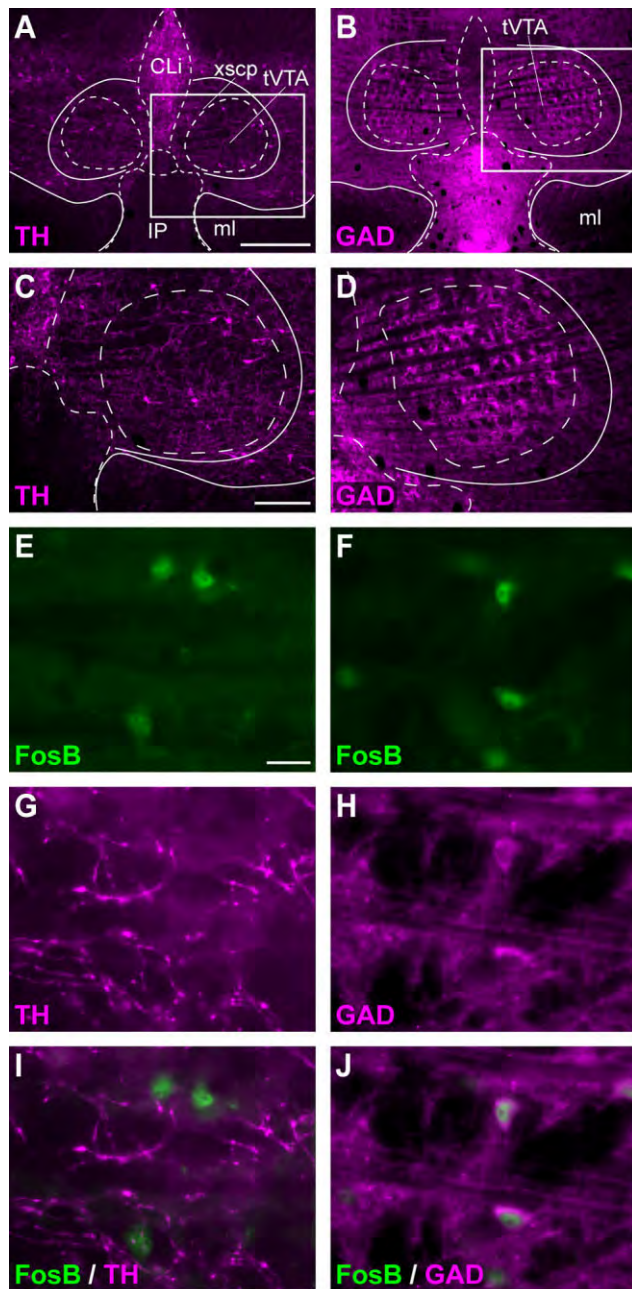


Figure 3. Neurochemical identity of FosB/DeltaFosB-positive cells. FosB/DeltaFosB was induced in GABAergic neurons but not in dopaminergic neurons in the tVTA, as shown by double fluorescent labeling for FosB/DeltaFosB (green) and TH (magenta) (A,C,E,G,I), or for FosB/DeltaFosB (green) and glutamic acid decarboxylase (GAD; magenta) (B,D,F,H,J), following acute cocaine injection. A,B: Microphotographs illustrating frontal sections of the mesencephalon at the tVTA level (A, TH; B, GAD). The boxed areas in A and B are magnified in C and D, respectively. C,D: Detailed views of the tVTA (C, TH; D, GAD); note the low density of TH-immunoreactive neurons (C) and the high number of GAD-immunoreactive soma (D) in the tVTA. E-J: High-magnification microphotographs of the double fluorescent labeling. FosB/DeltaFosB staining (E), TH staining (G), and their merged image (I) illustrate the absence of FosB+/TH+ cells. FosB/DeltaFosB staining (F), GAD staining (H), and their merged image (J), illustrate the presence of FosB+/GAD+ cells. K,L: Quantification of double-labeling immunofluorescence revealed that none of the FosB/DeltaFosB-positive cells co-expressed TH (K), whereas 92% (435 of 472) were GAD positive (L). For abbreviations, see list. Scale bar = 250 μ m in A (also applies to B); 100 μ m in C (also applies to D); 20 μ m in E (also applies to F-J).

K	FosB ⁺ cells 593	TH ⁻	TH ⁺
		593	0
L	FosB ⁺ cells 472	GAD ⁻	GAD ⁺
		37	435

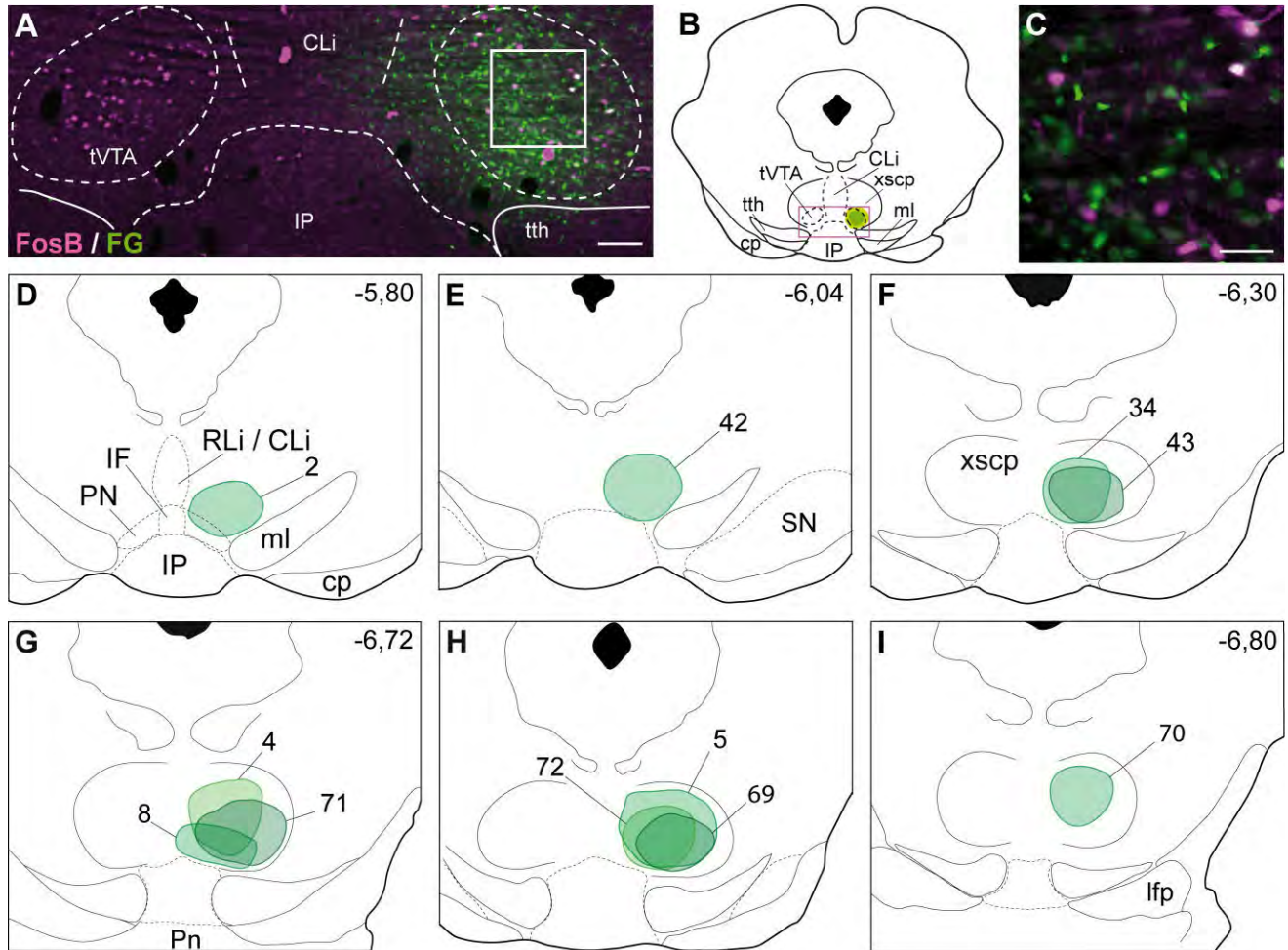


Figure 4.

FG injection sites in the tVTA. **A:** FosB/DeltaFosB immunostaining (magenta) following acute cocaine injection allowed visualization of the tVTA and confirmed the correct location of the FG injection site (green). **B:** The frontal section schematic representation illustrates the extent of the FG injection site. The region presented in A is delineated by the red box. **C:** Higher magnification of the injection site, as delineated by the boxed area in A. **D–I:** Localization in the tVTA of the 11 FG injection sites selected for analysis. Each injection site is presented at the level of its maximal extent. Drawings are ordered from rostral (D) to caudal (I). The approximate anteroposterior distance to the bregma (in mm) is indicated for sections corresponding to plates from the Paxinos and Watson atlas (1998). Details on the rostrocaudal extent of each injection site are given in Supplementary Figure S2. For abbreviations, see list. Scale bar = 200 μm in A; 50 μm in C.

labeled neurons were observed in the zona incerta (ZI) and in the medial globus pallidus (Fig. 8C4). However, we never observed FG staining in the medial globus pallidus after tVTA injections.

The injections caudal to the tVTA (cases 82, 85, and 86) were in the ventromedial pontine tegmentum containing the ventral part of the decussation of the superior cerebellar peduncle and the rostral pole of the oral part of the pontine reticular nucleus. Case 82, illustrated in Figure 8D, extended medially at the border of the median raphe nucleus (MnR). The pattern of retrograde labeling is in this case basically similar to the one obtained after FG injection in the tVTA.

Anterograde tracing with BDA

We confirmed the retrograde staining observed in some regions by anterograde tracing. BDA injection into the PFC (Fig. 9),

LHb (Fig. 10), HBD (Fig. 11), or LPO/LH (Fig. 12) resulted in anterogradely labeled axons within the tVTA. In all cases, these tVTA-labeled axons were thin and tortuous, with local collaterals and varicosities within the region expressing FosB/DeltaFosB. These injections thus confirmed the retrograde labeling observed in these regions.

The CeA is known to project to the VTA (Phillipson, 1979; Oades and Halliday, 1987; Geisler and Zham, 2005). However, we did not observe retrogradely labeled neurons in this region after FG injection in the tVTA (Fig. 12A,B). We thus injected BDA in the CeA (Fig. 12C). As expected, we observed labeled axons in the lateral (LPB) and medial (MPB) parabrachial nucleus (Fig. 12D), a main output of the CeA (Saper and Loewy, 1980; Moga and Gray, 1985), and in the aVTA (Fig. 12E,F). However, no BDA-labeled axons were present in the tVTA (Fig. 12G–I). This confirmed the lack of input from the CeA to this VTA subregion.

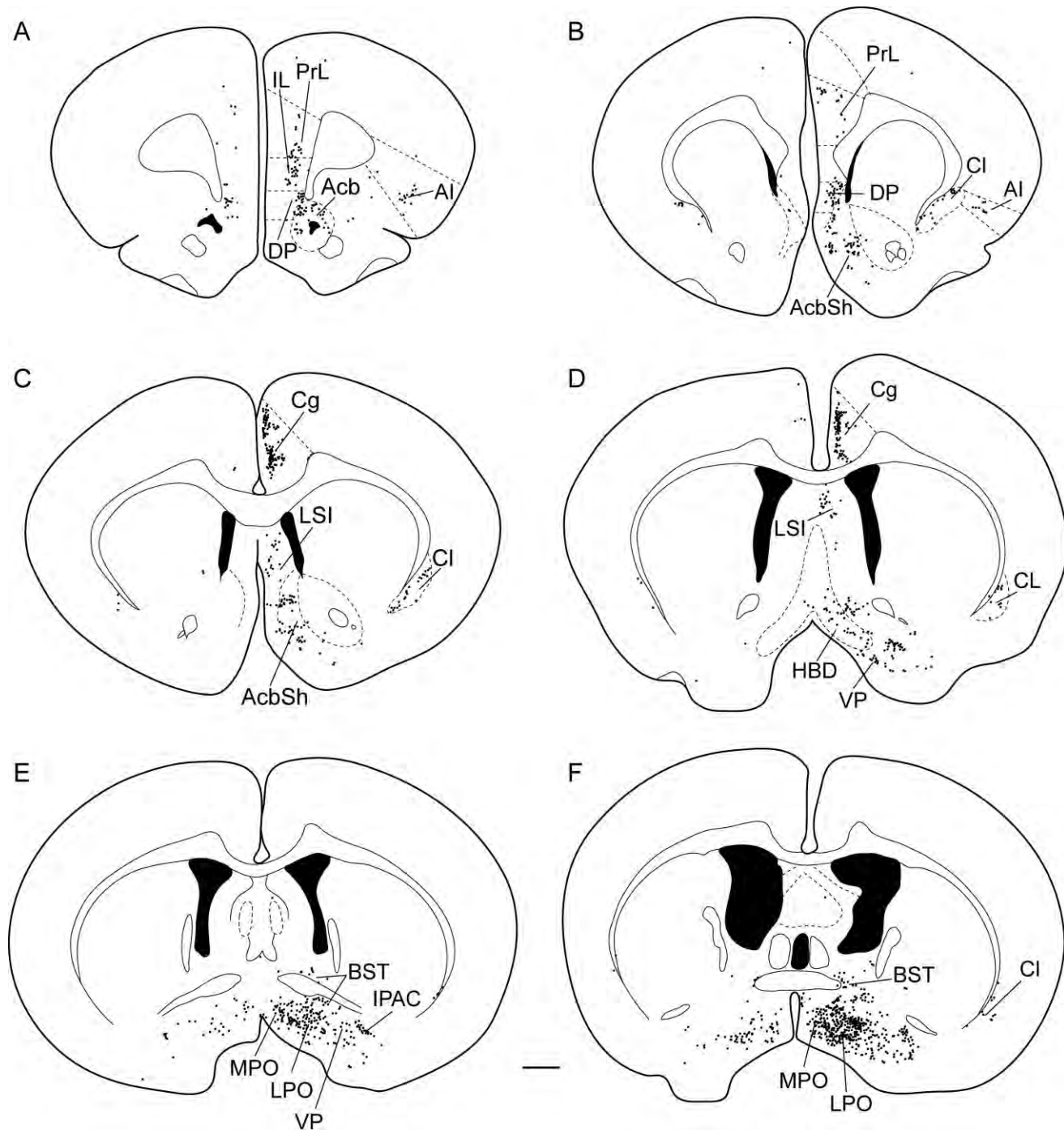


Figure 5. A–F: Schematic representation of retrogradely labeled neurons in regions going from the prefrontal cortex to the preoptic area after FG injection in the right tVTA (case 4). Each retrogradely labeled neuron is presented by one dot. Frontal sections are ordered from rostral to caudal. Labeled neurons were found in the prefrontal and agranular insular cortices (A–D), in the shell of the nucleus accumbens (A–C), in the ventral pallidum (D,E), along the rostrocaudal extent of the claustrum (B–F), in the intermediate part of the septum (C,D), in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band (D), in components of the extended amygdala (E,F), and in the preoptic area (E,F). No positive cell was found in the dorsal striatum. The staining was stronger ipsilateral to the injection site. For abbreviations, see list. Scale bar = 1 mm in F (applies to A–F).

The BDA injections in the medial mammillary nucleus induced axonal labeling in the trigeminothalamic tract (tth), but not in the nearby tVTA (Fig. 13). This labeling was character-

istic of passing fibers, as revealed by smooth and thick fibers. It shows that the medial mammillary nucleus does not project to the tVTA and that the strong retrograde labeling observed

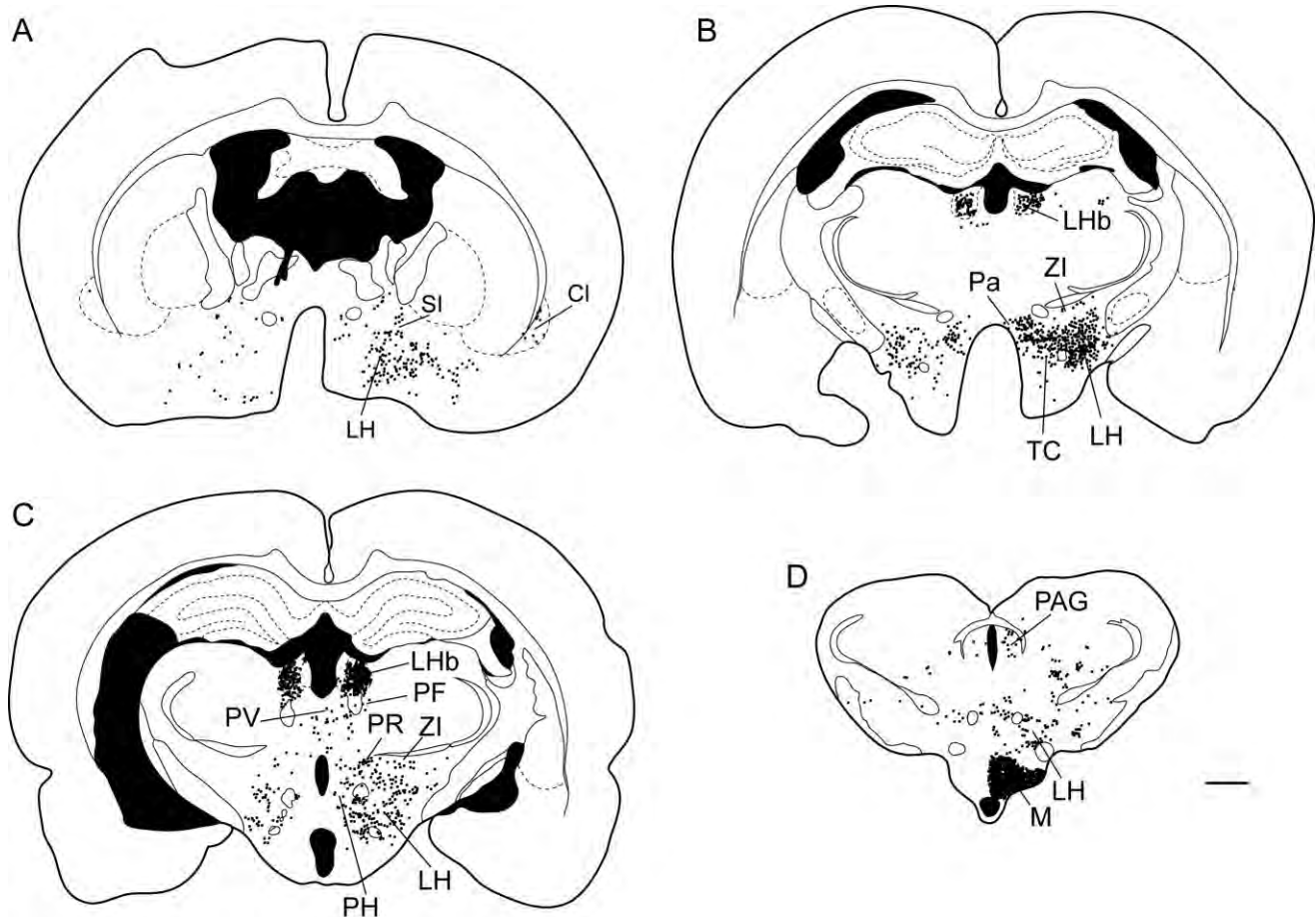


Figure 6.

A–D: Schematic representation of retrogradely labeled neurons along the rostrocaudal extent of lateral hypothalamus after FG injection in the right tVTA (case 4). Each retrogradely labeled neuron is presented by one dot. Frontal sections are ordered from rostral to caudal. Labeled neurons were found in the lateral, posterior, and dorsal hypothalamic areas (A–D), in the tuber cinereum (B), in the paraventricular hypothalamic nucleus (B), in the zona incerta (B,C), and in the lateral habenula (B,C). For all these regions, the staining was bilateral, with a strong prevalence ipsilateral to the injection site. The labeling observed in the medial mammillary nucleus was shown to be due to the capture of FG by fibers of the trigeminothalamic tract (see Fig. 15). For abbreviations, see list. Scale bar = 1 mm in D (applies to A–D).

in the medial mammillary nucleus after FG injection into the tVTA was due to an uptake by passing fibers.

Retrograde labeling with CTB

To control for the risk of artifacts due to capture of the tracer by passing fibers, we then injected CTB in the tVTA (Fig. 14 and Table 1). The rats received a cocaine injection before perfusion, and the CTB injection sites were validated by double immunofluorescence against CTB and cocaine-induced FosB/DeltaFosB. Three animals, with correct placement of the injection site, were analyzed for the presence of retrogradely labeled neurons. We previously found FG-positive cells in the core of the nucleus accumbens and in the paraventricular thalamic nucleus of some, but not all, animals injected in the tVTA. No CTB-positive cell was found in these two brain regions following tVTA injection. This confirmed that they do not project to the tVTA. We also found no CTB-positive cell in the oculomotor nucleus. The FG staining in this brain region was thus an artifact. The other brain regions cited in Table 1 for FG staining contained CTB-positive cells. The tracing ar-

tifacts related to iontophoretic FG injections were thus minimal. As observed with FG injections in regions surrounding tVTA, CTB-positive cells were found in the dorsomedial striatum of an animal with an injection rostralateral to the tVTA (data not shown). Similarly, CTB-positive cells were found in the medial globus pallidus of an animal with an injection dorsolateral to the tVTA (data not shown).

Neurochemical characterization

To characterize tVTA inputs, we studied the neurochemical pattern of selected afferents. We did double-fluorescent labeling on four animals (cases 69, 70, 71, and 72) with FG injection in the tVTA. For the DR, LC, and LH, we used immunohistochemistry against TrpH (a marker of serotonergic cells), TH (a marker of dopaminergic cells), and OX (a marker of orexinergic cells), respectively. In the DR, the vast majority (99%) of FG-positive neurons did not contain TrpH (Fig. 15A–D). No TH-positive cells were found among FG-positive neurons of the LC (Fig. 15E,F). In the LH, the vast majority (98%) of FG-positive neurons did not contain OX (Fig. 16).

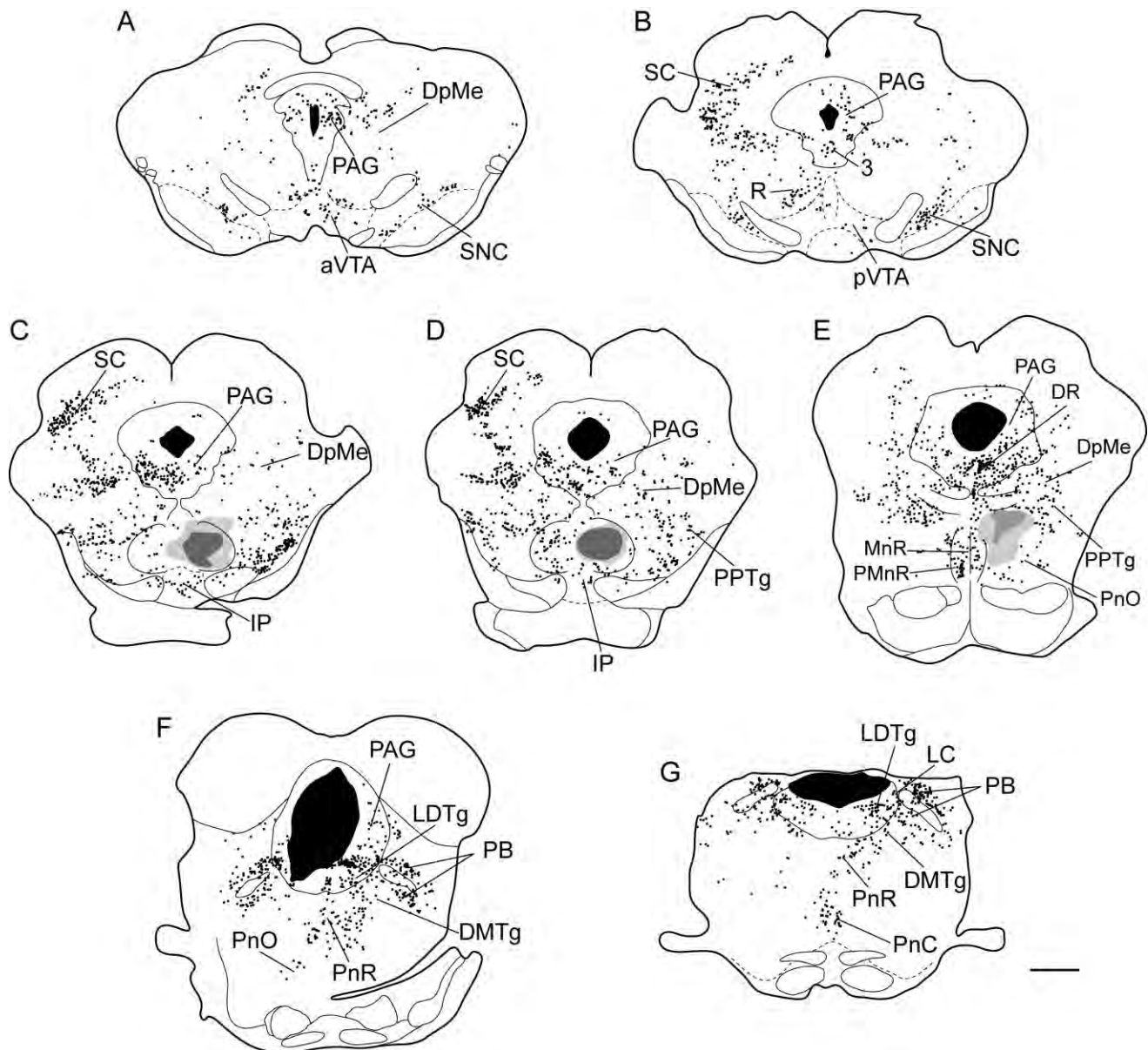


Figure 7.

A–G: Schematic representation of retrogradely labeled neurons in the mesencephalon and pons after FG injection in the right tVTA (case 4). Each retrogradely labeled neuron is presented by one dot. Frontal sections are ordered from rostral to caudal. Labeled neurons were bilaterally found in the substantia nigra (A,B), VTA (A,B), interpeduncular nucleus (B,C) and periaqueductal gray (A–F). A diffuse labeling was found in the deep mesencephalic nuclei (A–E), red nucleus (B), prerubral and retrorubral fields, and pontine reticular and tegmental nuclei (D–G). The dorsal, paramedian, and pontine raphe nuclei were labeled (E–G), as well as the parabrachial nucleus (F,G) and locus coeruleus (G). A contralateral labeling was observed in the intermediate layers of the superior colliculus (B–D). For abbreviations, see list. Scale bar = 1 mm in G (applies to A–G).

DISCUSSION

In this study, we give evidence that the induction of FosB/DeltaFosB by an acute cocaine injection is anatomically restricted to the tail of the ventral tegmental area (tVTA) and is mostly present in GABAergic neurons. After investigating the inputs to the tVTA, we showed that the pattern of tVTA afferents is mainly similar to the known pattern of afferents to the rest of the VTA. This suggests that the tVTA is a VTA subregion despite the low density of dopaminergic neurons in tVTA. Moreover, we

studied neuroanatomical markers of some tVTA afferents, and showed that the tVTA receives predominantly non-aminergic inputs from the dorsal raphe (DR) and the locus coeruleus (LC). Our results are further analyzed in the following discussion.

Functional identification of the tVTA

Chronic cocaine or amphetamine injection or cocaine self-administration lead to accumulation of the transcription factor DeltaFosB in a restricted VTA subregion, which was named tVTA (Perrotti et al., 2005). DeltaFosB is a stable truncated

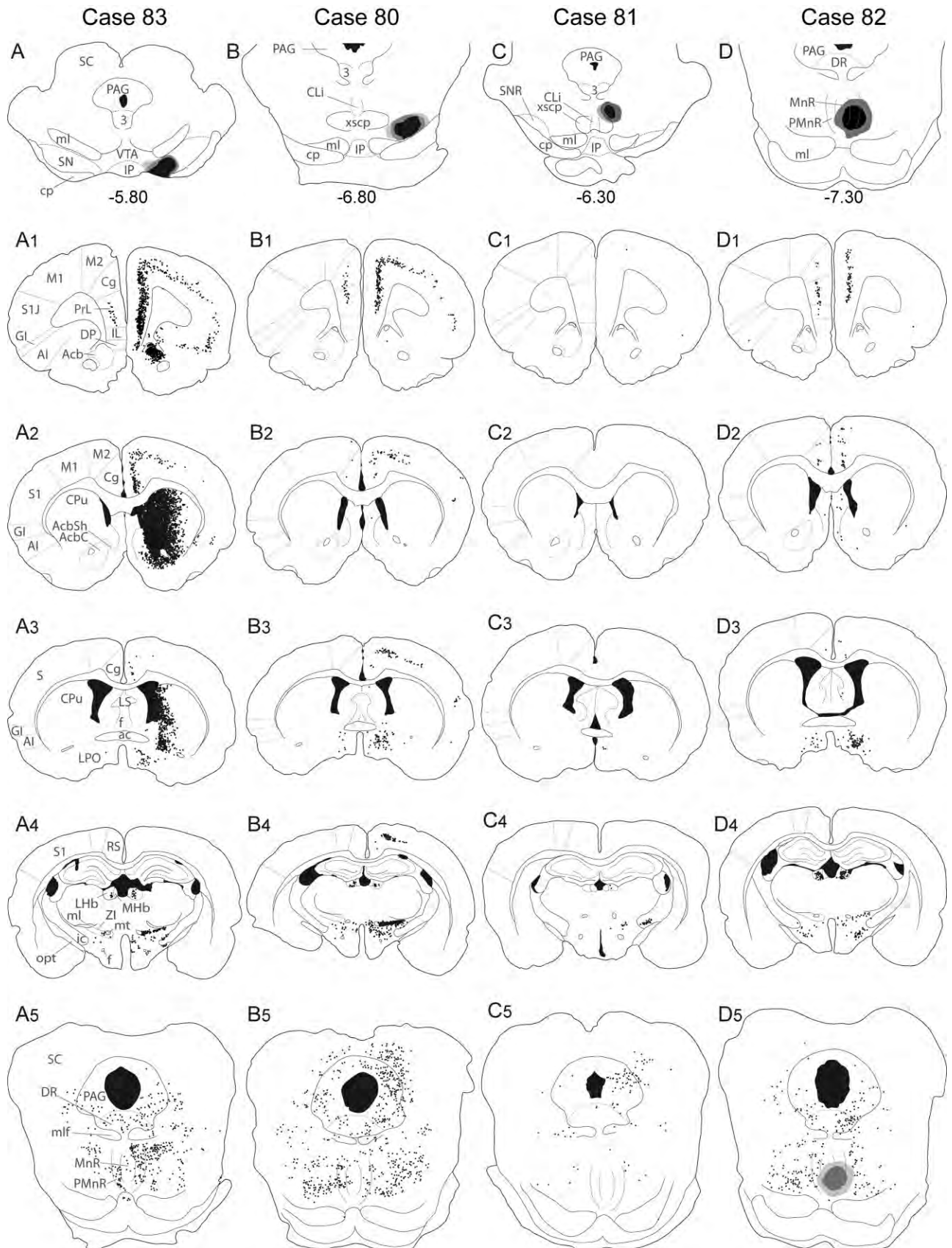


Figure 8

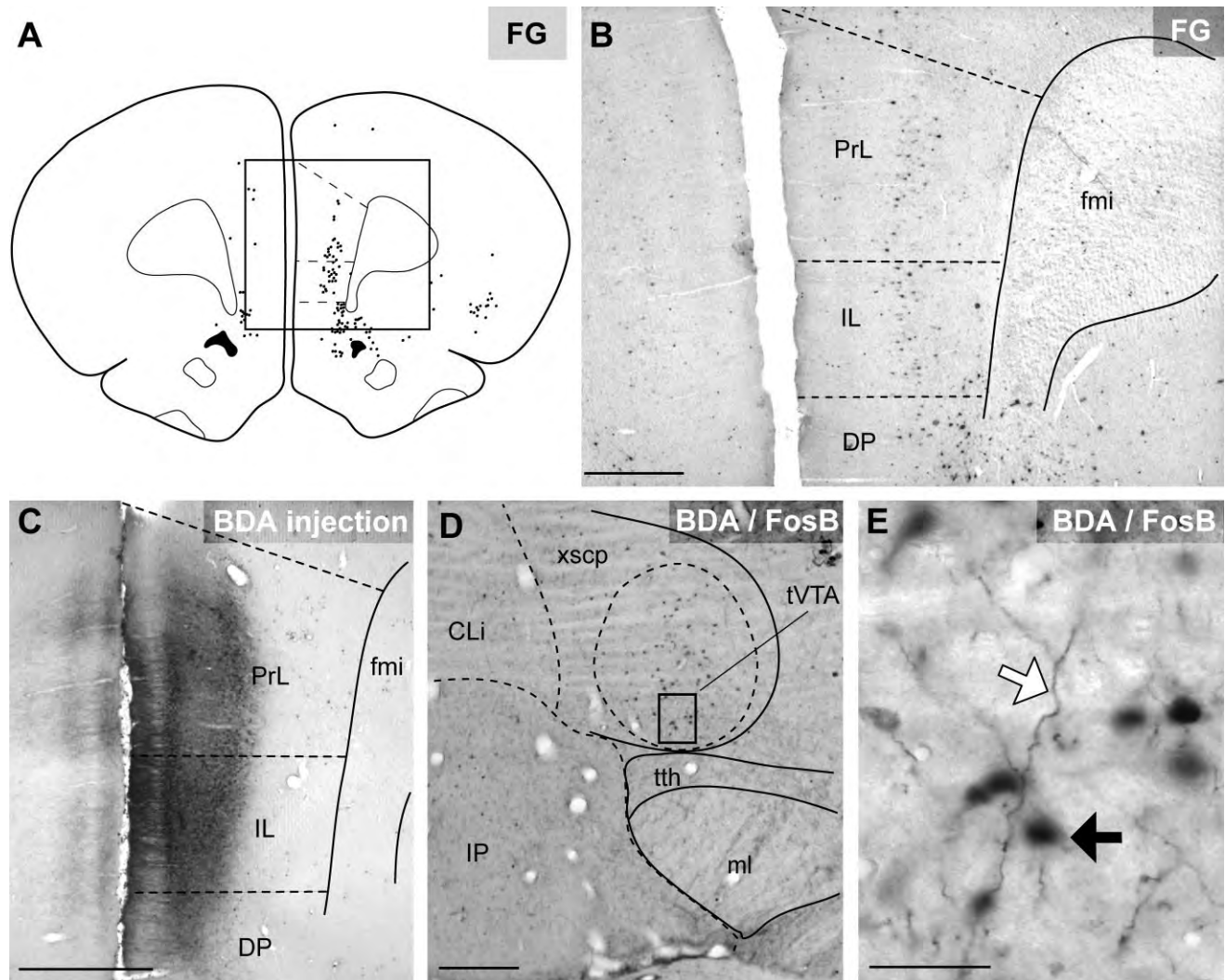


Figure 9. Medial prefrontal cortex (PFC) projection to the tVTA. **A,B:** Schematic reconstruction (A) and microphotograph (B) showing FG-positive cells in the medial PFC after FG injection in the tVTA (case 4). **C:** Microphotograph showing the BDA injection site in the medial PFC. **D,E:** In the tVTA, BDA-positive fibers (white arrow) are localized in the same area as FosB/DeltaFosB-positive nuclei (black arrow) (D, larger view; E, details of boxed area). For abbreviations, see list. Scale bar in B = 500 μm in B,C; 200 μm in D; 25 μm in E.

Figure 8. FG injections were done laterally (case 83, A; and case 80, B), dorsally (case 81, C), and caudally (case 82, D) to the tVTA. The pattern of FG staining after injection in the medial part of the substantia nigra (case 83; A1–A5) revealed a high density of retrogradely labeled neurons in the primary motor cortex (A1,A2), medial caudate-putamen (A2,A3), globus pallidus (A3), and subthalamic nucleus (A4). None of these regions was labeled after FG injections into the tVTA. A more caudal injection of FG, lateral to the tVTA and encompassing the ventrolateral mesopontine tegmentum (case 80; B), resulted in labeling of the primary motor cortex (B1,B2), which was not labeled after tVTA injections. The injection dorsal to the tVTA was localized within the mesencephalic reticular tegmentum (case 81; C). This injection was dorsal to the superior cerebellar peduncle decussation, medial to the retrorubral field, and ventral to the periaqueductal gray. Retrogradely labeled neurons (C1–C5) were observed in the medial globus pallidus (C4), which was not labeled after tVTA injections. The injection caudal to the tVTA was located in the ventromedial pontine tegmentum, close to the paramedian and median raphe (case 82; D). The pattern of retrograde labeling (D1–D5) was in this case less intense but basically similar to the one obtained after FG injection in the tVTA.

splice variant from the *fosB* gene, which accumulates with repeated or chronic stimulation (Nestler et al., 2001; McClung et al., 2004). Its accumulation in the nervous system has been observed after chronic exposure to drugs of abuse (Hope et al., 1992; Nye and Nestler, 1996; Pich et al., 1997), with compulsive running (Werme et al., 2002), chronic stress (Perrotti et al., 2004; Berton et al., 2007), repeated seizures (Hope et al., 1994), and antipsychotic drug treatment (Hiroi and Graybiel, 1996), or in sustained pain conditions (Luis-Delgado et al., 2006). Within the nucleus accumbens (Acb), DeltaFosB accumulation has been linked to the behavioral changes associated with exposure to drugs of abuse (Kelz et al., 1999; McClung and Nestler, 2003; Colby et al., 2003).

The present data showed that the FosB/DeltaFosB signal observed after an acute cocaine injection also allows identification of the tVTA. Indeed, this molecular response is found

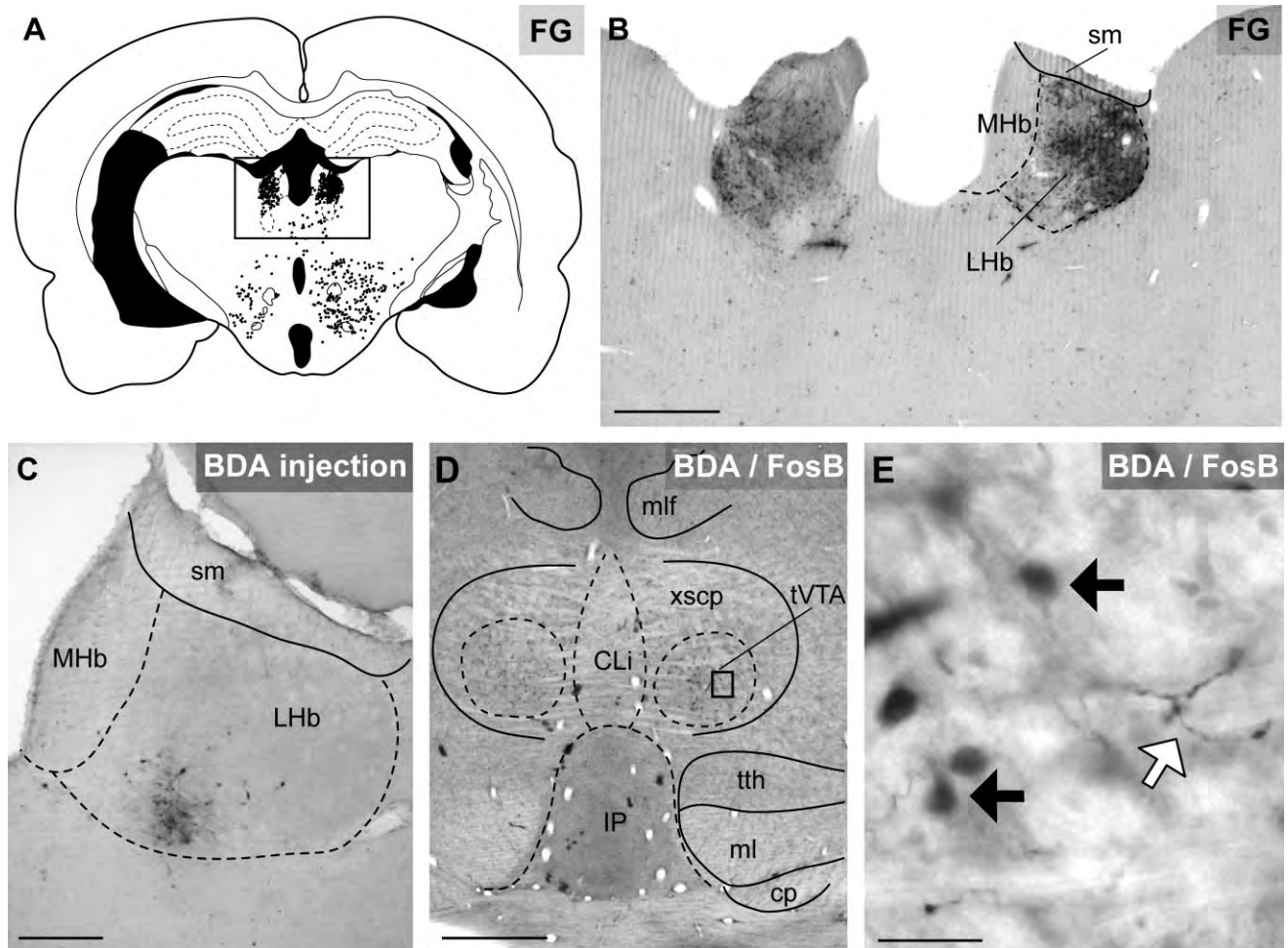


Figure 10. Lateral habenula (LHb) projection to the tVTA. **A,B:** Schematic reconstruction (**A**) and microphotograph (**B**) showing FG-positive cells in the LHb after FG injection in the tVTA (case 4). **C:** Microphotograph showing the BDA injection site in the LHb. **D,E:** In the tVTA, BDA-positive fibers (white arrow) are localized in the same area as FosB/DeltaFosB-positive nuclei (black arrows) (**D**, larger view; **E**, details of boxed area). For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm in **B,D**; 200 μm in **C**; 25 μm in **E**.

between -6.04 mm and -7.04 mm from bregma, which corresponds to the tVTA as previously defined (Perrotti et al., 2005). This induction is bilateral, intense, and anatomically restricted within the VTA. In its most rostral extent, FosB/DeltaFosB staining is restricted to a subregion posterior to the paranigral nucleus (PN) and dorsolateral to the interpeduncular nucleus (IP). Interestingly, a recent study also evidenced c-Fos expression following cocaine self-administration in the same brain area (Geisler et al., 2008). As it progresses caudally, the continuous FosB/DeltaFosB staining shifts dorsally and slightly laterally and becomes embedded within the superior cerebellar peduncle decussation (xscp). This ventro-dorsal shift of tVTA along the rostrocaudal axis is clearly evident on sagittal brain sections (Supplementary Fig. S1). In addition, this induction is mainly present in GABAergic neurons. These features are in agreement with our previous observations concerning psychostimulant exposure (Perrotti et al., 2005). The number of FosB/DeltaFosB-positive cells per section is also in agreement with what is observed following

chronic cocaine administration (Perrotti et al., 2005). Although the tVTA does not correspond to a VTA subregion as defined in atlases, the tVTA boundaries defined by the cocaine-induced FosB/DeltaFosB staining are clear and reproducible. The restricted distribution of this staining allows for a relatively precise delimitation of this subregion. Granted that FosB/DeltaFosB staining is presently the only marker defining the tVTA, future studies will be needed to find other neuro-anatomical markers.

The VTA is a midbrain area that predominantly contains dopaminergic and GABAergic neurons. More recently, glutamatergic neurons were also found, particularly in the rostro-medial aspects of the VTA (Kawano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007; Nair-Roberts et al., 2008), and a proportion of these neurons might also co-express TH (Kawano et al., 2006). Dopaminergic neurons represent 60–70% of VTA neurons. Most of them project to limbic structures, in particular to the Acb and the prefrontal cortex (PFC) (Swanson, 1982). This projection constitutes the mesocorticolimbic pathway known for its

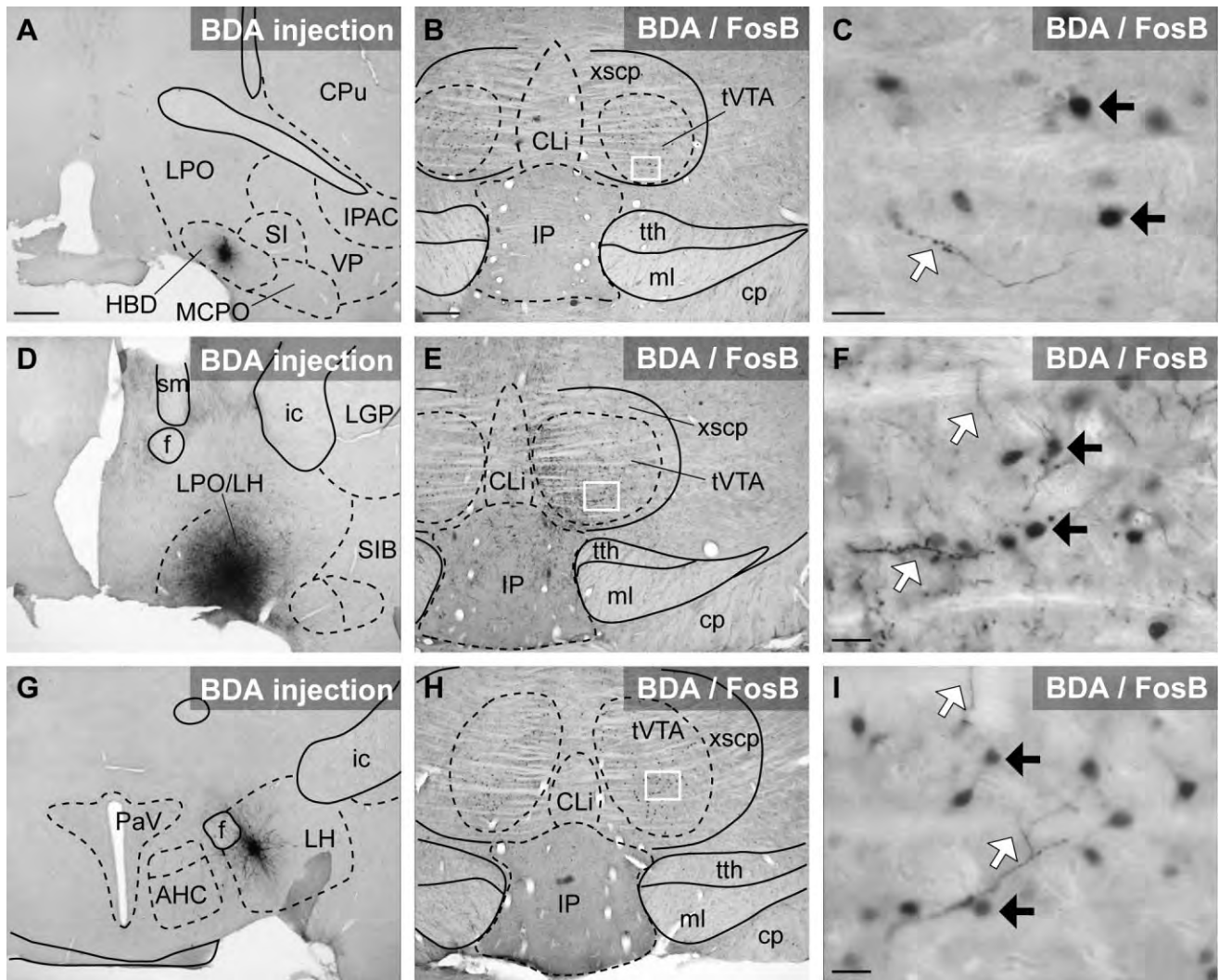


Figure 11.

Projections from the lateral preoptic/lateral hypothalamus continuum to the tVTA. **A–C:** Microphotographs showing the BDA injection site in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band (HBD; case 86, A), and the corresponding fibers in the tVTA (B, larger view; C, details of boxed area). The location of the BDA injection site within the HBD was confirmed by ChAT immunohistochemistry. **D–F:** Microphotographs showing a large BDA injection site in the lateral preoptic area/lateral hypothalamus (case 85, D), and the corresponding fibers in the tVTA (E, larger view; F, details of boxed area). **G–I:** Microphotographs showing a BDA injection site in the lateral hypothalamus (case 90, G), and the corresponding fibers in the tVTA (H, larger view; I, details of boxed area). In the tVTA, BDA-positive fibers (white arrow) are localized in the same area as FosB/DeltaFosB-positive nuclei (black arrows). For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm in A (also applies to D,G); 250 μm in B (also applies to E,H); 20 μm in C (also applies to I); 20 μm in F.

involvement in different psychiatric disorders (Nestler et al., 2002; Maldonado, 2003; Chau et al., 2004). GABAergic neurons represent around 35% of VTA neurons (Olson et al., 2005; Olson and Nestler, 2007; Nair-Roberts et al., 2008). These GABAergic neurons are either local inhibitory interneurons that regulate the excitatory state of VTA dopaminergic neurons (Klitenick et al., 1992; Marinelli et al., 2006), or projection neurons (Pirot et al., 1992; Van Bockstaele and Pickel, 1995; Steffensen et al., 1998; Carr and Sesack, 2000). The relative proportion of GABAergic and dopaminergic neurons varies between VTA subnuclei (Nair-Roberts et al., 2008) and along the rostrocaudal extent of the VTA. The highest density of dopaminergic cells is found in the middle tier of the VTA,

usually designated the posterior VTA (pVTA). This density progressively decreases in the anterior tier (aVTA) and in the caudalmost tier (tVTA) of the VTA.

In contrast, the lowest proportion of GABAergic cells is found in the pVTA, whereas this proportion increases in the aVTA and tVTA (Olson et al., 2005; Perrotti et al., 2005; Olson and Nestler, 2007). A recent study (Olson and Nestler, 2007) suggested that the tVTA corresponds to a restricted set of GABAergic neurons lateral and adjacent to the IP at -6 mm posterior to bregma. According to our observations, this set of neurons corresponds to the rostral pole of the tVTA. But, as can be observed in Figure 1 and in Supplementary Figure S1, the tVTA extends over 1 mm more caudally, with a ventrodorsal shift.

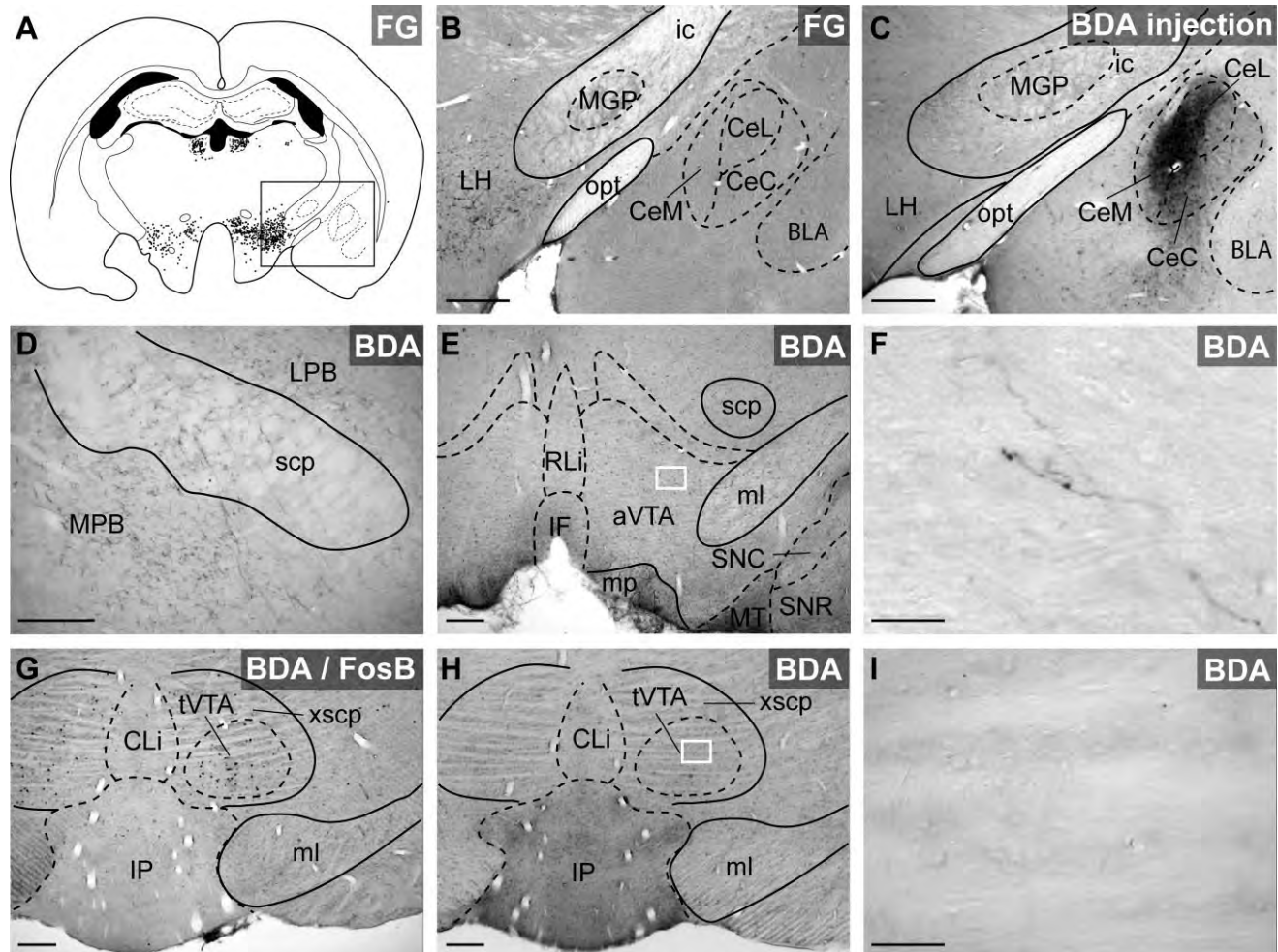


Figure 12.

Lack of amygdala projection to the tVTA. **A,B:** Schematic reconstruction (**A**) and microphotograph (**B**) showing the lack of FG-positive cells in the amygdala after FG injection in the tVTA (case 4). **C:** Microphotograph showing the BDA injection site in the central nucleus of the amygdala (CeA). **D–I:** Microphotographs illustrating BDA staining in projection areas. BDA-positive fibers are found in the parabrachial nucleus (**D**) and in the aVTA (**E**, larger view; **F**, details of boxed area), but not in the tVTA (**G,H**, larger views; **I**, details of boxed area). For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm in **B,C**; 200 μm in **D,E,G,H**; 20 μm in **F,I**.

The rostrocaudal heterogeneity of the VTA was functionally revealed by intracranial self-administration studies. These studies showed that cocaine (Rodd et al., 2005a), nicotine (Ikemoto et al., 2006), ethanol (Rodd-Henricks et al., 2000; Rodd et al., 2005b), endomorphin 1 (Zangen et al., 2002), or the cholinergic agonist carbachol (Ikemoto and Wise, 2002) are readily self-administered if delivered into the pVTA, but they are not or poorly self-administered if delivered into the aVTA. This functional distinction between the aVTA and pVTA was reinforced by studies using local viral-mediated gene transfer. Overexpression of the AMPA receptor subunit GluR1 (Carlezon et al., 2000), the phospholipase C γ (Bolanos et al., 2003), or the transcription factor CREB (Olson et al., 2005) in the aVTA increases the rewarding properties of morphine. The same manipulation done in the pVTA has the opposite effect. The study by Olson et al. (2005) identified the transition between the aVTA and the pVTA in the rat as located around -5.5 mm from bregma. According to this work, the aVTA

covers the VTA area between -4.9 mm and -5.4 mm from bregma, and the pVTA covers the VTA area between -5.5 mm and -6.2 mm from bregma (see Fig. 1K). We showed that tVTA covers the area between -6.04 mm and -7.04 mm from bregma (Perrotti et al., 2005), thus partially overlapping with pVTA. This overlap could correspond to a transition area where the density of dopaminergic cells is still high, but where the first cocaine-induced FosB/DeltaFosB nuclei can already be observed.

Interestingly, other psychostimulant drugs might also induce a molecular plasticity restricted to the tVTA. Indeed, acute injections of nicotine (Pang et al., 1993) or of modafinil (Provigil, Cephalon, Frazer, PA) (Scammell et al., 2000), a nonaddictive psychostimulant used against narcolepsia, induce c-Fos expression specifically in the caudalmost tier of the VTA. In the case of nicotine, this induction was shown to be restricted to non-dopaminergic cells. It is thus likely that the neuroanatomical location of these changes corresponds

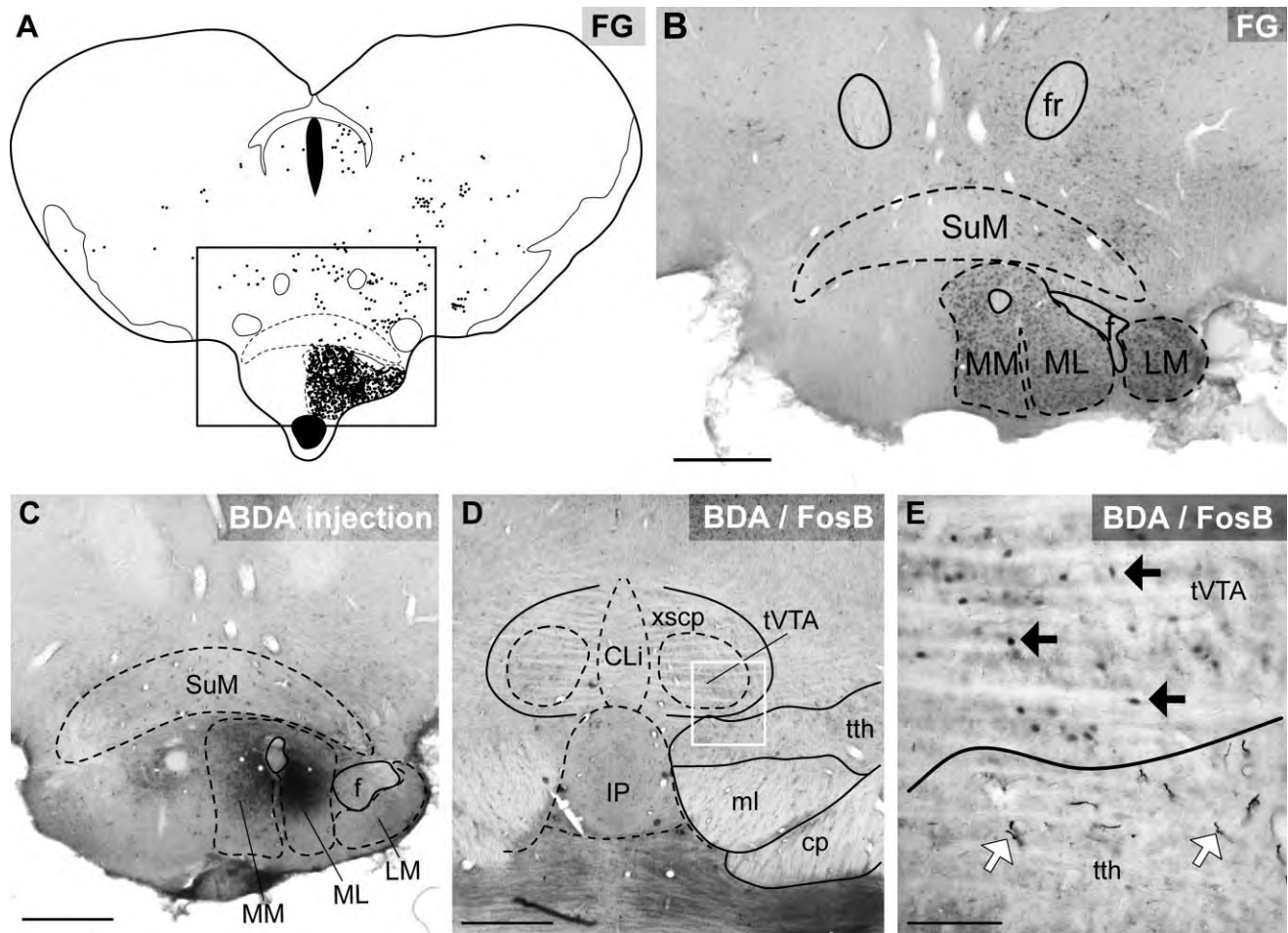


Figure 13.

The medial mammillary nucleus does not project to the tVTA. **A,B:** Schematic reconstruction (A) and microphotograph (B) showing the FG-positive cells in the medial mammillary nucleus after FG injection in the tVTA (case 4). **C:** Microphotograph showing the BDA injection site in the medial mammillary nucleus. **D,E:** In the tVTA, note the absence of BDA-labeled axons in the area defined by the FosB/DeltaFosB-positive cells (black arrows) (D, larger view; E, details of boxed area). The BDA-positive fibers (white arrows) are located within the trigeminothalamic tract, ventral to the tVTA. For abbreviations, see list. Scale bar = 500 μm in B–D; 50 μm in E.

to the tVTA as defined by cocaine-induced FosB/DeltaFosB. A review also suggested that “GABA neurons lateral to the median raphe nucleus and caudal to the VTA” could “influence freezing and other passive aversive responses” (Jhou, 2005). Although the corresponding behavioral data are not yet published, the author interestingly proposed that “psychostimulant-activated neurons (Scammel et al., 2000; Perrotti et al., 2005) are a medial subset of this midbrain GABAergic population.” This would indicate a potential implication of tVTA in emotional responses.

tVTA afferents

The tVTA, especially in its caudal extent, is partially entrapped in an area of passing fiber tracts that is located within the most ventral aspects of the xscp. This tVTA location might potentially induce some tracing artifacts. To reduce this risk, we compared the data of different rats that received a FG injection in the tVTA, and we placed FG injections in regions surrounding the tVTA. This tracer is incorporated by injured axons and terminals, but it is nor-

mally not incorporated by undamaged passing fibers (Köbber et al., 2000; Geisler and Zahm, 2005). We also used iontophoretic delivery, which allows for smaller and less damaging injection sites than pressure injection (Köbber et al., 2000). Finally, anterograde tracing data enabled us to validate some of the FG results further. It revealed that the mammillary nucleus labeling after FG injection in the tVTA is due to passing fibers. As previously reported, the oculomotor nucleus (3) and the deep and intermediate layers of the superior colliculus (SC) are often labeled in studies on VTA afferents and should be treated with caution (Phillipson, 1979; Geisler and Zham, 2005). According to Phillipson (1979), labeling in the oculomotor nuclei is probably due to FG entering damaged oculomotor rootlets as they course through the ventral tegmental region. We confirmed by CTB injections that the oculomotor nucleus (3) does not project to the tVTA. The contralateral labeling in the intermediate layers of the SC may have been due to crossing tectospinal fibers passing near the tVTA. However, we observed a high

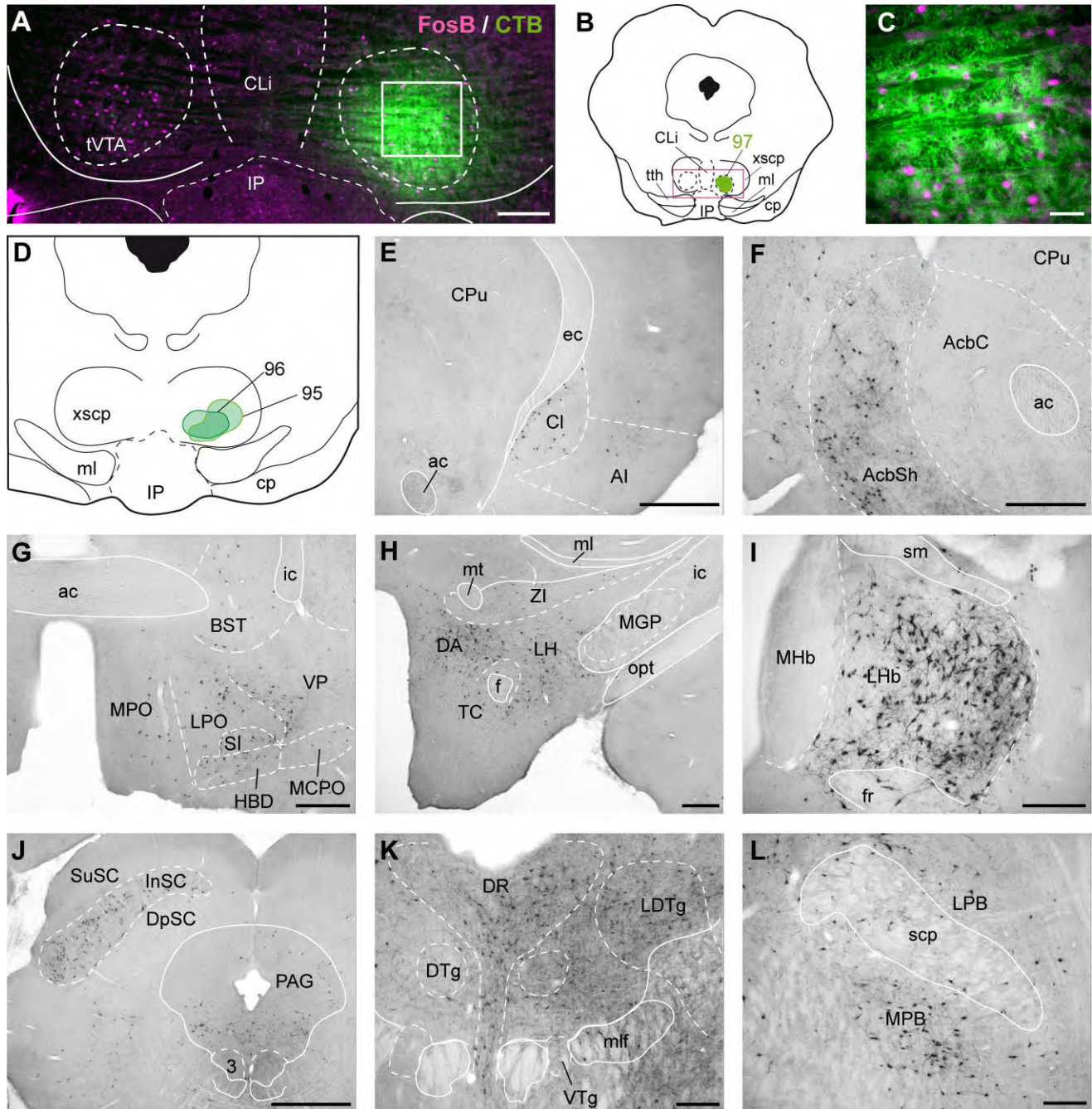
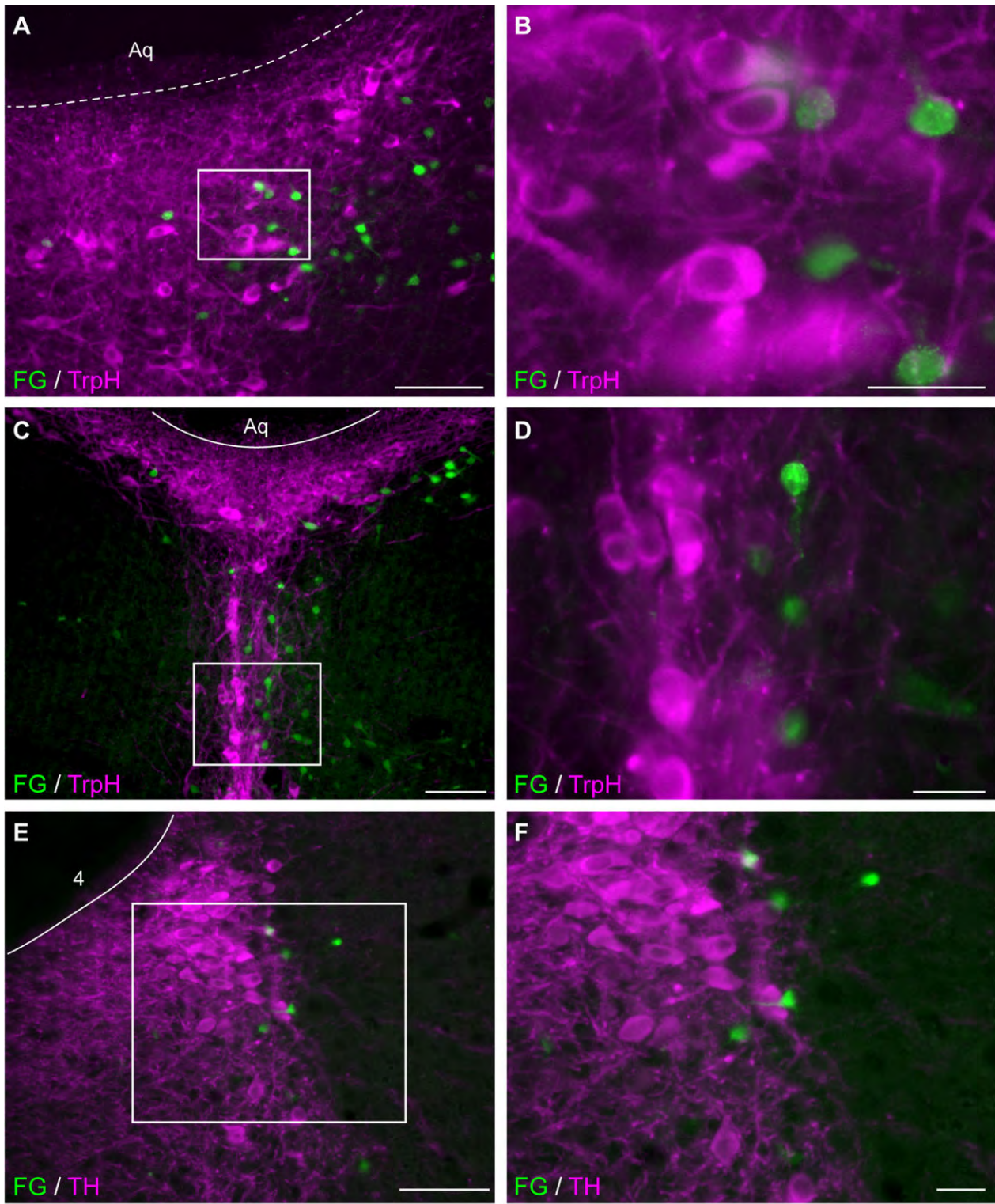


Figure 14.

CTB injections in the tVTA. **A:** FosB/DeltaFosB immunostaining (magenta) following acute cocaine injection allowed visualization of the tVTA and confirmed the correct location of the CTB injection site (green). **B:** The frontal section schematic representation illustrates the extent of the CTB injection site (case 97). The region presented in **A** is delineated by the red box. **C:** Higher magnification of the injection site, as delineated by the boxed area in **A**. **D:** Localization of the two other CTB injections in the tVTA in a frontal section drawing. **E–L:** Examples of CTB retrogradely labeled cells in the claustrum and agranular insular cortex (**E**), the shell of the nucleus accumbens (**F**), the preoptic area (**G**), the dorsal and lateral hypothalamic regions (**H**), the lateral habenula (**I**), the intermediate layers of the superior colliculus (**J**), the dorsal raphe (**K**), and the parabrachial nucleus (**L**). No CTB-positive cell was found in the oculomotor nucleus (3) (**J**). Darkfield pictures of the sections were used to draw anatomical landmarks. For abbreviations, see list. Scale bar = 200 μm in **A, H, I, K, L**; 50 μm in **C**; 500 μm in **E–G, J**.

density of retrogradely labeled cells in CTB-injected animals, thus confirming that tVTA receives information from the intermediate layers of SC that are known to process somatosensory information (Sefton et al., 2004).

The FG injections lateral to the tVTA resulted in retrograde labeling of brain regions exempt from labeling following tVTA injections. FG-positive cells were observed in the medial caudate-putamen, globus pallidus, subthalamic nucleus, or



Dorsal Raphe			TrpH ⁻	TrpH ⁺
FG ⁺ cells	656	652	4	

Locus Coeruleus			TH ⁻	TH ⁺
FG ⁺ cell	285	285	0	

Figure 15. Neurochemical study of projections from aminergic nuclei to the tVTA. In the dorsal raphe (DR), double labeling was done by using an anti-tryptophan hydroxylase (TrpH) antibody (magenta) and FG autofluorescence (green) after injection in the tVTA. Similarly, double labeling was done in the locus coeruleus (LC) by using an anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (magenta). A,B: Merged image of double labeling in the rostral part of the DR (A, larger view; B, details of boxed area). C,D: Merged image of double labeling in a more caudal part of the DR (C, larger view; D, details of boxed area). E,F: Merged image of double labeling in the LC (E, larger view; F, details of boxed area). G,H: Quantification of TrpH or TH labeling in FG-positive cells was done in four animals (cases 69, 70, 71, and 72; DR, G; LC, H). In the DR, only very few FG-positive cells were positive for TrpH staining. In the LC, none of the analyzed FG-positive cells co-localized with TH staining. For abbreviations, see list. Scale bar = 100 μ m in A,C,E; 30 μ m in B,D,F.

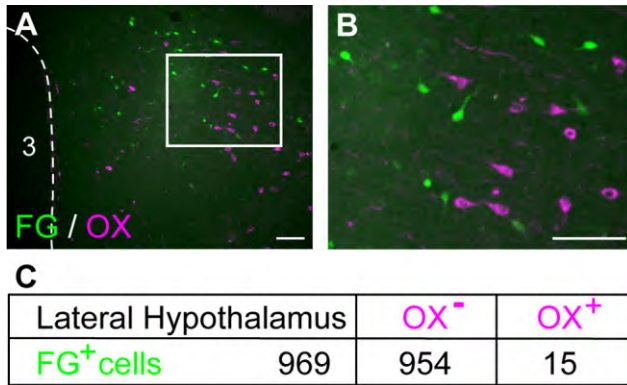


Figure 16.

A,B: Neurochemical study of the lateral hypothalamus projection to the tVTA. Double labeling with anti-orexin (OX) antibody and FG autofluorescence was done after FG injection in the tVTA. Most of the FG-positive cells appeared to be negative for OX (A, larger view; B, detail of boxed area). **C:** Quantification of OX labeling in FG-positive cells was done in four animals (cases 69, 70, 71, and 72). Over 95% of the analyzed FG-positive cells were negative for OX. For abbreviations, see list. Scale bar = 100 μ m in A; 50 μ m in B.

primary motor cortex (M1) after injections lateral to the rostral pole of the tVTA. FG-positive cells were also observed in the M1 after injections lateral to the tVTA at more caudal levels. None of these structures was labeled after tVTA FG injection. We can therefore consider that FG injections into the tVTA did not result in FG uptake by fibers in regions lateral to the tVTA. The FG injections dorsal to the tVTA resulted in retrograde labeling of the medial globus pallidus (MGP). This is in agreement with a previously published study of the projections from this brain region (Takada et al., 1994). Fibers from MGP neurons were described as running caudally through the midbrain periaqueductal gray (PAG) before leaving it at the level of the xscp. They then course laterally or ventrolaterally to reach the pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) (Takada et al., 1994). Additionally, we did not observe any FG staining in the MGP after tVTA injections. This suggests that our FG injections into the tVTA did not result in a significant FG uptake by fibers dorsal to the injection site. The CTB injections mainly confirmed FG results.

Control injections caudal to the tVTA revealed a retrograde labeling pattern sparser but basically similar to the one obtained after tVTA injection. This suggests the presence of a transition zone between the tVTA and the ventral pontine tegmentum.

The pattern of tVTA afferents is mainly similar to the known pattern of VTA afferents (Phillipson, 1979; Oades and Hallyday, 1987; Geisler and Zahm, 2005). As reported for the VTA (Geisler and Zahm, 2005), the neurons projecting to the tVTA are not confined to discrete nuclei, but rather extend from the PFC to the brainstem. From rostral to caudal, regions containing the highest density of retrogradely labeling include: the medial PFC, shell of the nucleus accumbens (but not the core of the nucleus accumbens or the dorsal striatum), ventral pallidum (VP), zona incerta (ZI), medial (MPO) and lateral (LPO) preoptic areas, lateral (LH), dorsal (DA), and posterior (PH) hypothalamic areas, lateral habenula (LHb), SC, DR, PAG, parabrachial

nucleus (PB), and mesencephalic and pontine reticular formations. We confirmed by BDA injection that the PFC, horizontal limb of the diagonal band (HBD), LPO/LH continuum, and LHb project to the tVTA. Previously published studies also illustrated staining in the area corresponding to the tVTA when tritiated amino acid injections or *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) injections were used in the Acb (Nauta et al., 1978; Zahm et al., 1999), VP (Haber et al., 1985), HBD (Grove, 1988), BST (Dong and Swanson, 2004, 2006), LH (Berk and Finkelstein, 1982), LHb (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988), or PB (see case LC1 in Fig. AH and 4I in Saper and Loewy, 1980).

Our results concerning the tVTA are similar to those of Geisler and Zahm (2005), who recently re-evaluated the classical VTA afferents by using FG. However, some differences can be observed. The first difference is the absence of tVTA inputs from the amygdala, whereas the anterior amygdaloid area, the medial and the central nuclei of the amygdala, project to the classical VTA (Geisler and Zahm, 2005). This lack of direct tVTA inputs from the amygdala is in agreement with observations from Phillipson (1979) and from Zahm et al. (1999). In the former study, retrogradely labeled neurons were found in amygdala nuclei after horseradish peroxidase injection in the anterior or ventromedial parts of the VTA, but not after more posterior VTA injections. In the latter study, anterogradely labeled fibers were found in anterior aspects of the VTA after PHA-L injection in the CeA, but no labeling was present in the caudal aspects of the VTA, which correspond to the tVTA. It thus appears that there is a rostrocaudal gradient of amygdalar projections to the VTA.

Another difference lies in the respective density of retrogradely labeled neurons in some regions. We found fewer Acb and septal neurons projecting to the tVTA than what was observed for the rest of the VTA (Geisler and Zahm, 2005). The tVTA inputs from Acb are confirmed by previously published studies showing staining of the caudal part of the midbrain after tritiated amino acid injection in the Acb (Nauta et al., 1978), or showing fibers in the caudal extent of the VTA after PHA-L injection in the shell of the Acb (AcbSh) (Zahm et al., 1999). Our present data show that Acb projections to the tVTA specifically arise from the shell subregion of the Acb. Finally, the few septal neurons projecting to the tVTA appeared to be limited to the intermediate part of the lateral septum nucleus (LSI), whereas the classical VTA seems to receive afferents from the dorsal, intermediate, and ventral part of the lateral septum (Geisler and Zahm, 2005).

The habenular complex has been shown to regulate monoaminergic transmission and is a communication node between the limbic and the extrapyramidal systems (Lecourtier and Kelly, 2007). The LHb is known to project to the VTA (Herkenham and Nauta, 1979; Phillipson, 1979; Geisler et al., 2005). By using both retrograde and anterograde approaches, our results complete this observation by showing that the tVTA receives strong LHb inputs. Interestingly, previous characterization of habenular efferents (Herkenham and Nauta, 1979; Araki et al., 1988) revealed a strong and restricted bilateral staining in the area of the superior cerebellar peduncle decussation (xscp). This was observed following tritiated amino acid injections in the LHb (Herkenham and Nauta,

1979), and also following PHA-L injection in the LHb (Araki et al., 1988). The neuroanatomy of this bilateral staining is similar to the tVTA as defined by cocaine-induced FosB/DeltaFosB.

We investigated the orexinergic projection from the LH, the serotonergic projection from the DR, and the noradrenergic projection from the LC. The LH projects to the VTA (Saper et al., 1979; Phillipson, 1979; Geisler and Zahm, 2005), and parts of these efferents contain orexins (Korotkova et al., 2003; Fadel and Deutch, 2002). These neuropeptides have been implicated in addiction and motivated behaviors (DiLeone et al., 2003; Harris et al., 2005; Scammell and Saper, 2007). Our results showed that almost none (<2%) of the LH neurons projecting to the tVTA express orexins. It should, however, be noted that recent findings suggest that most orexin fibers in the VTA are axons passing to caudal brainstem structures (Balcita-Pedicino and Sesack, 2007). The DR and the LC are monoaminergic nuclei known to project to the VTA (Phillipson, 1979; Oades and Hallyday, 1987; Geisler and Zahm, 2005). These projections are partly monoaminergic, serotonergic for the DR (Kalivas, 1993; Hervé et al., 1987), or noradrenergic for the LC (Grenhoff et al., 1993). However, our data showed that the tVTA receives mostly non-aminergic inputs from both nuclei. FG-stained neurons are bordering the areas containing high serotonergic neural density in the DR or high noradrenergic neural density in the LC. For the LC, the labeled region corresponds to the pericerulear zone, which mainly contains GABAergic neurons (Ijima and Ohtomo, 1988; Aston-Jones et al., 2004).

In conclusion, the tVTA was defined as a discrete region located in the caudal end of the VTA, where psychostimulants acutely or chronically induce Fos-related proteins. In its most rostral extent, the tVTA is restricted to a VTA subregion posterior to the paranigral nucleus and dorsolateral to the interpeduncular nucleus. As it progresses caudally, tVTA shifts dorsally and slightly laterally and becomes embedded within the superior cerebellar peduncle decussation. The general pattern of tVTA afferents is mostly similar to the known pattern of afferents to the rest of the VTA. This suggests that the tVTA is a VTA subregion, despite its caudal location and low density in dopaminergic neurons. Future studies are needed to understand the functional importance of this region in which psychostimulants induce a specific and neuroanatomically restricted molecular plasticity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ipek Yalcin and Dr. Maysa Sarhan for their helpful comments on the manuscript.

LITERATURE CITED

- Araki M, McGeer PL, Kimura H. 1988. The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res* 441:319–330.
- Aston-Jones G, Zhu Y, Card JP. 2004. Numerous GABAergic afferents to locus ceruleus in the pericerulear dendritic zone: possible interneuronal pool. *J Neurosci* 24:2313–2321.
- Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR. 2007. Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 503:668–684.
- Benarroch EE, Schmeichel AM, Low PA, Boeve BF, Sandroni BF, Parisi JE. 2005. Involvement of medullary regions controlling sympathetic output in Lewy body disease. *Brain* 128:338–344.
- Berk ML, Finkelstein JA. 1982. Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat: an autoradiographic investigation. *Brain Res Bull* 8:511–526.
- Berton O, Covington HE 3rd, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonale A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ. 2007. Induction of DeltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55:289–300.
- Bolanos CA, Perrotti LI, Edwards S, Eisch AJ, Barrot M, Olson VG, Russell DS, Neve RL, Nestler EJ. 2003. Phospholipase Cgamma in distinct regions of the ventral tegmental area differentially modulates mood-related behaviors. *J Neurosci* 23:7569–7576.
- Carlezon WA Jr, Haile CN, Coppersmith R, Hayashi Y, Malinow R, Neve RL, Nestler EJ. 2000. Distinct sites of opiate reward and aversion within the midbrain identified using a herpes simplex virus vector expressing GluR1. *J Neurosci* 20:RC62.
- Carr DB, Sesack SR. 2000. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38:114–123.
- Chao J, Nestler EJ. 2004. Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113–132.
- Chau DT, Roth RM, Green AI. 2004. The neural circuitry of reward and its relevance to psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep* 6:391–399.
- Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW. 2003. Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci* 23:2488–2493.
- DiLeone RJ, Georgescu D, Nestler EJ. 2003. Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life Sci* 73:759–768.
- Dong HW, Swanson LW. 2004. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 468:277–298.
- Dong HW, Swanson LW. 2006. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. *J Comp Neurol* 494:75–107.
- Fadel J, Deutch AY. 2002. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111:379–387.
- Geisler S, Zahm DS. 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat—anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 26:270–294.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker JL, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS. 2008. Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33:2688–2700.
- Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, DiLeone RJ. 2003. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci* 23:3106–3111.
- Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolanos CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ. 2005. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci* 25:2933–2940.
- Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G, Svensson TH. 1993. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Trans* 93:11–25.
- Grove EA. 1988. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. *J Comp Neurol* 277:347–364.
- Haber SN, Groenewegen HJ, Grove EA, Nauta WJ. 1985. Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J Comp Neurol* 235:322–335.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437:556–559.
- Herkenham M, Nauta WJ. 1979. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 187:19–47.
- Hervé D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A. 1987. Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res* 435:71–83.
- Hiroi N, Graybiel AM. 1996. Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol* 374:70–83.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ. 1992. Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764–5768.
- Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ. 1994. Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a longlasting AP-1

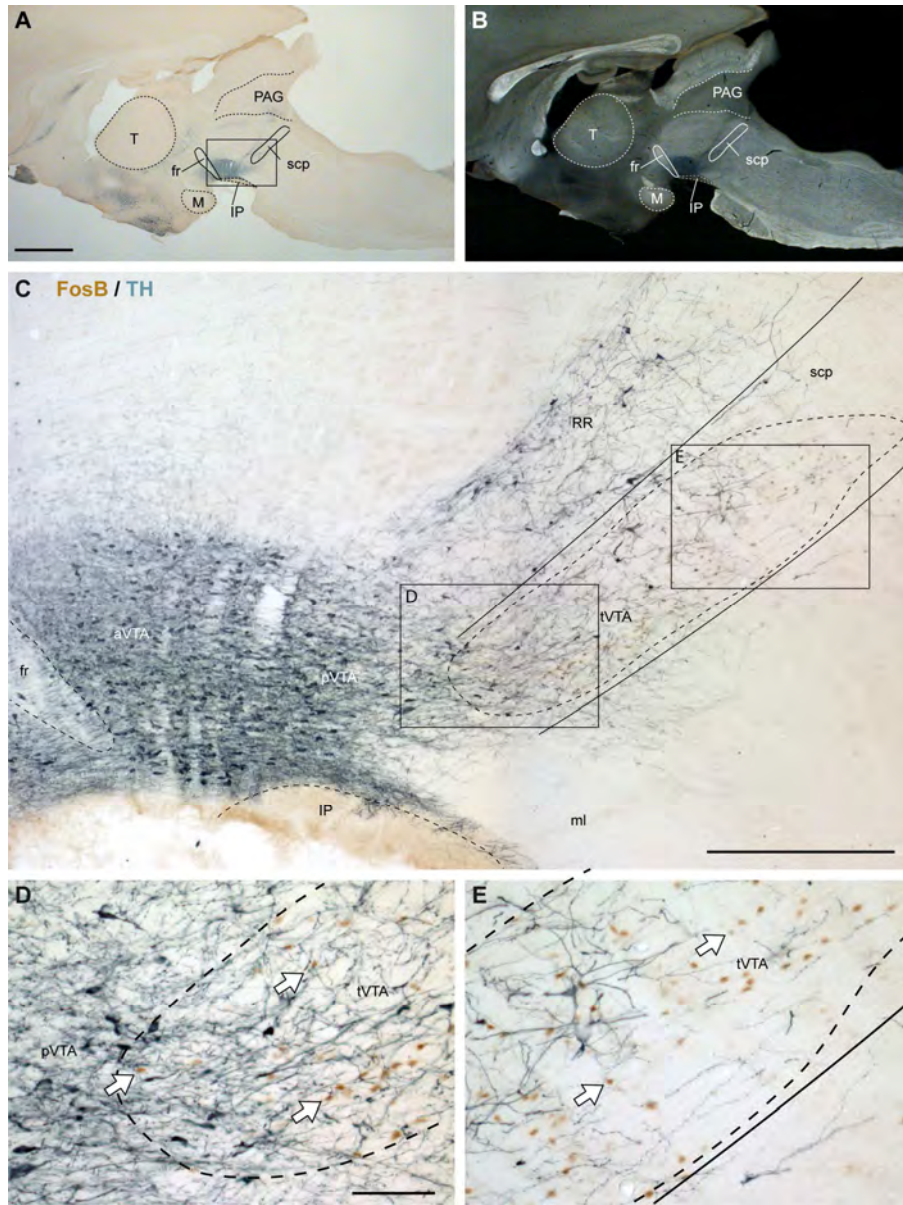
- complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14:4318–4328.
- Ijima K, Ohtomo K. 1988. Immunocytochemical study using a GABA anti-serum for the demonstration of inhibitory neurons in the rat locus ceruleus. *Am J Anat* 181:43–52.
- Ikemoto S, Wise RA. 2002. Rewarding effects of the cholinergic agents carbachol and neostigmine in the posterior ventral tegmental area. *J Neurosci* 22:9895–9904.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH. 2006. Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26:723–730.
- Jhou T. 2005. Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J Comp Neurol* 493:111–114.
- Kalivas PW. 1993. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Rev* 18:75–113.
- Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S. 2006. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 498:581–592.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang Y, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ. 1999. Expression of the transcription factor DeltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272–276.
- Kimura H, McGeer PL, Peng F, McGeer EG. 1980. Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208:1057–1059.
- King AE, Chung RS, Vickers JC, Dickson TC. 2006. Localization of glutamate receptors in developing cortical neurons in culture and relationship to susceptibility to excitotoxicity. *J Comp Neurol* 498:277–294.
- Klitenick MA, DeWitte P, Kalivas PW. 1992. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 12:2623–2632.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327–351.
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. 2003. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci* 23:7–11.
- Lecourtier L, Kelly PH. 2007. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31:658–672.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Ulery PG, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F. 2006. The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem* 98:1423–1431.
- Maldonado R. 2003. The neurobiology of addiction. *J Neural Trans S66*:1–14.
- Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ. 2006. Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:79–97.
- McClung CA, Nestler EJ. 2003. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6:1208–1215.
- McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ. 2004. DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Mol Brain Res* 132:146–154.
- Moga MM, Gray TS. 1985. Evidence for corticotrophin-releasing factor, neurotensin, and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus. *J Comp Neurol* 241:275–284.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024–1031.
- Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB. 1978. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 3:385–401.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW. 2001. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11042–11046.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13–25.
- Nye HE, Nestler EJ. 1996. Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* 49:636–645.
- Oades RD, Halliday GM. 1987. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117–165.
- Olson VG, Nestler EJ. 2007. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87–95.
- Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ, Hughes T, Self DW, Neve RL, Nestler EJ. 2005. Regulation of drug reward by CREB: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 25:5553–5562.
- Pang Y, Kiba H, Jayaraman A. 1993. Acute nicotine induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Mol Brain Res* 20:162–170.
- Pavon N, Martin AB, Mendialdua A, Moratalla R. 2006. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59:64–74.
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ. 2004. Induction of DeltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24:10594–10602.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M. 2005. DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817–2824.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015.
- Phillipson OT. 1979. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicularis nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187:117–144.
- Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C. 1997. Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275:83–86.
- Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM. 1992. Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 49:857–865.
- Robbins TW, Everitt BJ. 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228–236.
- Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ. 2005a. Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 31:134–145.
- Rodd ZA, Bell RL, Zhang Y, Murphy JM, Goldstein A, Zaffaroni A, Li TK, McBride WJ. 2005b. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* 30:330–338.
- Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ. 2000. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 149:217–224.
- Saper CB, Loewy AD. 1980. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 197:291–317.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM. 1979. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol* 183:689–706.
- Sarhan M, Freund-Mercier MJ, Veinante P. 2005. Branching patterns of parabrachial neurons projecting to the central extended amygdala: single axonal reconstructions. *J Comp Neurol* 491:418–442.
- Scammell TE, Saper CB. 2007. Orexins: looking forward to sleep, back at addiction. *Nat Med* 13:126–128.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB. 2000. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20:8620–8628.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey A. 2004. Visual system. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system, 3rd ed. New York: Academic Press. p 1083–1165.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ. 1998. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18:8003–8015.
- Swanson LW. 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321–353.

- Takada M, Tokuno H, Ikai Y, Mizuno N. 1994. Direct projections from the entopeduncular nucleus to the lower brainstem in the rat. *J Comp Neurol* 342:409–429.
- Tsai C. 1925. The optic tracts and centers of the opossum, *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* 39:173–216.
- Van Bockstaele EJ, Pickel VM. 1995. GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215–221.
- Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thoren P, Nestler EJ, Brene S. 2002. Delta FosB regulates wheel running. *J Neurosci* 22:8133–8138.
- Yamaguchi T, Sheen W, Morales M. 2007. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 25:106–118.
- Zahn DS, Jensen SL, Williams ES, Martin III JR. 1999. Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci* 11:1119–1999.
- Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA. 2002. Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22:7225–7233.

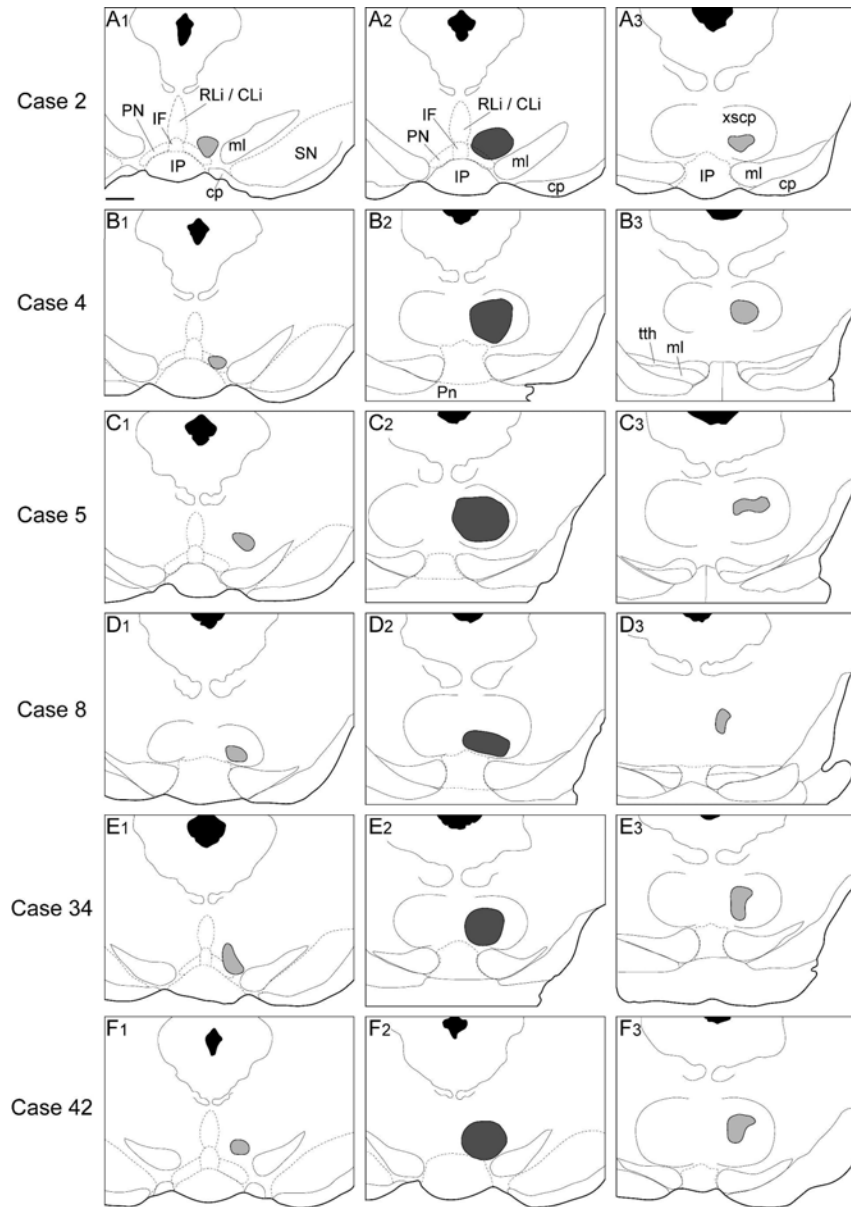
SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Fig. S1. Microphotographs illustrating the induction of FosB/DeltaFosB in the ventral tegmental area (VTA) by acute cocaine (20 mg/kg, i.p.) on a sagittal brain section (0.40 mm lateral to the midline). FosB/DeltaFosB (DAB, brown nuclei, white arrows) and tyrosine hydroxylase (TH) (Vector SG, blue-grey soma and processes) were evidenced by double immunostaining. **A,B:** Low power views of the section in brightfield (A) and darkfield (B) illumination. **C:** Microphotograph illustrating the boxed area in A. TH-immunoreactivity allows the delineation of the VTA and the retrorubral field (RR). FosB/DeltaFosB allows the delineation of the tVTA which follows the ventrodorsal course of the superior cerebellar peduncle (scp). **D,E:** Microphotographs illustrating the boxed areas in C at the rostral (D) and caudal (E) poles of the tVTA. Note the progressive decrease in TH immunoreactivity from rostral to caudal levels. Abbreviations: aVTA, anterior VTA; fr, fasciculus retroflexus; IP, interpeduncular nucleus; M, mamillary body; ml, medial lemniscus; PAG, periaqueductal gray; pVTA, posterior VTA; T, thalamus; tVTA, tail of the VTA;. Scale bars = 2 mm in A (applies to B); 500 μ m in C; 100 μ m in D (applies to E).

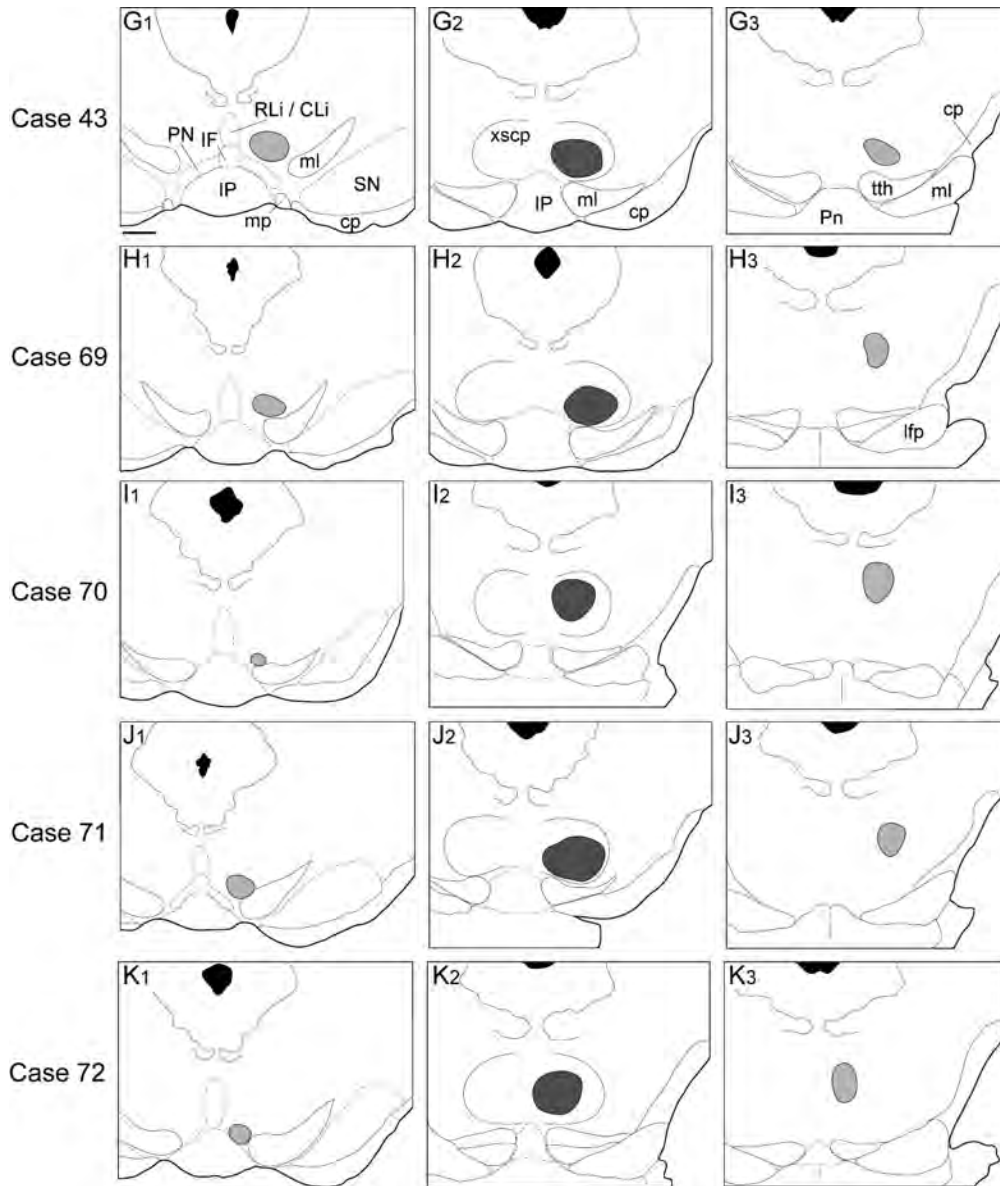
Fig. S2. A-K: Localization in the tVTA of the 11 FG injection sites selected for analysis. For each case, three *camera lucida* frontal section drawings are presented, showing the core (central drawings) and the rostral (left drawing) and caudal (right drawing) extents of injection sites considered to be in the tVTA. Note that for 6 out of these 11 sites (cases 8, 34, 69, 70, 71, 72) the correct location within the tVTA was also further confirmed by FosB/DeltaFosB immunostaining (data not shown). For abbreviations see list. Scale bar = 1 mm.



supplemental figure S1



supplemental figure S2



supplemental figure S2 continued

Chapitre 2

GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID CELLS WITH COCAINE-INDUCED DELTAFOSB IN THE VENTRAL TEGMENTAL AREA INNERVATE MESOLIMBIC NEURONS

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

Biological Psychiatry (2010) 67:88-92.

Les neurones GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale où la cocaïne induit Δ FosB innervent les neurones mésolimbiques.

Dans l'aire tegmentale ventrale (VTA), un traitement chronique ou aigu à la cocaïne induit l'expression du facteur de transcription FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la sous-région la plus postérieure de la VTA : la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA) (Perrotti et al., 2005 ; Kaufling et al., 2009).

Après avoir caractérisé les afférences de la tVTA (Kaufling et al., 2009 ; Jhou et al., 2009a), cette étude porte sur l'identification de ses efférences. Nous montrons que les sorties de la tVTA sont quantitativement moins importantes que celles de la VTA dopaminergique et que la sortie majeure de la tVTA se fait sur les portions plus antérieures de la VTA, c'est-à-dire sur la VTA antérieure (aVTA) et sur la VTA postérieure (pVTA).

En combinant traçage multiple et approches morphologiques, nous observons plus particulièrement que les neurones GABAergiques de la tVTA dans lesquels un traitement répété à la cocaïne induit l'accumulation du facteur de transcription Δ FosB ont des terminaisons axonales en apposition avec les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA qui projettent au noyau accumbens (NAc). En d'autres termes, les interneurones GABAergiques de la tVTA dans lesquels la cocaïne induit un marqueur de plasticité contactent les neurones dopaminergiques mésolimbiques. Ces données, associées au fait que la tVTA projette également massivement sur la substance noire compacte (SNC), suggèrent que la tVTA pourrait être un nouveau centre de contrôle des systèmes dopaminergiques. Une implication de la tVTA dans des troubles psychiatriques et/ou moteurs est ainsi fortement envisageable.

γ -Aminobutyric Acid Cells with Cocaine-Induced Δ FosB in the Ventral Tegmental Area Innervate Mesolimbic Neurons

Jennifer Kaufling, Pierre Veinante, Sophie A. Pawlowski, Marie-José Freund-Mercier, and Michel Barrot

Background: The transcription factor Δ FosB is implicated in the plasticity induced by drugs of abuse. We showed that psychostimulants induce Δ FosB in γ -aminobutyric acid (GABA) cells of a caudal subregion of the ventral tegmental area (VTA) that was named tail of the VTA (tVTA). Although tVTA mostly shares VTA inputs, its outputs remain to be characterized.

Methods: The tVTA efferents were studied by iontophoretic injections of the anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA). To further study VTA inputs arising from tVTA, injections of the retrograde tracer Fluoro-Gold were combined with multiple labeling by immunohistochemistry in rats treated with cocaine. Indirect projections from the tVTA to the nucleus accumbens were assessed with a double-tracing approach, cholera toxin B subunit (CTB) being delivered in the nucleus accumbens and BDA in the tVTA.

Results: Tract-tracing studies showed that tVTA heavily projects to the midbrain dopaminergic system and revealed terminal appositions with dopamine cells in the VTA. Double-labeling studies demonstrated that this tVTA output is mostly GABAergic, includes cells in which cocaine exposure induces Δ FosB, and displays appositions to dopamine cells projecting to the nucleus accumbens.

Conclusions: The GABA neurons expressing Δ FosB in the tVTA after cocaine exposure project to the dopamine mesolimbic neurons.

Key Words: Cocaine, DeltaFosB, dopamine, GABA, tract-tracing, VTA

Exposure to drugs of abuse induces the accumulation of Δ FosB, a stable splice variant of the *fosB* gene (1,2). This plasticity was mostly studied in the nucleus accumbens, the dorsal striatum, or the prefrontal cortex (3–5) and linked to functional consequences of drug abuse (1,2). We showed that Δ FosB is also expressed in the ventral tegmental area (VTA) after psychostimulant exposure (6,7). The VTA induction of Δ FosB is localized in γ -aminobutyric acid (GABA) neurons of the most caudal extent of the VTA, named “tail of the VTA” (tVTA) (6). The anatomical characterization of tVTA revealed that its afferents are similar to VTA afferents (7). In the present work, we combined tract-tracing and morphological approaches to study tVTA efferents. We report that tVTA main output is internal to the VTA itself and is mostly GABAergic. We show that GABA cells of the tVTA expressing Δ FosB after repeated cocaine exposure project to VTA and display appositions with dopamine neurons projecting to the nucleus accumbens.

Methods and Materials

Animals

Experiments were conducted in male Sprague-Dawley rats (280–340 g, Janvier, France) group-housed with food and water ad libitum. Procedures were performed in accordance with European Directives.

From the Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (JK, SAP, MB), Centre National de la Recherche Scientifique; and the University of Strasbourg (PV, M-JF-M), Strasbourg, France.

Address correspondence to Michel Barrot, Ph.D., Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg, France; E-mail: mbarrot@neurochem.u-strasbg.fr.

Received Apr 23, 2009; revised Jul 10, 2009; accepted Aug 2, 2009.

0006-3223/10/\$36.00
doi:10.1016/j.biopsych.2009.08.001

Surgery

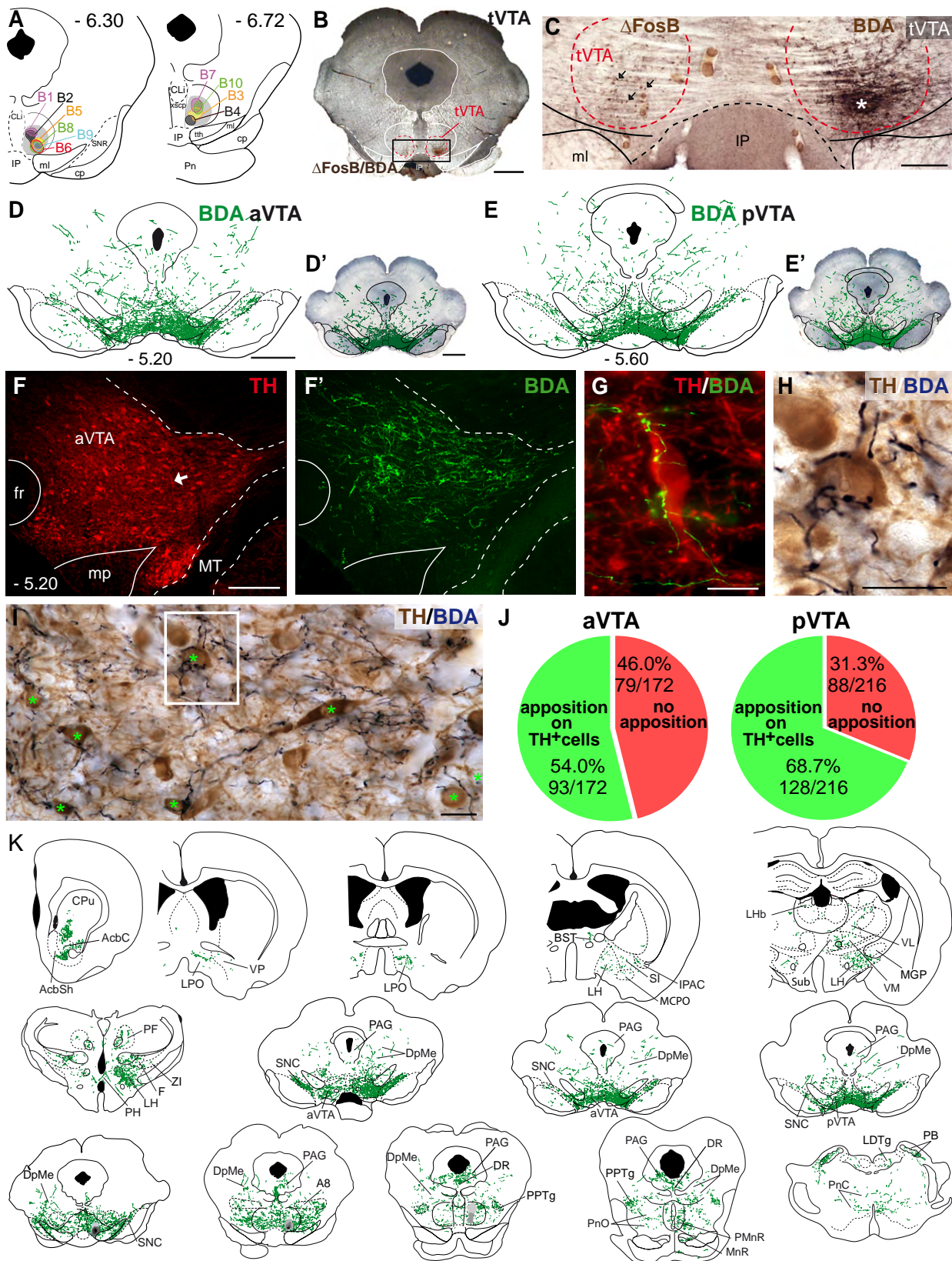
Rats underwent unilateral stereotaxic surgery under ketamine (87 mg/kg)/xylazine (13 mg/kg) anesthesia. Stereotaxic coordinates relative to bregma (8) were: tVTA, anteroposterior (AP) = -6.3 mm, lateral (L) = $+1.6$ mm, vertical (V) = -7.6 mm, 6° lateral angle; VTA, AP = -5.2 mm, L = $+1.4$ mm, V = -7.8 mm, 6° lateral angle; nucleus accumbens, AP = $+1.7$ mm, L = $+2.8$ mm, V = -6.5 mm, 10° lateral angle. Verticality was taken from dura. The anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) (MW 10,000; 5% in .25 mol/L potassium acetate; Molecular Probes, Carlsbad, California), the retrograde tracers Fluoro-Gold (FG) (2% in .9% sodium chloride [NaCl]; Fluorochrome, Denver, Colorado), and cholera toxin B subunit (CTB) (.25% in .1 mol/L Tris, .1% NaCl; Sigma, St. Louis, Missouri) were iontophoretically delivered ($+1$ – $+6$ μ A, 7-sec on/off cycles for 10–20 min) with glass micropipettes (tip diameter: 10–40 μ m) as previously described (7).

Histochemistry

The rat fixation was done 7–10 days after surgery (7). Intraperitoneal cocaine hydrochloride injections (20 mg/kg in .9% NaCl) (Cooper, France) were used to induce Δ FosB in the tVTA (6,7). Cocaine-treated rats received injection twice/day for 7 days and were perfused 3 hours after the last injection. Frontal sections of the brain (40 or 50 μ m) were performed on a vibratome (VT1000S, Leica, Germany). The BDA histochemistry was done as described (7,9), with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) peroxidase revelation or streptavidin AlexaFluor488 (Invitrogen S32354, 1/400; Invitrogen, Carlsbad, California). Immunohistochemistry was done as previously described (6,7). Primary antibodies were specific for: FG (Chemicon AB153, 1/50,000), CTB (Sigma C3062, 1/20,000), FosB/ Δ FosB (Santa-Cruz SC-48, 1/2000 for peroxidase reaction, 1/200 for immunofluorescence), tyrosine hydroxylase (TH) (Chemicon MAB318, 1/2500 for peroxidase reaction; AB1542, 1/1000 for immunofluorescence), glutamic acid decarboxylase 67 kDa (GAD67) (Chemicon MAB5406, 1/10,000), or choline acetyltransferase (ChAT) (Chemicon, AB144P, 1/500). Revelation was done with either fluorophore-labeled secondary antibodies (Vector Laboratories, Cy3- or FITC-labeled secondaries

from donkey, 1/400) or biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories [Burlingame, California] BA-2001 against mouse, 1/200; Amersham [Piscataway, New Jersey] RPN1004V1 anti-

rabbit, 1/200) and peroxidase/DAB reaction after avidin-biotin-peroxidase-complex amplification (ABC Elite; Vector Laboratories) (6,7,9).



Analysis

Drawings of the anterograde labeling were done from representative frontal sections with a Nikon Eclipse 80i microscope with NeuroLucida system (MicroBrightField, Williston, Vermont). Section analysis for double-labeling and microphotographs were done with an epifluorescence microscope (Leica DMRD) and a digital camera (Cool-snap, Princeton, New Jersey) interfaced to QHD capture software. Adobe Photoshop (San Jose, California) was used to adjust contrast, brightness, and sharpness.

Results

The tVTA location was defined by cocaine-induced FosB/ Δ FosB staining (Figures 1A–1C and Figure S1 in Supplement 1). The tVTA-restricted BDA injections resulted in the presence of a heavy plexus of BDA-positive fibers in the anterior and posterior VTA and in the substantia nigra pars compacta (SNC) (Figures 1D and 1E). Co-staining with TH revealed that a majority of VTA dopamine cells displayed somatic appositions from BDA-positive fibers and boutons (Figures 1F–1J). Because synaptic contacts cannot be discerned with light microscopy, future studies will be required to evaluate whether these appositions correspond to true synapses.

A general analysis of tVTA efferents, from the prefrontal cortex to the pons (Figure 1K, Table S1 in Supplement 1), confirmed that VTA and SNC were its main outputs. However, tVTA also innervated other brain regions. The tVTA outputs to the telencephalon were sparse and concerned mainly the striatal complex. They targeted the median part of the dorsal striatum and the rostral part of the nucleus accumbens. Some fibers were observed in the ventral pallidum and in three subregions of the extended amygdala: the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure (IPAC), the substantia innominata, and the bed nucleus of the stria terminalis. No fiber was observed in the prefrontal cortex, the amygdala, or the hippocampus. In the diencephalon, there was a hypothalamic continuum of BDA-positive fibers from the lateral preoptic area to the lateral and the posterior hypothalamus. Sparse fibers were found in the zona incerta, the lateral habenula, and the intralaminar and ventral thalamus. In the pons, the density of fibers was never as dense as in the mesencephalic dopaminergic nuclei: VTA, SNC, and the A8 dopamine cell group. The BDA-positive fibers were

found in the periaqueductal gray, the dorsal and median raphe nuclei, the deep mesencephalic nucleus, the pontine reticular nucleus, and the parabrachial nucleus. We observed some fibers in the laterodorsal tegmental nucleus and in the pedunculo-pontine tegmental nucleus.

To further characterize tVTA efferents to the VTA, we injected the retrograde tracer FG within the VTA and did multiple labeling for FG, Δ FosB, GAD67, and/or TH on tVTA sections from cocaine-treated animals (Figures 2A–2J). Saline-treated rats displayed no detectable Δ FosB expression in the tVTA, as previously reported (6,7) (data not shown). The VTA injections of FG (Figures 2C and 2E) resulted in retrogradely labeled cells in the tVTA (Figure 2C'). Specificity was controlled by injections above VTA, resulting in the absence of FG staining in the tVTA (Figures 2D and 2D'). The analysis of multiple labeling revealed that FG-positive cells in the tVTA were negative for TH (Figure 2G). With triple labeling for FG, Δ FosB, and GAD67, at least two-thirds of tVTA cells projecting to the VTA were identified as GABA cells (Figures 2B, 2H, and 2J). None of the FG-positive cells expressed ChAT (Figure S2 in Supplement 1). Moreover, approximately one-quarter of tVTA cells projecting to the VTA also expressed psychostimulant-induced Δ FosB (Figure 2B and 2F–2F''). These cells expressing Δ FosB after cocaine treatment were GABAergic, as previously reported (6,7), and controlled by GAD67 staining.

A double-tracing experiment was done to evaluate whether tVTA could influence the mesolimbic system (Figures 2K and 2L and Figure S3 in Supplement 1). Injections of CTB into nucleus accumbens (Figure 2M) and of BDA into tVTA (Figure 2N) resulted in CTB-labeled dopamine cells in the VTA (Figure 2O), a majority of them displaying BDA-positive appositions (Figures 2L and 2P).

Discussion

After cocaine exposure, Δ FosB is expressed in GABA neurons of the tVTA that send dense efferents to the midbrain dopaminergic system. This system influences numerous physiological functions (10) and is implicated in the etiology or treatment of neurological or psychiatric diseases, such as Parkinson's, schizophrenia, mood disorders, and drug abuse (11,12). The activity of the VTA dopamine neurons is known to be under GABAergic

Figure 1. Efferents of the tail of the ventral tegmental area (tVTA). **(A)** Biotinylated dextran amine (BDA) injection sites are represented on two frontal sections generated by camera lucida drawings, according to rat brain atlas (8). Each tVTA injection site ($n = 10$, cases B1 to B10) is presented at the level of its maximal extent. Approximate anteroposterior distance to the bregma (in mm) is indicated on each drawing. **(B,C)** Example of BDA injection (case B6, * in C). Rats received a cocaine injection 3 hours before perfusion. The BDA was revealed by histochemistry, and FosB/ Δ FosB immunohistochemistry (arrows in C) confirmed the injection placement within tVTA. **(D,E)** The tVTA projects to the VTA and the substantia nigra pars compacta (SNC), as shown by NeuroLucida drawings of BDA+ fibers after tVTA injection. Illustrations are presented at the level of anterior VTA (aVTA) **(D)** and posterior VTA (pVTA) **(E)**. Distance to the bregma (in mm) is indicated below each drawing. **(D',E')** Pictures illustrating the sections drawn in **D** and **E**, respectively. **(F,G)** BDA+ fibers display apposition to dopamine cell bodies in the VTA, as revealed by tyrosine hydroxylase (TH) (in red, **F**) and BDA (in green, **F'**). The example given in **G** corresponds to the cell indicated by the arrow in **F**. **(H,I)** Examples of BDA+ fibers with appositions on VTA dopamine neurons, revealed by light-microscopy (* in **I**). In this case, TH was revealed by immunoperoxidase reaction with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (light brown) and BDA fibers by histochemical reaction with DAB-Ni (dark blue). **(J)** In both aVTA (172 cells considered) and pVTA (216 cells considered), a majority of dopamine cells displayed appositions from BDA+ fibers originating from tVTA. **(K)** Drawings presenting tVTA efferents on representative frontal sections. Although VTA and SNC appeared as the outputs of highest density, tVTA also innervated other brain regions and nuclei (ncl): dorsal striatum (CPU); accumbens ncl (AcbSh, AcbC); ventral pallidum (VP); interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure (IPAC); substantia innominata (SI); bed ncl of the stria terminalis (BST); a continuum from the lateral preoptic area (LPO) to the lateral and the posterior hypothalamus (LH, PH, respectively); zona incerta (ZI); lateral habenula (LHb); intralaminar and ventral thalamus; A8 dopamine cell group; periaqueductal gray (PAG); dorsal, median, and paramedian raphe ncl (DR, MnR, PMnR); deep mesencephalic ncl (DpMe); pontine reticular ncl (PnO, PnC, respectively); parabrachial ncl (PB); pedunculo-pontine tegmental ncl (PPTg); and laterodorsal tegmental ncl (LDTg). No fiber was observed in the prefrontal cortex, amygdala, or hippocampus. CLI, caudal linear ncl of the raphe; cp, cerebral peduncle; F, ncl of fields of Forel; fr, fasciculus retroflexus; IP, interpeduncular ncl; MCPO, magnocellular preoptic ncl; MGP, medial globus pallidus; ml, medial lemniscus; mp, mammillary peduncle; MT, medial terminal ncl of the accessory optic tract; PF, parafascicular thalamic ncl; Pn, pontine ncl; SNR, substantia nigra pars reticulata; sub, submedial thalamic ncl; tth, trigeminothalamic tract; VL, ventrolateral thalamic ncl; VM, ventromedial thalamic ncl; xscp, decussation of the superior cerebellar peduncle. Scale bar = 1 mm in **(B,D,D')**, 200 μ m in **(C,F)**, 20 μ m in **(G–I)**.

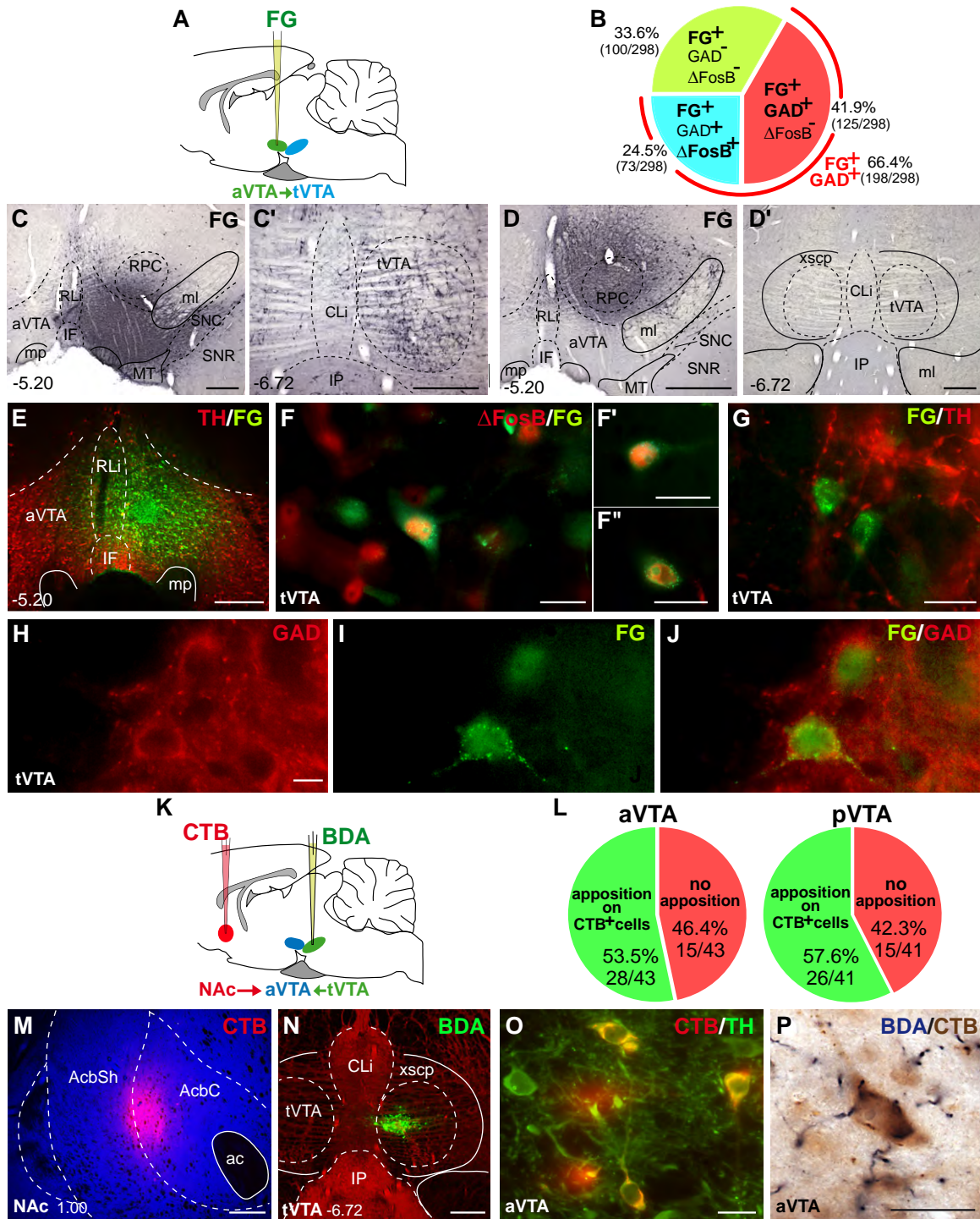


Figure 2. Characterization of efferents from the tVTA to the VTA. **(A)** The retrograde tracer FG was microiontophoretically injected into the aVTA to analyze labeled cells in the tVTA. Before perfusion, rats underwent a repeated treatment with cocaine (20 mg/kg IP, twice/day for 7 days, $n = 5$). **(B)** The quantitative analysis of 298 FG-labeled cells (FG+) in the tVTA indicated that at least two-thirds of tVTA cells projecting to the VTA were identified as γ -aminobutyric acid (GABA) cells by GAD 67 staining. Moreover, approximately one-quarter of tVTA cells projecting to the VTA also expressed psychostimulant-induced Δ FosB. **(C,C')** Example of an FG injection into aVTA **(C)** and the retrogradely labeled cells in the tVTA **(C')**. **(D,D')** Control injections done above VTA **(D)** did not result in FG+ cells in the tVTA. **(E)** Location of FG injection inside aVTA was controlled by TH immunofluorescence. **(F–J)** FG+ cells positive for cocaine-induced Δ FosB were present in the tVTA **(F–F')**; these cells were always negative for TH, and most of them were positive for GAD **(H–J)**. **(K)** To assess whether tVTA might influence the mesolimbic system, the retrograde tracer cholera toxin B subunit (CTB) was injected into nucleus accumbens (NAc), and the anterograde tracer BDA was injected into tVTA ($n = 5$). **(L)** The quantitative analysis of CTB+ cells in the aVTA and in the posterior VTA indicated that most of them presented appositions from BDA+ fibers arising from tVTA. **(M,N)** Examples of a CTB injection into NAc **(M)** and of a BDA injection into tVTA **(N)**. VTA cells retrogradely labeled by CTB are dopaminergic, as assessed by TH immunohistochemistry **(O)**, and the BDA+ fibers arising from tVTA display apposition with these CTB+ cell bodies in aVTA **(P)**. Scale bar = 300 μ m in **(C–E,M,N)**, 20 μ m in **(F–H,O,P)**. ac, anterior commissure; IF, interfascicular nucleus; RL*i*, rostral linear nucleus of the raphe; RPC, red nucleus, parvocellular part; other abbreviations as in Figure 1.

influences from both VTA inputs and intra-VTA GABA interneurons (13). The tVTA GABA neurons might constitute a localized subpopulation of these interneurons (14). Indeed, tVTA inputs (7,15) and the neuroanatomical overlap between the posterior VTA and the anterior tier of tVTA (7,14) suggest that tVTA belongs to VTA. Moreover, μ -opioid receptors that are expressed by VTA GABA cells are also strongly expressed in tVTA (15). Interestingly, a projection from the caudal pole of VTA to the substantia nigra was recently observed (16), which likely corresponds to tVTA outputs to midbrain dopamine cells. The tVTA could potentially be an inhibitory (GABA) control center for dopaminergic activity.

The mesolimbic system is a primary target for drugs of abuse, and Δ FosB accumulation is among the critical molecular changes they induce locally (1,2). Surprisingly, this induction was never observed in dopamine cells, even though their physiology is affected by drug exposure (17). Our results suggest that psychostimulant induction of Δ FosB in tVTA might affect dopamine neurons through the tVTA-VTA projection. Whether this induction would tend to decrease (opponent process) or to increase (sensitizing process) dopamine activity remains to be specified. Previous observations that Fos induction in tVTA is also present with psychostimulant self-administration (6,18) further strengthen the relevance of our results.

Prior neuroanatomical evidence for new subregions (such as core/shell dichotomy in the nucleus accumbens) (19) or for superstructures (such as extended amygdala) (20) proved to be seminal, opening the way to functional studies and to progress in brain physiology and pathology. By its massive projection to midbrain dopaminergic areas and by the plasticity locally induced by psychostimulants, the recently defined tVTA appears as a subregion of interest. Within the context of drug abuse for the mesolimbic system or of motor control for the nigrostriatal system, future studies will now be required to assess the functional influence of tVTA on the dopaminergic system and on behavior.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contracts UMR7168 and UPR3212), the University of Strasbourg (contract UMR7168), the Fondation pour la recherche Médicale (MB), and the Fédération pour la Recherche sur Le Cerveau (PV). The publication of this work is supported by the European Commission Coordination Action (ENINET, contract LHSM-CT-2005-019063).

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

Supplementary material cited in this article is available online.

1. McClung CA, Ulevy PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004): DeltaFosB: A molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Mol Brain Res* 132:146–154.
2. Nestler EJ (2008): Review. Transcriptional mechanisms of addiction: Role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3245–3255.
3. Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992): Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764–5768.
4. Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talbot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997): Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275:83–86.
5. Winstanley CA, LaPlant Q, Theobald DE, Green TA, Bachtell RK, Perrotti LI, *et al.* (2007): DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *J Neurosci* 27:10497–10507.
6. Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulevy PG, *et al.* (2005): DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817–2824.
7. Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009): Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597–621.
8. Paxinos G, Watson C (1998): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th ed.* San Diego: Academic Press.
9. Sarhan M, Freund-Mercier MJ, Veinante P (2005): Branching patterns of parabrachial neurons projecting to the central extended amygdala: Single axonal reconstructions. *J Comp Neurol* 491:418–442.
10. Le Moal M, Simon H (1991): Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71:155–234.
11. Iversen SD, Iversen LL (2007): Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30:188–193.
12. Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006): The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59:1151–1159.
13. Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ (2006): Excitability of dopamine neurons: Modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:79–97.
14. Olson VG, Nestler EJ (2007): Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87–95.
15. Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009): The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513:566–596.
16. Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008): Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153:196–213.
17. Thomas MJ, Malenka RC (2003): Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:815–819.
18. Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, *et al.* (2008): Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33:2688–2700.
19. Zaborsky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M (1985): Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: A morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 14:427–453.
20. Alheid GF, Heimer L (1988): New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striato-pallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27:1–39.

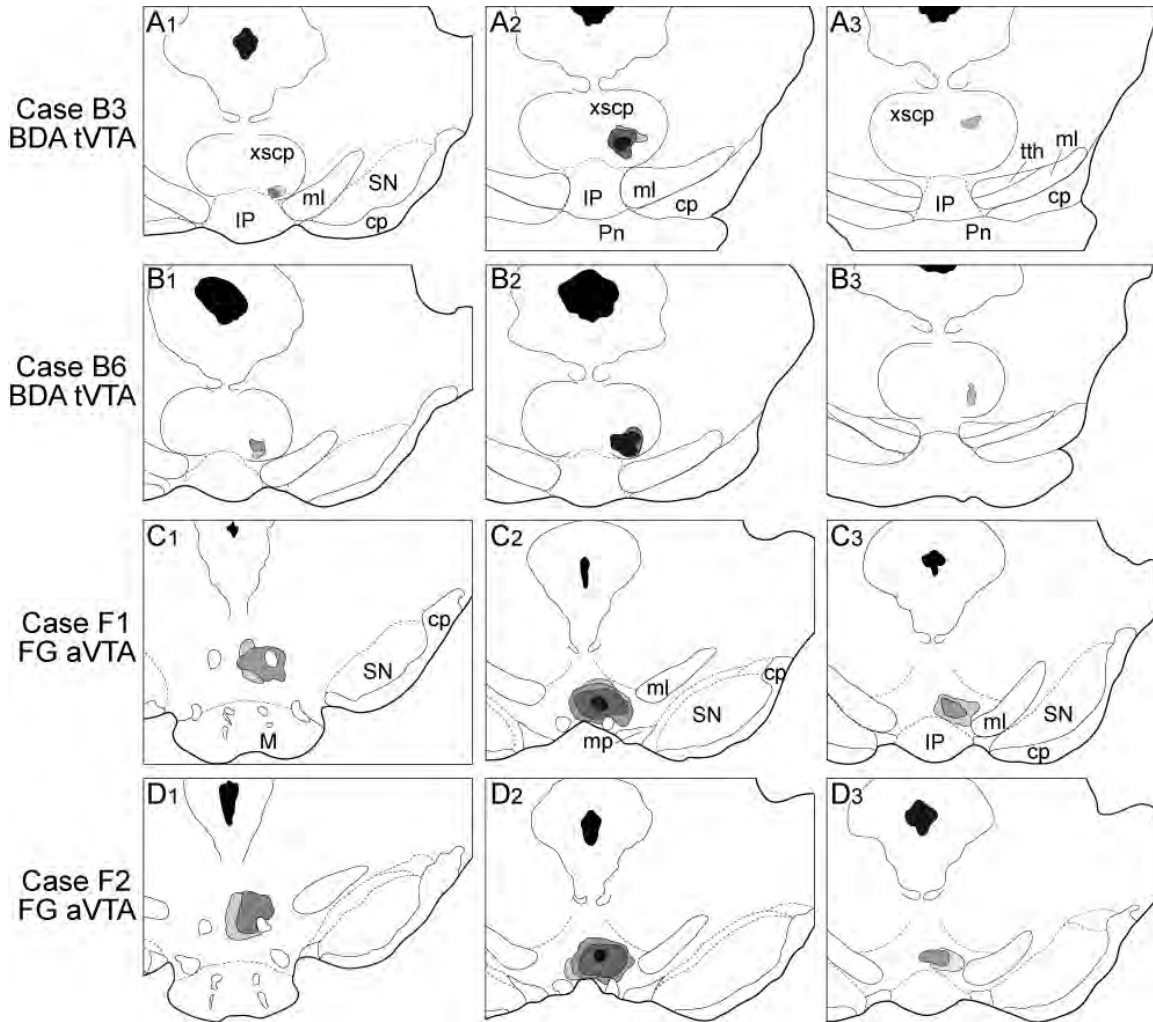


Figure S1. Examples of biotinylated dextran amine (BDA, cases B3 and B6) and Fluoro-Gold[®] (FG, cases F1 and F2) injection sites. NeuroLucida drawings from 3 frontal sections are presented for 2 examples of BDA injections in the tVTA (**A,B**) and for 2 examples of FG injection in anterior VTA (**C,D**). They show the core (central drawings, darkest area) and the rostral (left drawings) and caudal (right drawings) extents of the injection sites. aVTA, anterior ventral tegmental area; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; M, mammillary nucleus; ml, medial lemniscus; mp, mammillary peduncle; Pn, pontine nuclei; SN, substantia nigra; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, decussation of the superior cerebellar peduncle.

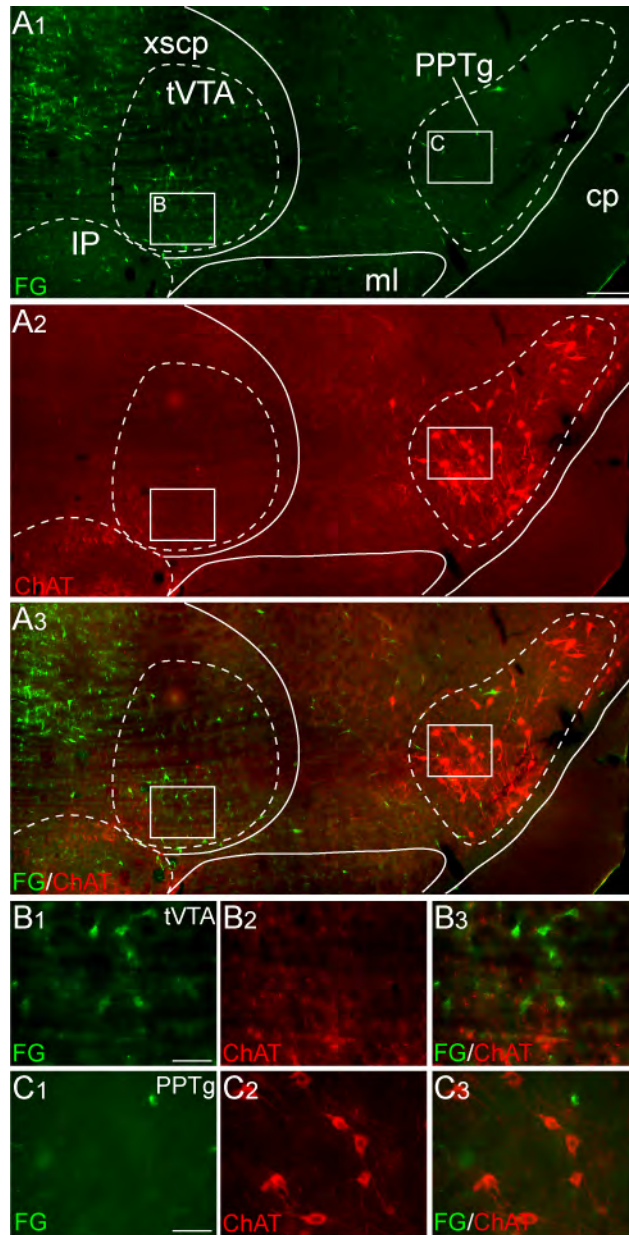


Figure S2. Characterization of tVTA efferents to the VTA. Fluoro-Gold[®] (FG, green) was microiontophoretically injected into the aVTA to analyze labeled cells in the tVTA. Choline acetyltransferase (ChAT, red) was used as a marker for cholinergic neurons. ChAT⁺ cells are present in the pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) but they were not positive for FG. No ChAT⁺ cell was observed in the tVTA. (A₁-A₃) Example of FG fluorescence (A₁), ChAT immunofluorescence (A₂) and the merged picture (A₃). (B₁-B₃) Detailed views corresponding to the tVTA inserts drawn in (A). (C₁-C₃) Detailed views corresponding to the PPTg inserts drawn in (A). Scale bar = 200 μ m in (A), 50 μ m in (B, C). For abbreviations, see Figure S1.



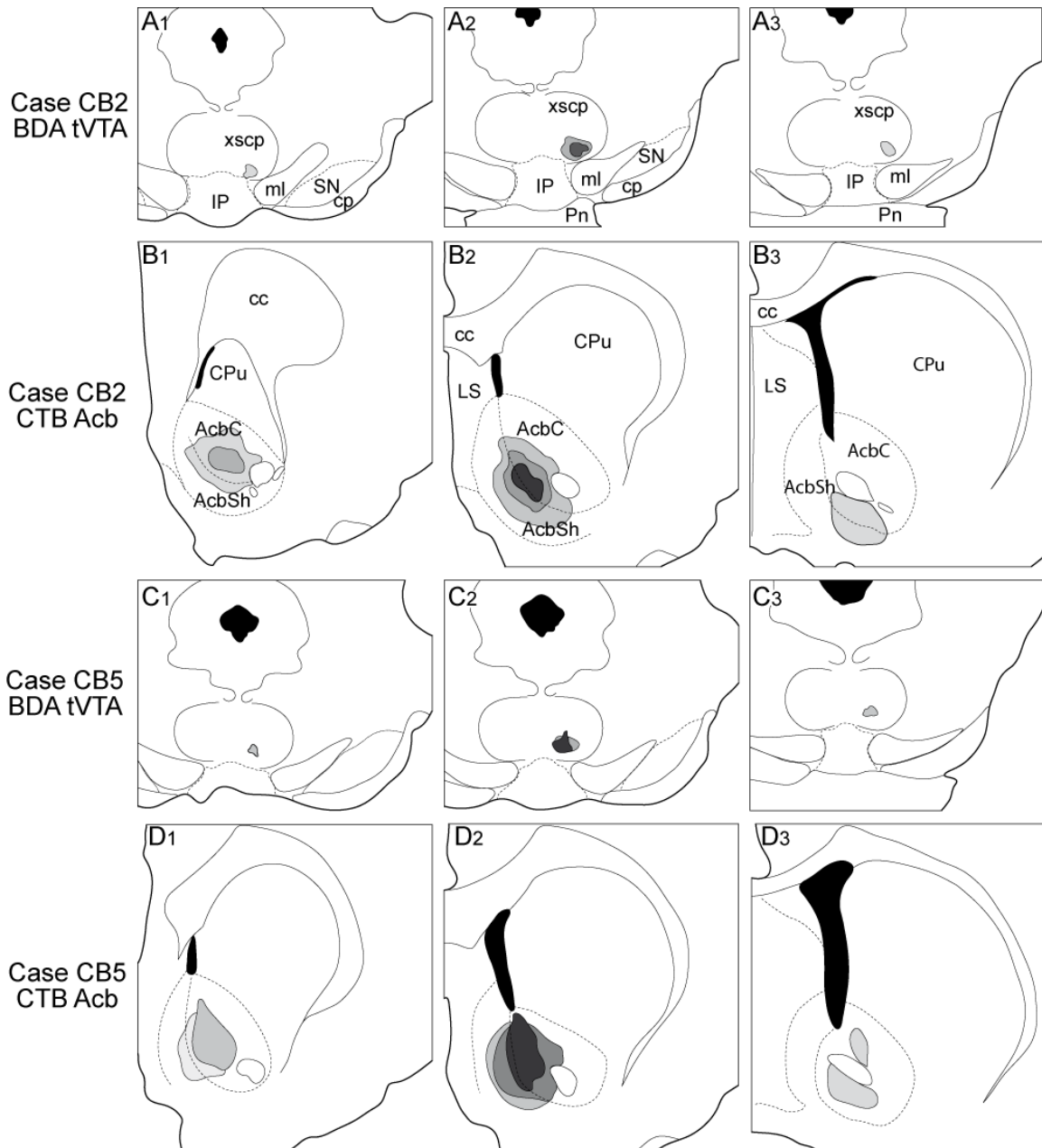


Figure S3. Examples of cholera toxin B subunit (CTB) and Fluoro-Gold[®] (FG) injection sites in rats with double tracer injection. For 2 of the experimental rats (cases B2 and B5), the neuroLucida drawings from 3 frontal tVTA sections (BDA injections (**A,C**)) and 3 frontal accumbal sections (CTB injections (**B,D**)) are presented. They show the core (central drawings, darkest area) and the rostral (left drawings) and caudal (right drawings) extents of the injection sites. AcbC, nucleus accumbens, core; AcbSh, nucleus accumbens, shell; cc, corpus callosum; CPu, caudate putamen; LS, lateral septum; see Figure S1 for other abbreviations.

Table S1. Efferents from the tVTA. The anterograde tracer BDA was injected into tVTA and labeled fibers were analyzed from the prefrontal cortex to the pons. The table presents the list of structures with fibers from tVTA, with a qualitative estimate of fiber density.

structures	density of fibers	structures	density of fibers
Cerebral cortex	0	Rubral nuclei	
Lateral septum	+/-	Prerubral field	++
Caudate putamen, rostral	++	A8 dopamine cells	++
Accumbens ncl		Pararubral nucleus	++
Accumbens ncl, Core	++	Retrorubral field	++
Accumbens ncl, Shell	++	Substantia nigra	
Ventral pallidum	+	Pars compacta	+++
Bed nucleus of the stria terminalis	+	Pars reticulata	+
Zona incerta	++	Ventral tegmental area	
Substantia innominata	++	Anterior part	+++
IPAC	+	Posterior part	+++
Globus pallidus, lateral and medial part	+/-	Periaqueductal gray	++
Hippocampus	0	Raphe	
Amygdala	0	Dorsal raphe ncl	++
Thalamus / Epithalamus		Paramedian raphe ncl	++
Midline thalamic ncl	+/-	Median raphe ncl	+
Intralaminar thalamic ncl	+	Parabrachial ncl	+
Mediodorsal thalamic ncl	+/-	Locus coeruleus	+/-
Ventral thalamic ncl	+	Reticular formation	
Submedius thalamic ncl	++	Deep mesencephalic ncl	++
Ncl of the fields of Forel	+	Pontine reticular ncl, oral part	++
Lateral habenula	+/-	Pontine reticular ncl, caudal part	++
Hypothalamus		Oculomotor ncl	+
Lateral preoptic area	++	Tegmental ncl	
Magnocellular preoptic ncl	+	Pedunculopontine tegmental ncl	++
Lateral hypothalamic area	+++	Dorsomedial tegmental area	+/-
Posterior hypothalamic area	++	Laterodorsal tegmental ncl	+
		Dorsal tegmental ncl	+/-
		Pontine ncl	+/-

Fiber density: 0, no fiber; +/-, very low density of fibers; +, low density of fibers; ++, high density of fibers; +++, very high density of fibers.

IPAC, interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure; Ncl, nucleus.

Chapitre 3

INFLUENCE DE LA tVTA SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA VTA

Kaufling J, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

I) Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) sont le point de départ du système dopaminergique mésolimbique. Ils sont connus pour avoir une activité spontanée régulée notamment par des interneurons GABAergiques localisés au sein même de la VTA antérieure et postérieure (a/pVTA).

En caractérisant neuroanatomiquement la queue GABAergique de la VTA (tVTA) (Kaufling et al., 2009, 2010) nous avons montré que les neurones GABAergiques de cette région reçoivent des afférences issues de structures projetant également à l'a/pVTA. Ceci nous a notamment permis de montrer que la tVTA est une sous-région de la VTA. La découverte neuroanatomique majeure est l'identification des efférences de la tVTA. En effet, nous avons montré que les neurones GABAergiques de la tVTA projettent massivement aux neurones dopaminergiques de l'a/pVTA. Ces observations nous ont ainsi permis d'émettre l'hypothèse que les neurones GABAergiques de la tVTA peuvent être une nouvelle population d'interneurones de la VTA qui contrôlent les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA. La queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale serait ainsi un nouveau centre de contrôle du système dopaminergique mésolimbique.

Afin de vérifier fonctionnellement une partie de nos hypothèses, nous avons, grâce à des enregistrements électrophysiologiques unitaires de neurones de l'a/pVTA *in vivo*, observé l'effet de stimulations électriques de la tVTA sur l'activité des neurones dopaminergiques et non dopaminergiques de l'a/pVTA.

II) Matériels et méthodes

A) Traitement des animaux

Pour cette étude une trentaine de rats mâles Sprague-Dawley (320-390g, Janvier, Le Genet-St-Isle, France) ont été utilisés, mais les résultats analysés dans ce chapitre ont été obtenus avec 11 rats. Les animaux sont hébergés dans des conditions standard (22°C, cycle jour/nuite de 12/12h, lumière à partir de 7h00), avec eau et nourriture *ad libitum*. Les animaux sont utilisés après au moins une semaine de stabulation à l'animalerie.

Après induction de l'anesthésie par un mélange gazeux d'oxygène (1 L/min) et d'isoflurane 3%, le rat est placé dans un cadre stéréotaxique (David Kopf). Sa tête est rasée et une injection sous-cutanée d'une solution analgésique de lidocaïne (Xylovet ; 4,26% ; 0,4 mL) est effectuée sous le scalp. Un gel hydratant (Ocry-gel ; laboratoire TVM) est appliqué sur les yeux pour éviter leur dessèchement. Les animaux restent sous anesthésie gazeuse pendant toute l'expérience (O₂ 300 mL/min, isoflurane 2%). Une couverture chauffante (Harvard Apparatus) reliée à une sonde rectale maintient leur température interne autour de 37°C.

A la fin des enregistrements électrophysiologiques, l'animal est sacrifié par surdose d'hydrate de chloral (2,5 mL à 40%, pH 7,4). Le cerveau est prélevé et plongé 45 secondes dans l'isopentane à -40°C. Il est ensuite stocké à -20°C jusqu'au contrôle histologique. Lorsque des injections juxtacellulaires de neurobiotine sont effectuées, l'animal subit une perfusion intracardiaque avec 100 mL de tampon phosphate (PB : 0,1 M, pH 7,4) suivi par 500 mL de paraformaldéhyde (PAF) 4% dans du PB. Le cerveau est récupéré, post-fixé 24 h dans le PAF 4%, puis stocké à -4°C dans du PBS (PB 0,1 M, NaCl 0,9%, pH 7,4).

B) Protocole d'électrophysiologie

1) Electrodes

Les enregistrements électrophysiologiques ainsi que les injections microiontophorétiques et juxtacellulaires sont réalisés en utilisant une microélectrode constituée d'une pipette de verre (Harvard Apparatus, borosilicate, diamètre externe 1,2 mm). La pipette est étirée sur une étireuse verticale (Narishige) et sa pointe est brisée sous contrôle microscopique pour obtenir un diamètre externe d'environ 1 µm. La microélectrode d'enregistrement ainsi réalisée est remplie soit d'une solution filtrée de bleu de Pontamine (Chicago sky blue 6B,

Sigma) à 4% dans de l'acétate de sodium 0,5 M pour permettre le marquage du site d'enregistrement, soit de neurobiotine (Vector) 2% dans de l'acétate de potassium 0,5 M pour les injections juxtacellulaires.

L'électrode de stimulation est une électrode bipolaire concentrique en tungstène d'un diamètre de 200 μm (SNX-100, Rhodes Medical Instruments).

2) Dispositifs d'enregistrement et de stimulation

Le dispositif d'enregistrement (Figure 1) utilisé permet d'étudier l'activité unitaire extracellulaire des neurones situés à proximité de la microélectrode de verre. Le signal détecté par un fil d'argent chloruré est amplifié par un amplificateur intracellulaire (Neurodata IR283, gain x10 DC) puis par un amplificateur différentiel (Brownlee Model 440, gain x100 AC, filtres passe-haut 300 Hz et passe-bas 5 kHz). Ces signaux sont visualisés sur les deux canaux d'un oscilloscope (Tektronik). L'amplificateur intracellulaire permet l'injection de courant, continu ou pulsé, par l'électrode d'enregistrement via le circuit résistif interne de l'amplificateur. Le déclenchement des pulses de courant se fait à partir d'un stimulateur (Grass S48). Le signal amplifié est également traité par un analyseur d'amplitude (Frederick Haer & Co) qui transforme les potentiels d'action en ondes TTL, ce qui permet de compter le nombre de potentiels d'action toutes les 10 secondes, de réaliser une intégration de la fréquence de décharge du neurone enregistré et de visualiser la fréquence instantanée. Pour l'analyse ultérieure, le signal brut (AC et DC) est digitalisé par une interface puis enregistré sur ordinateur avec le système d'acquisition et d'analyse DATAPAC 2k2 (Run Technologies). Le signal est enfin transmis à un haut-parleur via un analyseur audio (Frederick Haer & Co).

L'électrode de stimulation est reliée à une unité de stimulation isolée, elle-même reliée à un générateur (0-96 V). Les paramètres de stimulation sont contrôlés par un programmeur (Digitimer). Le signal de déclenchement est digitalisé pour réaliser ultérieurement des histogrammes de temps péristimulatoires.

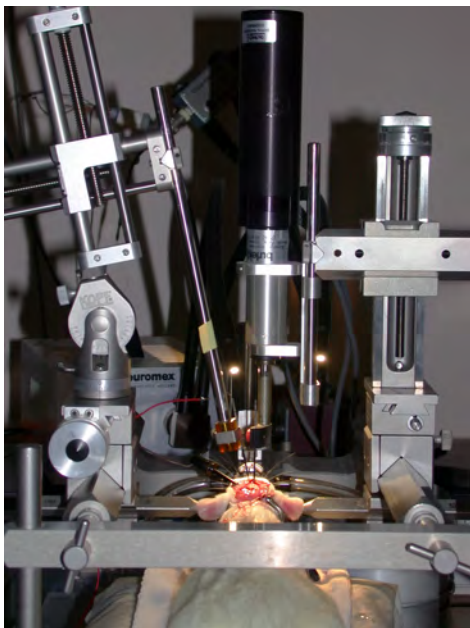
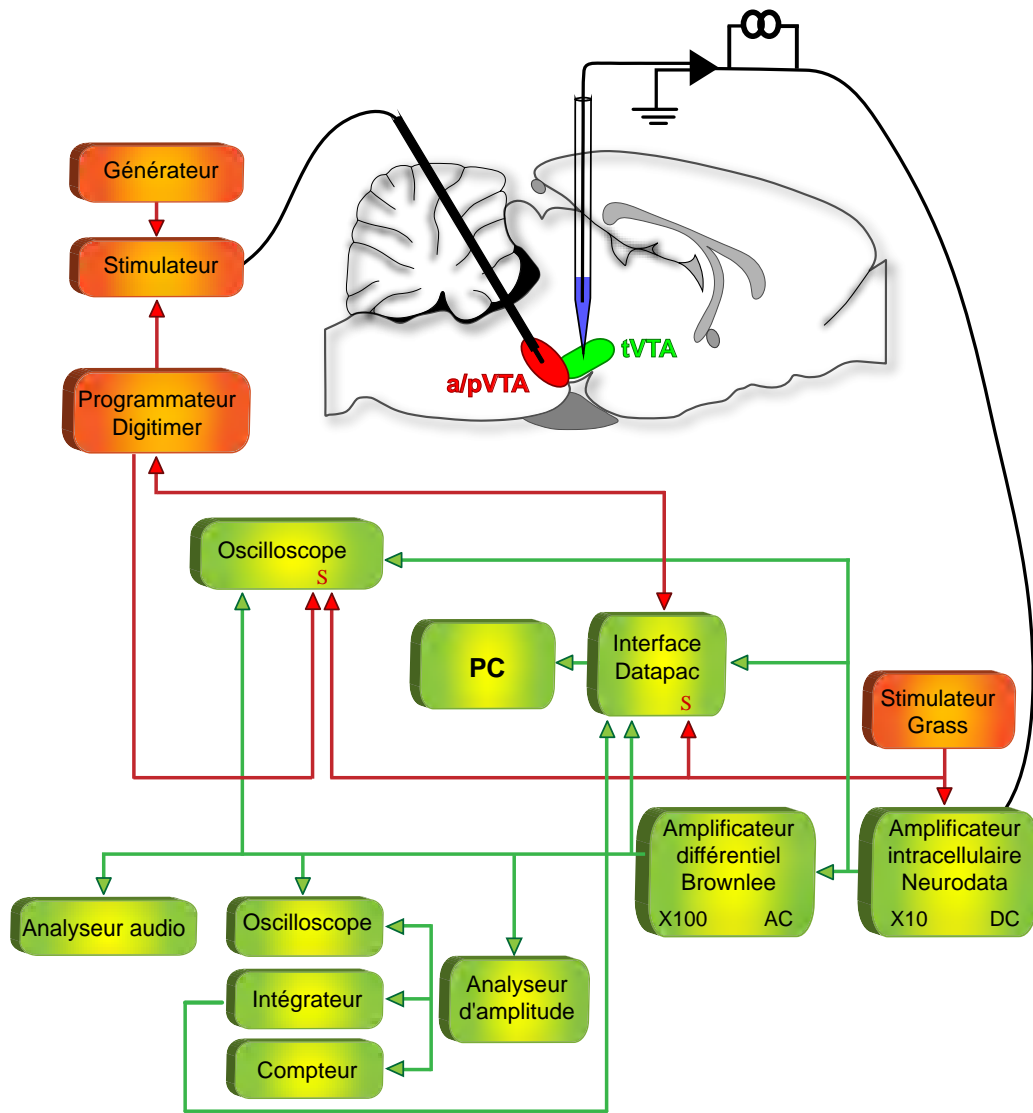


Figure 1 : Montage électrique utilisé pour les enregistrements unitaires extracellulaires. En haut, le schéma du circuit d'enregistrement est représenté en vert et celui du circuit de stimulation en rouge (S : synchronisation). En bas, les photographies illustrent le dispositif expérimental stéréotaxique.

3) Descente des électrodes

L'électrode de stimulation est descendue dans la tVTA. La faible distance entre la structure de stimulation (tVTA) et celle d'enregistrement (aVTA), ainsi que l'encombrement des micromanipulateurs, nous obligent à incliner l'électrode de stimulation d'un angle de 26°. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées dans ce cas pour descendre l'électrode dans la tVTA sont : antéropostériorité (AP) -6,3 mm, latéralité (L) +1,1 mm par rapport au bregma suivant l'atlas de Paxinos et Watson (1998) et verticalité (V) -7,8 mm par rapport à la dure mère. Lors de la validation des protocoles, une électrode de stimulation a été descendue dans le NAc de certains animaux selon les coordonnées suivantes : (AP) +1,7 mm et (L) +2,8 mm par rapport au bregma suivant l'atlas de Paxinos et Watson (1998), angle latéral de 10°, (V) -6,5 mm par rapport à la dure mère.

La microélectrode d'enregistrement est descendue dans l'aVTA aux coordonnées suivantes : (AP) -5,2 mm et (L) +1 mm par rapport au bregma suivant l'atlas de Paxinos et Watson (1998), (V) entre -7,2 à -8 mm par rapport à la dure mère. Une électrode de référence est placée à l'arrière du crâne.

L'électrode d'enregistrement est attachée à un microdescendeur piézoélectrique (Burleigh, Inchworm LSS-1000) fixé à un micromanipulateur. Elle est descendue jusqu'au cortex cérébral. Le signal audio permet de déterminer quand le circuit se ferme et donc de définir la profondeur 0 ajustée sur la commande du microdescendeur. Un pulse de courant positif (0,2 nA, 20 ms, 1 Hz) est alors déclenché par le stimulateur Grass au travers de la pipette d'enregistrement. L'amplitude en volts du pulse obtenu dépend directement de la résistance de l'électrode. Sa compensation, par le circuit de l'amplificateur intracellulaire de façon à supprimer la déflexion, permet de mesurer la résistance de la pipette (25 MOhms en moyenne). La réapparition du pulse en cours de descente traduit une augmentation de la résistance et indique donc que l'électrode s'approche d'une cellule. La micropipette est rapidement descendue jusqu'à une profondeur d'environ -7 mm tout en vérifiant sa résistance. La descente se fait ensuite avec des pas de 1 µm jusqu'à une profondeur de -8 mm. Cette zone, correspondant à l'aVTA, comprend les neurones dopaminergiques.

4) Activité spontanée des neurones, identification des neurones dopaminergiques et stimulation de la tVTA

Lorsque l'électrode approche une cellule spontanément active, l'apparition de potentiels d'action s'ajoute à l'augmentation de résistance. Ces potentiels sont d'abord détectés par l'analyseur audio, puis deviennent visibles sur l'oscilloscope lorsque la pipette est lentement

approchée de la cellule. La descente est poursuivie, en contrôlant la résistance, jusqu'à ce que les potentiels d'action soient d'une taille suffisante pour les discriminer du bruit de fond. Les pulses de courant dépolarisant sont alors arrêtés, la profondeur de la cellule est notée et un épisode d'au moins 3 min d'activité spontanée est enregistré après stabilisation de l'activité.

En accord avec l'étude d'Ungless et collaborateurs (2004), un neurone de la VTA est défini comme dopaminergique s'il remplit les 3 conditions suivantes :

- Les potentiels d'action larges et triphasiques après filtration entre 300 et 5 000 Hz sont d'une durée supérieure ou égale à 2 ms.
- La « phase positive » du potentiel d'action, qui s'étend du début du potentiel d'action jusqu'au pic de la déflexion négative, est supérieure ou égale à 1,1 ms.
- L'activité spontanée est lente, inférieure à 10 potentiels d'action par seconde (PA/s).

La stimulation électrique de la tVTA est réalisée par des séries de 3 stimulations rectangulaires (0,5 ms ; 20Hz ; 3 à 5 V). Une série de 3 stimulations est effectuée toutes les 10 secondes pour laisser le temps à la cellule de récupérer de la stimulation précédente.

5) Marquage des sites d'enregistrement, de stimulation et injections juxtacellulaires

Une fois les enregistrements effectués, les sites d'enregistrement et de stimulation sont marqués. L'emplacement de la micropipette d'enregistrement est marqué à la fin de la trajectoire par l'injection iontophorétique de bleu de Pontamine contenu dans la pipette (-5 μ A, 5 min suivi de -10 μ A, 5 min suivi de -15 μ A, 5 min). Le site de stimulation est marqué par électrocoagulation (1 mA courant continu, 10 sec).

Lors de la validation de nos protocoles, afin de vérifier la neurochimie d'un neurone enregistré, des injections juxtacellulaires ont été réalisées dans quelques cas (n=5). Le marquage juxtacellulaire (Pinault, 1996), consiste à éjecter la neurobiotine de l'électrode dans un neurone après sa caractérisation électrophysiologique. Le principe est d'approcher l'électrode le plus près possible de la membrane du neurone, puis d'appliquer des créneaux de courant dépolarisant. La neurobiotine est ainsi éjectée et pénètre la cellule par des microlésions membranaires. En pratique, l'intensité du courant d'injection est augmentée jusqu'à ce que la cellule décharge pendant les créneaux de courant positif. Durant toute l'injection (1-5 nA ; 500 ms on /off ; 3 à 10 min), on contrôle la position de l'électrode par rapport à la cellule. Après l'injection, l'électrode est retirée avec précaution tout en contrôlant la survie de la cellule.

C) Analyse des données

1) Contrôles histologiques

Des coupes frontales (50 μm) de cerveaux congelés sont réalisées au cryostat (Leica). Les sections couvrant l'étendue de la VTA et de la tVTA sont récupérées sur lames gélatinées et ramenées à température ambiante pour vérifier la localisation des sites d'enregistrement, signalés par du bleu de Pontamine, et de stimulation, signalés par un site d'électrocoagulation.

Après observations et photographies, une contre-coloration au crésyl violet est réalisée sur les coupes d'intérêt. Ce colorant basique marque les noyaux des cellules, ce qui permet de mieux distinguer les structures et les faisceaux de fibres. Les lames sont dégraissées (2 x 5 min dans du xylol), réhydratées (2 x 5 min dans l'alcool 100°, 5 min dans l'alcool 95°, 5 min dans l'alcool 70°, 10 sec dans de l'eau distillée), plongées dans le colorant (30 min dans du crésyl violet 0,5%), puis lavées 3 à 5 min dans l'eau distillée. Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool croissants (70, 95, 100 et 100°), dégraissées dans du roti-histol et couvertes avec un milieu de montage Eukitt.

2) Révélation en immunofluorescence

Pour corréler les enregistrements électrophysiologiques à la nature dopaminergique des neurones enregistrés, certains d'entre eux ont été marqués de manière juxtacellulaire par de la neurobiotine 2%. Le cerveau fixé est coupé au vibratome (Leica). Les coupes flottantes de VTA (30 μm d'épaisseur) sont récupérées pour détecter la neurobiotine ainsi que l'enzyme de synthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase (TH), par double fluorescence.

Les sections sont rincées 3 x 10 min dans du PBS, puis 45 min dans du PBS-T (PBS, triton 0,5%) contenant 5% de sérum d'âne pour saturer les sites immunogènes aspécifiques. Elles sont incubées à température ambiante pendant la nuit dans du PBS-T contenant 1% de sérum d'âne, l'anticorps primaire polyclonal anti-TH produit chez le mouton (Chemicon, AB1542, 1/500) et de la streptavidine-AMCA (Jackson ImmunoResearch, 1/1000) pour détecter la neurobiotine. Le lendemain, après 3 rinçages de 10 min dans du PBS, les sections sont incubées pendant 1h30 dans du PBS contenant l'anticorps secondaire anti-mouton produit chez l'âne et couplé au fluorophore Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 1/200). Après 3 rinçages de 10 min dans du PBS, les coupes sont montées sur lames et mises entre lame et lamelle dans un milieu aqueux ralentissant l'extinction de la fluorescence (Vectashield, Vector).

3) Iconographie

Les préparations sont observées grâce à une loupe binoculaire (Leica) équipée d'un appareil photo numérique (Nikon) ou grâce à un microscope (Leica), en lumière transmise ou en fluorescence, équipé d'une caméra (Cool-snap, Princeton, NJ, USA). Les microphotographies numérisées sont ensuite traitées avec le logiciel Photoshop CS3 (Adobe) pour ajuster les niveaux de couleurs et, si nécessaire, le contraste et la luminosité. Les images en superposition de fluorescences sont également réalisées sous Photoshop.

Les coupes contenant le dépôt de bleu de Pontamine sont dessinées à l'aide d'un microscope (Nikon, Eclipse 600) équipé d'une caméra Lucida, les dessins transférés sous le logiciel Illustrator CS3 (Adobe) et la trajectoire de l'électrode d'enregistrement reconstituée pour localiser les cellules étudiées.

4) Analyse des données électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques stockés sont analysés à l'aide du programme Datapac 2K2 (Run Technologies, V3.0). Ce programme permet de sélectionner, à partir du signal brut, les événements correspondant aux potentiels d'action. Deux types d'analyse sont majoritairement utilisés. D'une part, un moyennage d'une cinquantaine de potentiels d'action permet de déterminer leur allure et les durées de leurs phases. D'autre part, l'histogramme des temps péristimulatoires permet d'étudier l'influence d'une stimulation de la tVTA sur l'apparition des potentiels d'action. Ainsi, l'effet activateur ou inhibiteur de la stimulation peut être déduit en comparant l'activité de la cellule avant et après la stimulation. De plus, la latence d'apparition du changement d'activité ainsi que sa durée peuvent être mesurées à partir de cet histogramme. Enfin, la fréquence de décharge des potentiels d'action est également déterminée.

III) Résultats

A) Caractérisation des neurones dopaminergiques

Comme décrit précédemment, un neurone de la VTA est classiquement défini comme dopaminergique s'il remplit les 3 critères définis par Ungless et collaborateurs en 2004, concernant la fréquence d'activité (≥ 10 PA/s), la durée totale du potentiel d'action (≥ 2 ms) et la durée de la 1^{ère} partie positive de ce potentiel d'action ($\geq 1,1$ ms). Afin de valider l'identification électrophysiologique des neurones dopaminergiques dans nos expériences, nous avons d'abord corrélié des enregistrements électrophysiologiques à des injections juxtacellulaires de neurobiotine (Figure 2A).

Le neurone de la pVTA montré en exemple dans la Figure 2 présente les caractéristiques électrophysiologiques attendues d'un neurone dopaminergique. Sa fréquence de décharge est de 3,72 PA/s, la durée de son potentiel d'action est de 4,5 ms et la durée de la 1^{ère} partie positive est de 1,4 ms (Figure 2A2,3). Sa nature dopaminergique est confirmée par la colocalisation de la neurobiotine et de l'immunoréactivité TH (Figure 2A4). De plus, la stimulation électrique du NAc permet d'observer un potentiel d'action antidromique à latence fixe (Figure 2A1,5). Cela montre que le neurone enregistré projette directement au NAc et suggère donc qu'il s'agit d'un neurone dopaminergique du système mésolimbique. En revanche, l'injection juxtacellulaire de neurones présentant des potentiels d'action de type non dopaminergiques montre que ceux-ci n'expriment pas la TH (données non présentées).

Pour la suite des expériences, et en accord avec la pratique courante dans de telles études, seules les caractéristiques électrophysiologiques ont été utilisées pour définir la nature dopaminergique ou non dopaminergique des neurones enregistrés dans la VTA. Les injections juxtacellulaires sont en effet techniquement très délicates à réaliser, rendant cette approche difficilement applicable à l'ensemble des expériences. Selon les critères électrophysiologiques, lors des expériences de stimulation de la tVTA nous avons pu étudier 8 cellules dopaminergiques et 9 cellules non dopaminergiques sur les 20 cellules enregistrées dans la VTA (Figure 2B1,2 ; Table 1).

Trois cellules enregistrées ont ainsi été exclues des analyses.

Deux de ces cellules avaient une fréquence d'activité spontanée inférieure à 20 PA/s (15,04 PA/s pour la cellule 1 et 1,075 PA/s pour la cellule 2) et une durée totale du potentiel d'action supérieure à 2 ms (4,3 ms pour la cellule 1 et 3,2 ms pour la cellule 2) mais la première partie de leurs potentiels d'action était légèrement inférieure à 1,1 ms (1 ms pour les 2 cellules).

Il était donc difficile de trancher sur l'identité neurochimique de ces cellules. Il est à noter que ces 2 cellules ont bien été inhibées par la stimulation de la tVTA, mais que la durée de ces inhibitions était aussi très différente de celles des autres cellules enregistrées : 54 ms pour la cellule 1 et 1 620 ms pour la cellule 2 (résultats non illustrés).

La troisième cellule exclue des analyses était clairement dopaminergique selon les critères électrophysiologiques, mais sa fréquence d'activité spontanée était beaucoup trop faible (0,06 PA/s) pour pouvoir étudier une inhibition éventuelle suite à la stimulation électrique de la tVTA (résultats non illustrés).

B) Contrôles histologiques

Pour chaque animal, la localisation des neurones enregistrés dans la VTA (Figure 2C1) et le bon placement de l'électrode de stimulation dans la tVTA sont vérifiés grâce à une injection iontophorétique de bleu de Pontanime au site d'enregistrement (Figure 2C2) et une électrocoagulation au site de stimulation (Figure 2C3).

C) Influence d'une stimulation électrique de la tVTA

Sur les 8 cellules dopaminergiques de la VTA enregistrées, toutes sont inhibées par la stimulation électrique de la tVTA (Table 1 ; Figure 2D1-5). L'inhibition débute immédiatement après la première stimulation et la durée d'inhibition moyenne est de 286 \pm 54 ms. Dans 25% des cas (2 neurones sur 8), des potentiels d'action antidromiques ont également été observés suite à la stimulation de la tVTA (Table 1), ce qui suggère que la stimulation électrique de la tVTA atteint l'axone de la cellule enregistrée.

Sur les 9 cellules non dopaminergiques de l'a/pVTA enregistrées, 8 (soit 88,8 %) sont inhibées par la stimulation électrique de la tVTA (Table 1 ; Figure 2E1-5). La durée d'inhibition moyenne est de 222 \pm 32 ms. La 9^{ème} cellule est activée par la stimulation électrique de la tVTA. La durée de cette activation est de 154 ms et sa latence d'apparition de 700 ms. Dans 44,4% des cas, des potentiels d'action antidromiques suite à la stimulation de la tVTA sont observés (Table 1).

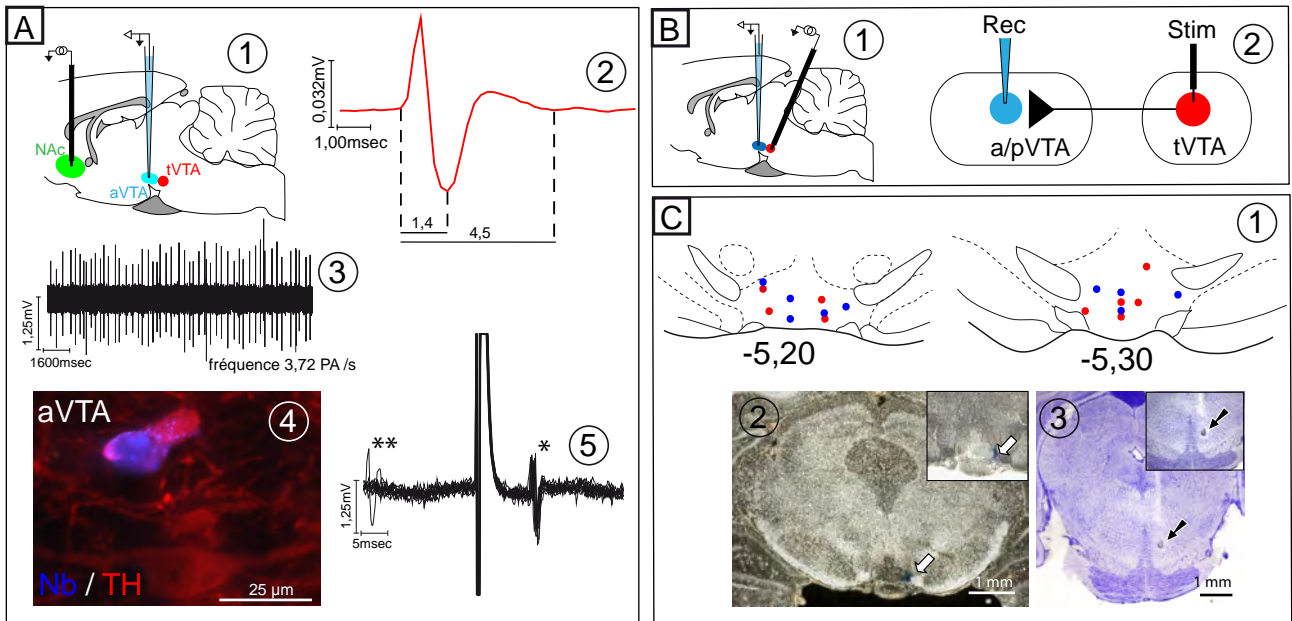


Figure 2 (1ère partie)

Inhibition des neurones dopaminergiques (DA) et non dopaminergiques (non DA) de l'a/pVTA par la stimulation électrique de la tVTA.

(A) Caractéristiques d'un neurone DA de l'a/pVTA. **(1)** Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat indiquant le site d'enregistrement d'un neurone DA dans l'aVTA et le site de stimulation électrique dans le NAc. Exemple d'un potentiel d'action unitaire **(2)** et de l'activité spontanée **(3)** d'un neurone DA de l'aVTA. **(4)** Photographie illustrant dans ce neurone la colocalisation de la neurobotine (en bleu, injection juxtacellulaire) et de l'immunoréactivité TH (en rouge). Cette colocalisation confirme la nature DA du neurone enregistré. **(5)** Superposition de 32 tracés électrophysiologiques obtenus à partir de l'enregistrement de ce neurone lors de stimulations répétées du NAc. L'astérisque montre l'apparition, à latence fixe, d'un potentiel d'action antidromique induit par la stimulation du NAc. Le double astérisque signale un potentiel d'action spontané.

(B) Dispositif expérimental. Représentation sur une coupe sagittale de cerveau de rat **(1)** et sur un schéma **(2)** du dispositif utilisé pour étudier électrophysiologiquement les conséquences d'une stimulation électrique de la tVTA sur l'activité des neurones de l'a/pVTA. Les électrodes de stimulation (Stim) et d'enregistrement (Rec) sont respectivement placées dans la tVTA et l'a/pVTA.

(C) Localisation des neurones enregistrés dans l'a/pVTA. **(1)** Dessins de la partie ventrale de 2 coupes frontales de cerveau de rat à 2 niveaux d'antéropostériorité par rapport au bregma. On observe l'aVTA à -5,20 mm et la pVTA à -5,30 mm. Les points rouges et bleus correspondent respectivement à la localisation des neurones DA et non DA enregistrés. **(2)** Photographie en fond noir illustrant la localisation du dépôt de bleu de pontamine injecté dans la pVTA en fin d'expérimentation. Ce dépôt permet de tracer la trajectoire de l'électrode d'enregistrement et de déterminer la position du neurone enregistré. **(3)** Photographie en fond clair illustrant, après une contre coloration au crésyl violet, le point d'électrocoagulation au site de stimulation dans la tVTA.

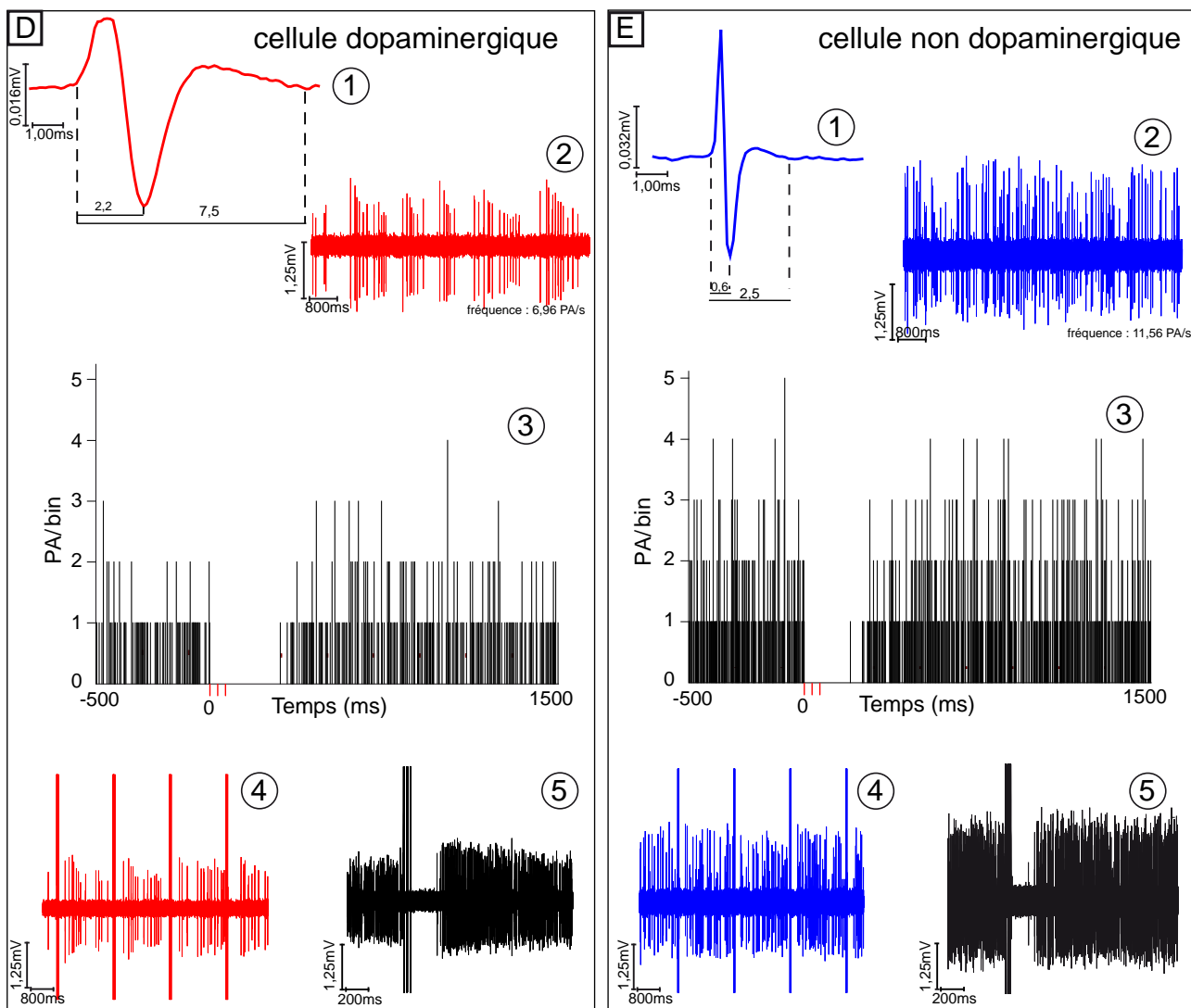


Figure 2 (2ème partie) :

Inhibition des neurones dopaminergiques (DA) et non dopaminergiques (non DA) de l'a/pVTA par la stimulation électrique de la tVTA.

(D) Inhibition d'un neurone DA de l'a/pVTA par la stimulation électrique de la tVTA. Potentiel d'action moyen **(1)** et activité spontanée **(2)** d'un neurone DA de l'a/pVTA. **(3)** Histogramme des temps péri-stimulatoires montrant l'inhibition de ce neurone par la stimulation électrique de la tVTA (3 chocs de 0,5ms à une fréquence de 20Hz, 1 série de stimulations toutes les 10s ; 50 fois). On notera que l'inhibition est observable tout de suite après la stimulation et dure 296 ms. **(4,5)** Tracés illustrant l'inhibition de ce neurone DA par la stimulation électrique de la tVTA. Sur le tracé **(4)** on peut observer l'effet de stimulations successives de la tVTA. **(5)** Superposition de 32 tracés illustrant la stabilité de l'inhibition induite par la stimulation de la tVTA.

(E) Inhibition d'un neurone non DA de l'a/pVTA par la stimulation électrique de la tVTA. Potentiel d'action **(1)** et fréquence de décharge spontanée **(2)** d'un neurone non DA de l'a/pVTA. **(3)** Histogramme des temps péri-stimulatoires montrant l'inhibition de ce neurone non DA par la stimulation électrique de la tVTA (3 chocs de 0,5ms à une fréquence de 20Hz, 1 série de stimulations toutes les 10s ; 50 fois). On notera que l'inhibition est observable tout de suite après la stimulation et dure 197 ms. **(4,5)** Tracés illustrant l'inhibition de ce neurone non DA par la stimulation électrique de la tVTA. Sur le tracé **(4)** on peut observer l'effet de stimulations successives de la tVTA. **(5)** Superposition de 32 tracés illustrant la stabilité de l'inhibition induite par la stimulation de la tVTA.

	cellule DA VTA	cellule non DA VTA
Nombre de cellules	8	9
Fréquence spontanée (PA/s)	5,17 +/- 1,10	12,23 +/- 3,86
Durée totale du PA (ms)	5,44 +/- 0,52	2,61 +/- 0,21
Durée de la phase positive	1,62 +/- 0,18	0,79 +/- 0,04
Potentiel d'action antidromique (% de cellule)	25 (2/8)	44,4 (4/9)
Réponse inhibitrice suite à une stimulation de la tVTA (% de cellule)	100 (8/8)	88,8 (8/9)
Durée de l'inhibition (ms)	276 +/- 54,82	222,41 +/- 32,09
Réponse excitatrice suite à une stimulation de la tVTA (% de cellule)	0	11,2 (1/9)
Durée de l'excitation (ms)	-	700
Latence d'apparition de l'excitation (ms)	-	154

Table1 : Caractéristiques électrophysiologiques des cellules dopaminergiques (DA) et non dopaminergiques (non DA) de la VTA et des réponses induites par la stimulation électrique de la tVTA. Les différentes valeurs de durées et de fréquences spontanées sont une moyenne +/- sem des données obtenues.

IV) Discussion

Dans cette étude nous avons montré que les neurones dopaminergiques et non dopaminergiques de la VTA sont inhibés par une stimulation électrique de la tVTA. Après quelques considérations méthodologiques, nous discuterons les conséquences fonctionnelles de ces inhibitions. Quelques perspectives expérimentales viendront enfin conclure cette discussion.

A) Limite méthodologique : l'identification des neurones dopaminergiques

Il est à noter que les critères d'identification électrophysiologique des neurones dopaminergiques que nous avons utilisés sont stricts. Ils ont été définis par Ungless et collaborateurs en 2004 et comportent trois critères : un de fréquence d'activité spontanée qui doit être inférieure à 10 PA/s, un de durée totale du potentiel d'action qui doit être supérieure à 2 ms, et surtout un critère de durée de la phase positive du potentiel d'action qui doit être supérieure ou égale à 1,1 ms. Ce dernier critère est très restrictif et délicat à utiliser. Autrement dit, cette durée de la phase positive du potentiel d'action est-elle suffisante pour définir un neurone comme non dopaminergique quand les deux autres critères sont positifs ? Ainsi on peut se demander si les 9 neurones de notre étude classés suivant les critères électrophysiologiques comme non dopaminergiques le sont réellement.

B) Contrôle de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la VTA

La tVTA est pour partie enchâssée dans un important faisceau de fibres, la décussation du pédoncule cérébelleux supérieur. Elle est donc pauvre en neurones et ceux-ci sont principalement GABAergiques. Les résultats sur l'inhibition des neurones dopaminergiques par la stimulation de la tVTA sont à mettre en regard de nos résultats anatomiques précédents. En effet, nous avons montré que les neurones GABAergiques de la tVTA projettent massivement à l'a/pVTA et que les axones de ces neurones GABAergiques font apposition sur les corps cellulaires et les dendrites proximaux des neurones dopaminergiques de l'a/pVTA. Le groupe de Susan Sesack, dans une étude en cours récemment présentée au congrès de la société américaine des neurosciences (Balcita-Pedicino et al., 2009), a confirmé grâce à la microscopie électronique cette projection de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA. On peut donc penser que l'inhibition des neurones de l'a/pVTA suite à la stimulation électrique de la tVTA est principalement due à l'activation des neurones GABAergiques de la tVTA.

Ces données nous permettent de faire le parallèle entre les neurones GABAergiques de la tVTA et les neurones GABAergiques internes à l'a/pVTA, connus pour freiner localement les neurones dopaminergiques de la structure. On peut supposer que l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA suite à la stimulation de la tVTA devrait se traduire par une diminution de la libération de dopamine à la fois dans le NAc et le PFC, régions terminales principales du système dopaminergique mésolimbique, mais aussi dans la VTA elle-même via la libération somatodendritique. La tVTA serait alors un centre de contrôle des neurones dopaminergiques mésolimbiques.

C) Contrôle de la tVTA sur les neurones non dopaminergiques de la VTA

Un autre point intéressant et moins prévisible de cette étude réside dans le fait que les neurones non dopaminergiques de l'a/pVTA sont inhibés de manière similaire aux neurones dopaminergiques par la stimulation électrique de la tVTA. Les conséquences finales de ce phénomène sont plus complexes à analyser. Dans l'a/pVTA la population neuronale fonctionnellement la plus importante, après les neurones dopaminergiques, est celle des interneurones GABAergiques connus pour exercer un frein tonique sur l'activité dopaminergique. Une inhibition de ces neurones par les neurones GABAergiques de la tVTA devrait donc mener à une désinhibition des neurones dopaminergiques mésolimbiques et ainsi à une augmentation de la libération somatodendritique et axonale de dopamine. Toutefois cette hypothèse ne semble pas être appuyée par nos résultats car nous n'avons jamais observé d'augmentation d'activité électrique de neurones dopaminergiques après stimulation de la tVTA.

On peut alors se poser la question de l'identité des neurones non dopaminergiques enregistrés et inhibés par la stimulation de la tVTA. Il se pourrait que ce soient des neurones glutamatergiques, présents en faible proportion dans l'a/pVTA, ou des neurones GABAergiques à projection longue (Figure 3A). Une autre hypothèse prend en considération la notion de réseaux neuronaux locaux. On peut ainsi supposer que les interneurones GABAergiques de la tVTA projettent à la fois sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques et les interneurones GABAergiques intra-a/pVTA (Figure 3B). Dans ce cas, l'inhibition par la tVTA des neurones non dopaminergiques de l'a/pVTA serait le reflet d'une projection GABAergique monosynaptique sur les interneurones GABAergiques intra-a/pVTA. L'activité des neurones dopaminergiques serait quant à elle la résultante de l'intégration des deux types d'afférences GABAergiques, intra-a/pVTA et tVTA. L'injection juxtacellulaire de neurobiotine pour tous les

neurones enregistrés pourrait permettre de répondre à cette question. Cependant, non seulement cette technique est très difficile à maîtriser, mais en plus elle ne permet d'enregistrer qu'un seul neurone par animal ce qui augmente considérablement la durée de l'approche électrophysiologique et le nombre d'animaux utilisés.

D) Perspectives

Dans un premier temps, il serait nécessaire de vérifier si c'est bien une libération de GABA qui est induite par la stimulation électrique de la tVTA, puis de caractériser le type de récepteur du GABA impliqué. Pour cela, il serait nécessaire de réaliser des injections iontophorétiques d'antagonistes spécifiques des récepteurs GABA_A (bicuculline) ou GABA_B (Phaclofen) à proximité immédiate des neurones enregistrés de l'a/pVTA pendant la modulation de la tVTA.

Pour poursuivre la comparaison entre les neurones GABAergiques de l'a/pVTA et ceux de la tVTA, il serait judicieux de préciser le type d'inhibition que la tVTA exerce sur les neurones dopaminergiques. Est-ce que, comme pour les interneurons de l'a/pVTA, les neurones GABAergiques de la tVTA exercent un frein tonique sur les neurones dopaminergiques ou cette inhibition est-elle phasique ? Pour y répondre par électrophysiologie *in vivo*, il est possible d'envisager l'étude de l'activité des neurones de l'a/pVTA après inhibition pharmacologique de la tVTA par le muscimol, agoniste des récepteurs GABA.

Finalement, ces expériences peuvent être le point de départ d'études plus fonctionnelles qui nous permettraient de démontrer physiologiquement que la queue GABAergique de la VTA est un nouveau centre de contrôle du système dopaminergique mésolimbique et plus généralement des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques. A court terme, comme dit précédemment, l'observation des conséquences d'une inhibition pharmacologique de la tVTA sur l'enregistrement unitaire de neurones de l'a/pVTA va être menée. A plus long terme, les conséquences plus intégrées de la modulation des neurones de l'a/pVTA par la tVTA pourront être étudiées en mesurant les taux extracellulaires de dopamine par microdialyse dans la cible principale du système dopaminergique mésolimbique, c'est-à-dire dans le NAc mais également dans l'a/pVTA.

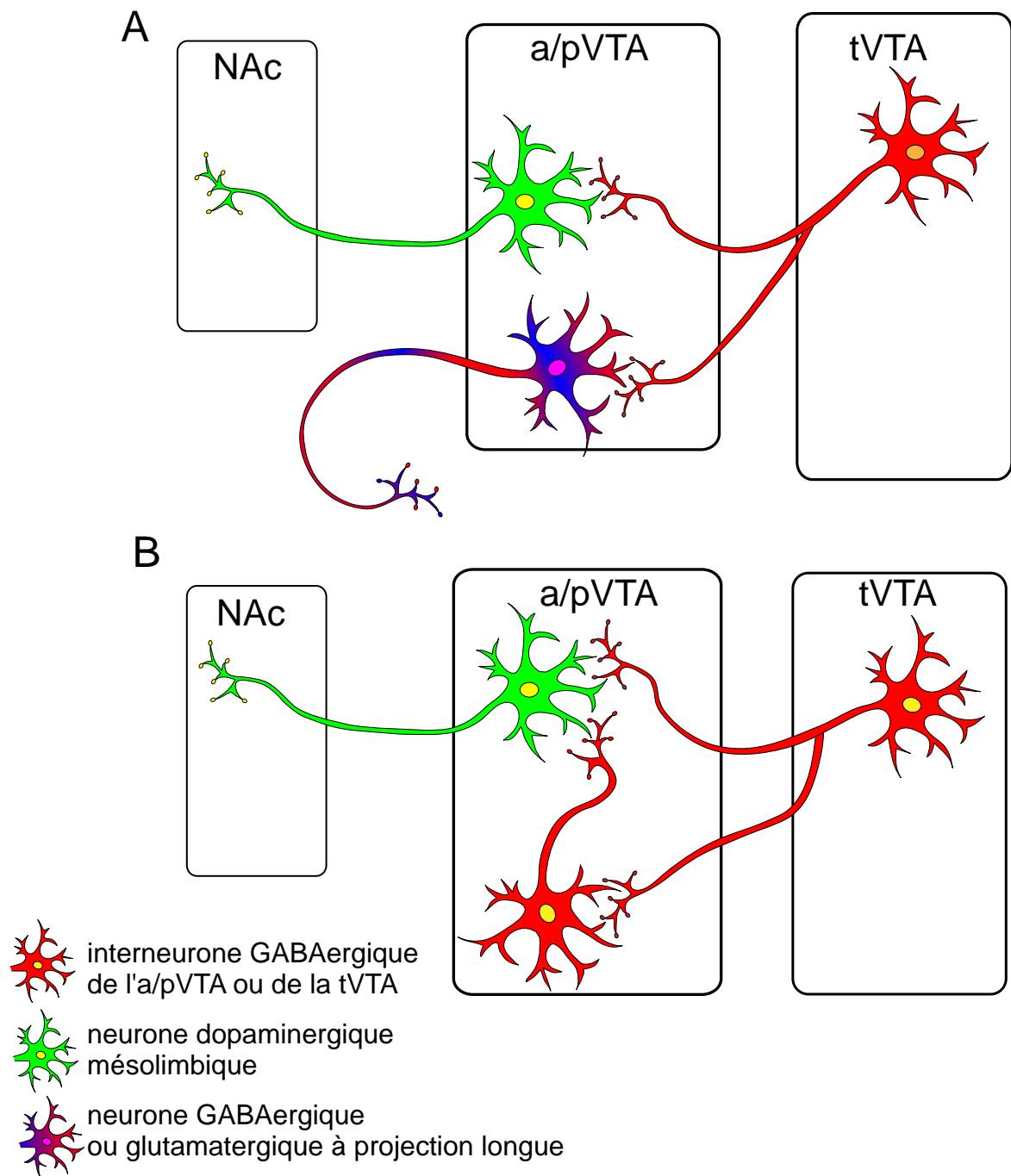


Figure 3 : Illustration des connexions potentielles entre les neurones GABAergiques de la tVTA et les neurones de l'a/pVTA.

(A) Dans l'a/pVTA, les projections issues des interneurons GABAergiques de la tVTA pourraient se faire sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques mais également sur les neurones glutamatergiques ou GABAergiques à projections longues.

(B) Dans l'a/pVTA, les projections issues des interneurons GABAergiques de la tVTA pourraient se faire à la fois sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques et sur les interneurons GABAergiques intra a/pVTA contactant les neurones dopaminergiques mésolimbiques.

Chapitre 4

PHARMACOLOGICAL RECRUITMENT OF THE GABAERGIC TAIL OF THE VENTRAL TEGMENTAL AREA BY ACUTE DRUG EXPOSURE.

Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

Recrutement pharmacologique de la queue GABAergique de l'aire tegmentale ventrale par une exposition aiguë aux drogues

La tVTA (queue de l'aire tegmentale ventrale), également appelée RMTg (noyau tegmental rostromédial), est une sous-région de la VTA (aire tegmentale ventrale) récemment définie (Perroti et al., 2005). Cette région, riche en neurones GABAergiques, constitue la partie la plus postérieure de la VTA et est connue pour accumuler le facteur de transcription FosB/ Δ FosB en réponse à un traitement chronique ou aiguë à la cocaïne (Perroti et al., 2005 ; Kaufling et al., 2009, 2010).

Afin d'élargir nos connaissances sur les stimulus permettant l'expression de FosB/ Δ FosB dans la tVTA, nous avons administré de façon aiguë 20 drogues différentes à des rats mâles adultes.

Une induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA a été observée après injection de psychostimulants (cocaïne, D-amphétamine, 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA), méthylphénidate et caféine) et de GBR12909, un inhibiteur du transporteur de la dopamine. Par contre elle n'est pas présente après injection de drogues sédatives (morphine, diazépam, éthanol et acide γ -hydroxybutyrique (GHB)), de drogues dites « dissociatives » (kétamine, phencyclidine (PCP) et Δ 9-tétrahydrocannabinol (THC)) mais également d'anticonvulsivants (gabapentine et acide valproïque), d'antidépresseurs (nortriptyline, réboxetine, venlafaxine et fluoxétine) ou d'un « releaser » de sérotonine (dexfenfluramine).

Ce criblage pharmacologique nous permet de dire que, contrairement au noyau accumbens où toutes les drogues addictives induisent potentiellement FosB/ Δ FosB (Perrotti et al., 2008), l'induction de ce facteur de transcription dans les neurones GABAergiques de la tVTA est spécifique aux psychostimulants et que ce phénomène met en jeu la dopamine.

RESEARCH PAPER

Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure

Jennifer Kaufling^{1,2}, Elisabeth Waltisperger¹, Romain Bourdy^{1,2}, Antoine Valera², Pierre Veinante^{1,2}, Marie-José Freund-Mercier^{1,2} and Michel Barrot¹

¹*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France, and*

²*Faculté des Sciences de la Vie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

Running title: FosB induction in the tVTA

Correspondence: Dr Michel Barrot, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France. Tel: + 33 368 851 450; Fax: + 33 388 613 347; E-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr

Keywords: psychostimulant; DeltaFosB; VTA; dopamine; GABA; tVTA; RMTg

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; DAT, dopamine transporter; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD, glutamic acid decarboxylase; GHB, γ -hydroxybutyric acid; i.p., intraperitoneal; MDMA, (\pm)-3,4-methylenedioxymethamphetamine; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NET, noradrenaline transporter; PCP, phencyclidine; s.c., subcutaneous; RMTg, rostromedial tegmental nucleus; SERT, 5-hydroxytryptamine transporter; TH, tyrosine hydroxylase; THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol; tVTA, tail of the VTA; VTA, ventral tegmental area

Summary

Background and purpose: The tail of the ventral tegmental area (tVTA), also called rostromedial tegmental nucleus (RMTg), is a newly defined brain structure. It was identified by the induction of DeltaFosB following chronic cocaine exposure. Looking for stimuli recruiting a brain region is a possible approach to study its function. In this work, we screened 20 drugs for their ability to induce FosB/DeltaFosB in the tVTA.

Experimental approach: In adult rats, we used immunohistochemistry following systemic drug administration to evaluate the induction of FosB/DeltaFosB in the tVTA. Double-staining was used to identify whether it concerned dopamine or γ -aminobutyric acid (GABA) neurons.

Key results: The acute injection of the psychostimulant drugs cocaine, D-amphetamine, (\pm)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylphenidate or caffeine, induced FosB/DeltaFosB in tVTA GABAergic cells. No induction was observed following exposure to ethanol, diazepam, γ -hydroxybutyric acid (GHB), morphine, ketamine, phencyclidine (PCP), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), sodium valproic acid or gabapentin. To evaluate the role of monoamine transporters in psychostimulant-induced FosB/DeltaFosB, we tested the antidepressant drugs reboxetine, nortriptyline, fluoxetine and venlafaxine (which target the noradrenaline and/or the 5-hydroxytryptamine transporters), the 5-hydroxytryptamine releasing agent dexfenfluramine, and the dopamine transporter (DAT) inhibitor GBR12909. Only GBR12909 was able to express FosB/DeltaFosB in the tVTA, showing that this induction is dopamine-mediated.

Conclusions and Implications: New brain structures may help increasing our knowledge on brain function, pathology and targets for treatments. The tVTA, a potential control center for dopaminergic activity, is a common target for drugs sharing psychostimulant properties rather than drugs sharing risk of abuse.

Introduction

Newly discovered brain structures may help improving our knowledge on brain functions and on brain disorders, and provide new neuroanatomical targets for treatments. The tail of the ventral tegmental area (tVTA) is a recently defined structure (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009, 2010) which was discovered simultaneously by different research groups. It is a region of interest, as it may be a newly described control center for the dopaminergic system (Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010). In the literature, it is mainly referred either as the tVTA (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009, 2010) or as the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) (Jhou *et al.*, 2009a, 2009b). However, parts of this structure can be found under various other names: “retro-VTA” (Scammell *et al.*, 2000), “Area 2” in the description of GABAergic cell clusters within the VTA (Olson and Nestler, 2007), “ventral tegmental tail” (VTT) (Ikemoto, 2007), “interstitial nucleus of the decussation of the superior cerebellar peduncle” (ID) for its most caudal extent (Paxinos and Watson, 2007), “rostromedial pontine tegmentum” (Geisler *et al.*, 2008), or “caudal pole of the VTA” (VTAc) (Ferreira *et al.*, 2008).

The boundaries and the connections of the tVTA were recently described (Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2009, 2010). The tVTA was initially revealed by the accumulation of the transcription factor Δ FosB, a stable truncated variant of FosB (Nestler *et al.*, 2001; McClung *et al.*, 2004), after chronic exposure to cocaine or amphetamine (Perrotti *et al.*, 2005). In its most rostral extent, the tVTA is restricted to a bilateral subregion, posterior to the VTA paranigral nucleus and dorsolateral to the interpeduncular nucleus (Kaufling *et al.*, 2009). As it progresses caudally, the tVTA shifts dorsally and slightly laterally and becomes embedded within the decussation of the superior cerebellar peduncle. Its inputs are mainly similar to the ones of the VTA (Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2009), but its outputs are

more restricted. A remarkable feature of tVTA outputs is the presence of a dense projection to the mesencephalic dopamine cells (Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2010). Since this tVTA output is mainly GABAergic (Kaufling *et al.*, 2010), the tVTA might be an inhibitory control center for dopaminergic activity (Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010). Considering the wide array of functions and pathologies the dopaminergic system is involved into (Le Moal and Simon, 1991; Iversen and Iversen, 2007), the tVTA appears as a structure of interest for fundamental and preclinical research.

Looking for stimuli recruiting a brain region is a possible approach to study its function. In the present work, we screened 20 different drugs for their ability to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. We show that only psychostimulant drugs were able to locally recruit these Fos proteins. This action affects tVTA GABAergic cells and is likely mediated through the recruitment of the dopaminergic system as it is also observed following treatment with the specific dopamine reuptake inhibitor GBR12909.

Methods

The nomenclature for drugs and for their molecular targets conforms to the British Journal of Pharmacology Guide to Receptors and Channels (Alexander *et al.*, 2008).

Animals

Animal care and procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC. The animal facilities are legally registered for animal housing and experimentation (veterinary Animal House Agreements B67-482-1 and C67-482-1). The scientists in charge of the experiments possess the French certificate authorizing

experimentation on living animals, delivered by the governmental veterinary office. All experiments used male Sprague Dawley rats ($n = 63$ rats for all the studies, 280-340 g, Janvier, France), housed under standard conditions (22°C, lights on 07:00-19:00) with food and water available *ad libitum*.

Drug injections

Drugs were injected intraperitoneally (i.p.) or subcutaneously (s.c.) at the following doses: cocaine hydrochloride, 20 mg.kg⁻¹ i.p. (Cooper, Melun, France); D-amphetamine sulfate, 1 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France); (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine hydrochloride (MDMA), 5 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); methylphenidate hydrochloride, 10 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); caffeine, 10 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); 1-(2-[bis-(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride (GBR12909), 15 mg.kg⁻¹ i.p. (Biotrend, Zurich, Switzerland); 4 mL of 15 % ethanol, i.p.; diazepam, 1.5 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); γ -hydroxybutyric acid sodium salt (GHB), 1 g.kg⁻¹ i.p. in a 2 mL.kg⁻¹ volume (Sigma-Aldrich); morphine sulfate, 10 mg.kg⁻¹ s.c. (Francopia, Paris, France); ketamine hydrochloride, 50 mg.kg⁻¹ i.p. (Centravet, Taden, France); phencyclidine hydrochloride (PCP), 3 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); Δ^9 -tetrahydrocannabinol solution (THC) in 30 % (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, 3 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); sodium valproic acid, 20 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France); gabapentin, 50 mg.kg⁻¹ i.p. (Teva®); reboxetine mesylate, 0.8 mg.kg⁻¹ i.p. (Edronax®); nortriptyline hydrochloride, 15 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich); fluoxetine hydrochloride, 10 mg.kg⁻¹ i.p. (Biotrend); venlafaxine hydrochloride, 5 mg.kg⁻¹ i.p. (Effexor®); S-(+)-fenfluramine hydrochloride (dexfenfluramine), 4 mg.kg⁻¹ i.p. (Sigma-Aldrich). Unless otherwise indication, the drugs were prepared in 0.9 % NaCl and injected in a volume of 1 mL.kg⁻¹. Control animals received an injection of 0.9 % NaCl. As the tVTA is a

brain region with no or very few FosB/ Δ FosB staining in basal conditions (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009, 2010), an induction of these transcription factors is locally easy to detect. It allowed us to use 3 animals only (triplicate) for each of the tested drugs.

Histochemistry

Three hours following the drug injection, the rats were perfused under deep chloral hydrate anesthesia (800 mg.kg⁻¹; Sigma) with 100 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) followed by 500 mL of a paraformaldehyde solution (4 % in phosphate buffer). Brains were removed and postfixed overnight in the same fixative. Forty μ m mesencephalic sections were subsequently cut following the frontal plane on a vibratome (VT 1000S, Leica). Sections were serially collected in phosphate buffer with 0.9 % NaCl (PBS).

Sections for immunohistochemistry were washed in PBS (3 x 10 min), incubated 15 min in a 1 % H₂O₂ / 50 % ethanol solution if used for a peroxidase reaction, washed in PBS (3 x 10 min), and incubated in PBS containing Triton X-100 and 5 % donkey serum for 45 min. Sections were then incubated overnight at room temperature in PBS with Triton X-100, 1 % donkey serum, and the primary antibody(ies). Triton X-100 was used at 0.5 %, except for glutamic acid decarboxylase (GAD) immunohistochemistry for which it was lowered to 0.2 % to reduce processes staining and facilitate cell body identification.

The rabbit anti-FosB polyclonal antibody (Santa-Cruz, catalog number SC-48; 1:2000 for peroxidase reaction, 1:200 for immunofluorescence) was raised against an internal region of the transcription factor FosB (Santa-Cruz data sheet). It recognizes both FosB and its splice variant Δ FosB, but no other member of the Fos proteins (Perrotti *et al.*, 2004, 2005; Luis-Delgado *et al.*, 2006). The sheep anti-tyrosine hydroxylase (TH) polyclonal antibody (Chemicon, catalog number AB1542; 1:1000) was raised against a sodium dodecyl sulfate-denatured TH from rat pheochromocytoma (Chemicon data sheet). The mouse anti-GAD

67 kDA monoclonal antibody (Chemicon, catalog number MAB5406; 1:10000) was raised against a recombinant fusion protein containing N-terminal regions of GAD 67 kDA not shared by GAD 65 kDA (Chemicon data sheet).

Sections for immunohistofluorescence were washed in PBS (3 x 10 min), incubated with a donkey CY2 or FITC fluorophore-labeled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; 1:400) for 1 h 30, and washed in PBS (3 x 10 min) before mounting in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections for peroxidase reaction were washed in PBS (3 x 10 min), incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences; 1:200 in PBS containing Triton X-100, 1 % donkey serum) for 1 h 30, washed in PBS (3 x 10 min), and incubated with PBS containing the avidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) (ABC Elite, 0.2 % A and 0.2 % B; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h 30. After washing in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.5; 3 × 10 min), bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025 % 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.0006 % H₂O₂ (Sigma, St. Louis, MO) in Tris-HCl buffer. Sections were incubated for approximately 10 min and washed again. Sections were serially mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, cleared in Roti-Histol (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany), and coverslipped with Eukitt.

Analysis and illustrations

Coded slides were used to analyze the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei throughout the tVTA of animals. Blind counting was done using a Nikon Eclipse E600 microscope and a handheld counter. We counted the number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei bilaterally between -5.80 mm to -7.30 mm from the bregma, analyzing a 40 μ m section every 160 μ m. Section drawings presenting the FosB/ Δ FosB signal were done using a microscope equipped with a

camera lucida (Nikon Eclipse E600). Data for FosB/ Δ FosB analysis are expressed as mean \pm SEM of positive nuclei per hemi-tVTA. Statistical analysis was performed with STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), using Student *t*-test to compare the drug action to the control. The significance level was set at $P < 0.05$.

The analysis of double-labeling fluorescence was done on 3 to 6 frontal sections per animal using an epifluorescence microscope (Leica DMRD). Pictures were taken by using a microscope (Leica) with a digital camera (Cool-snap, Princeton, NJ, USA). Adobe Photoshop 7.0 was used to adjust contrast, brightness, and sharpness. The color channels were individually adjusted for the merged pictures. Abbreviations and structure limits are based on the frontal diagrams from the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Results

Expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA by psychostimulant drugs

We previously reported that chronic exposure to cocaine induced the transcription factor Δ FosB in the tVTA (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2010) and we recently observed a similar induction with acute cocaine (Kaufling *et al.*, 2009, 2010). We thus used acute cocaine as a positive control for the present study. Few FosB/ Δ FosB-positive nuclei were observed in the tVTA following saline administration (Figure 1A), which is in agreement with previous reports (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2009). On the contrary, the acute injection of the psychostimulants cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate or caffeine resulted in a strong expression of the transcription factor FosB/ Δ FosB in the tVTA (Figure 1B-F). This induction was observed in each of the animals receiving the psychostimulant injection.

This bilateral induction started in the most posterior part of the VTA and the cluster of nuclear staining extended more caudally, shifting dorsally and slightly laterally to become embedded within the decussation of the superior cerebellar peduncle (Figures 2 and 3). The overall quantification of this tVTA staining (Figure 2) and the detail of the counting along the anteroposterior axis (Figure 3) revealed that all the drugs induced FosB/ Δ FosB with a similar anteroposterior profile. The induction obtained with caffeine was significant but much lower than what was observed with the other psychostimulants (Figures 2E₂ and 3).

The double-labeling by immunofluorescence (Figure 4) revealed that FosB/ Δ FosB induced by the acute injection of these psychostimulants was in each case mainly present in the GABAergic neurons (98 % to 100 % depending on the drug, Figure 4G₂), without detectable expression in the dopaminergic neurons (Figure 4G₁).

Lack of expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA after exposure to other drugs

Drugs stimulating the GABAergic transmission were unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. It was the case with ethanol (Figure 5A); with the anxiolytic drug diazepam (Figure 5B), an agonist with allosteric activity at the benzodiazepine site on GABA_A receptors; and with GHB (Figure 5C), a GABA metabolite acting through both its own receptors and GABA receptors, predominantly GABA_B (Carter *et al.*, 2009). The opiate analgesic and drug of abuse morphine (Figure 5D), an agonist of opioid receptors, was also unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The dissociative drugs primarily acting through *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonism, such as the anesthetic ketamine (Figure 5E) or such as PCP (Figure 5F) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The cannabinoid agonist THC (Figure 5G) had also no action on FosB/ Δ FosB expression in the tVTA. All these drugs are however liable to induce drug abuse.

Last, the anticonvulsant drug valproic acid (Figure 5H) which inhibits histone deacetylases and also inhibits GABA transmission through an indirect mechanism, and the anticonvulsant drug gabapentin (Figure 5I) which bind the $\alpha_2\text{-}\delta$ protein subunits of voltage-gated calcium channels ($\text{Ca}_v\alpha_2\text{-}\delta$), were unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA.

Expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA by inhibition of the dopamine transporter (DAT)

The most important induction of FosB/ Δ FosB in the tVTA was observed with psychostimulant drugs acting on monoamine transporters: cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate. To evaluate the role of the different monoamines in this induction, we tested inhibitors of the various transporters: DAT, noradrenaline transporter (NET) and/or 5-hydroxytryptamine transporter (SERT). The antidepressant drug reboxetine (Figure 6A) which is a specific NET inhibitor, the tricyclic antidepressant drug nortriptyline (Figure 6B), a NET/SERT inhibitor with a predominant NET action, the antidepressant drug fluoxetine (Figure 6C), a SERT inhibitor, and the antidepressant drug venlafaxine (Figure 6D), a non-tricyclic NET/SERT inhibitor, were all unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The anorexigenic drug dexfenfluramine (Figure 6E) which is a 5-hydroxytryptamine releasing agent was also unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. On the contrary, the DAT inhibitor GBR12909 induced a strong expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA (Figures 6F). This induction of FosB/ Δ FosB following GBR12909 exposure displayed the same anteroposterior profile as with psychostimulant drugs (Figure 3), and was also mainly present in GABAergic cells (98 %, Figure 4F,G).

Discussion and conclusions

In this study, we tested pharmacological compounds for their ability to recruit a recently discovered brain region, the tVTA. For this, we used the expression of FosB/ Δ FosB as an index of cell activation. We show that the acute injection of the psychostimulant drugs cocaine, D-amphetamine, MDMA, methylphenidate or caffeine, induced FosB/ Δ FosB in tVTA cells that were identified as GABAergic by double immunostaining. No induction was observed following exposure to ethanol, diazepam, GHB, morphine, ketamine, PCP, THC, sodium valproic acid or gabapentin. By testing various drugs targeting the aminergic systems (reboxetine, nortriptyline, fluoxetine, venlafaxine, dexfenfluramine, GBR12909), we found that the DAT inhibitor GBR12909 was the only one able to induce FosB/ Δ FosB expression in the tVTA, showing the critical role of the dopaminergic system in pharmacological recruitment of tVTA. Our results suggest that the tVTA is a common target for drugs sharing psychostimulant properties.

The VTA is key structure for adaptive and goal-directed behaviors, motivation, reward and mood and is thus implicated in various psychopathological disorders (Le Moal and Simon, 1991; Nestler and Carlezon, 2006; Grace *et al.*, 2007; Iversen and Iversen, 2007; Schultz, 2007). Its functional heterogeneity along the anteroposterior axis was first observed 30 years ago (Arnt and Scheel-Krüger, 1979), but remained unstudied until the last 10 years. Behavioral studies showed that cocaine (Rodd *et al.*, 2005a), nicotine (Ikemoto *et al.*, 2006), cannabinoids (Zangen *et al.*, 2006), opioid peptides such as the endogenous ligand of mu-opioid receptors endomorphin-1 (Zangen *et al.*, 2002), but also ethanol (Rodd-Henricks *et al.*, 2000; Rodd *et al.*, 2005b) or its metabolite acetaldehyde (Rodd-Henricks *et al.*, 2002), are self-administered if delivered into the posterior VTA; but they are not or poorly self-administered if delivered into the anterior VTA. The functional distinction between anterior

and posterior VTA is also supported by studies using local viral-mediated gene transfer to manipulate the AMPA receptor subunit GluR1 (Carlezon *et al.*, 2000), the phospholipase C γ (Bolanos *et al.*, 2003) or the transcription factor CREB (Olson *et al.*, 2005). This last study identified the functional transition between anterior and posterior VTA around -5.5 mm from the bregma in the rat. However, the anterior versus posterior subdivisions of the VTA only cover the rostral and central tiers of this structure. There are fewer information available on the caudal-most tier, corresponding to the tVTA which is mainly GABAergic and can be revealed by Δ FosB induction following chronic cocaine exposure (Perrotti *et al.*, 2005). Our results show that various psychostimulant drugs are recruiting tVTA after acute administration, as indicated by the induction of the transcription factor FosB/ Δ FosB.

FosB and its stable truncated splice variant Δ FosB are expressed in different regions of the brain in response to various pharmacological or non-pharmacological stimuli: drugs of abuse (Hope *et al.*, 1994a; Pich *et al.*, 1997; Perrotti *et al.*, 2008), NMDA antagonists (de Olmos *et al.*, 2009), antipsychotic drugs (Hiroi and Graybiel, 1996), antidepressant drugs (Hope *et al.*, 1994a), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Berton *et al.*, 2009), but also seizures (Hope *et al.*, 1994b), stress (Perrotti *et al.*, 2004; Berton *et al.*, 2007), ischemia (McGahan *et al.*, 1998), inflammatory pain (Luis-Delgado *et al.*, 2006), compulsive running (Werme *et al.*, 2002) or natural rewards (Wallace *et al.*, 2008). Concerning drugs of abuse, this induction was observed with cocaine, amphetamine, methamphetamine, PCP, morphine, nicotine, ethanol or THC (Pich *et al.*, 1997; McDaid *et al.*, 2006; Perrotti *et al.*, 2008). Some brain regions, such as the striatal complex, appear as common targets for molecular plasticity induced by all these drugs. However, this is not the case for the tVTA. Our survey of various pharmacological stimuli show that, despite their abuse potential, ethanol, diazepam, GHB, morphine, ketamine, PCP or THC do not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The induction of FosB/ Δ FosB in the tVTA may thus be related to the stimulating/arousing properties of

psychostimulant drugs rather than to their risk for abuse. To support this hypothesis, it has been previously shown that modafinil (Provigil[®]), a non-addictive psychostimulant used against narcolepsy, induces a strong Fos expression specifically in the caudal-most tier of the VTA corresponding to the tVTA (Scammell *et al.*, 2000).

Cocaine, D-amphetamine, MDMA and methylphenidate are targeting monoamine transporters. However, the NET inhibitor reboxetine, the NET/SERT inhibitors nortriptyline and venlafaxine, the SERT inhibitor fluoxetine and the 5-hydroxytryptamine releasing agent dexfenfluramine are unable to induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. On the contrary, FosB/ Δ FosB can be induced in the tVTA by the DAT inhibitor GBR12909. A strong recruitment of dopamine transmission thus appears sufficient to induce the local expression of this transcription factor. The implicated dopamine may originate from the sparse dopaminergic fibers within tVTA itself, these fibers arise from dopaminergic cell bodies of the VTA and of the substantia nigra pars compacta which are tVTA afferents (Kaufling *et al.*, 2009). But the dopamine may also be of somatodendritic origin from the VTA itself (Kalivas and Duffy, 1988) and diffusing by volume transmission to the nearby tVTA.

An increase in somatodendritic and axonal dopamine is also present with morphine exposure (Kalivas and Duffy, 1988), while no FosB/ Δ FosB can be observed in the tVTA. Two explanations can be proposed. First, the somatodendritic release of dopamine induced by morphine has a lower capacity for diffusion than with previously cited psychostimulants. Indeed, DAT are still effective in animals under morphine, preventing an important diffusion of the dopamine. Second, it has been shown that tVTA neurons express the μ -opioid receptors (Jhou *et al.*, 2009a). By inhibiting the cAMP/PKA pathway, a direct stimulation of these opioid receptors by morphine may prevent FosB/ Δ FosB induction in tVTA neurons.

The FosB/ Δ FosB induction in the tVTA after caffeine is mild, but significant. Caffeine is not an inhibitor of monoamine transporter. It is a nonselective adenosine receptor

antagonist and a competitive nonselective phosphodiesterase inhibitor (Nehlig *et al.*, 1992). Due to the low affinity for phosphodiesterases, the *in vivo* action of caffeine and more particularly its psychostimulant action is thought to be mediated through adenosine receptor inhibition (Ferré, 2008). Studies on the striatal complex have revealed an implication of both pre- and post-synaptic mechanisms which depend on A₁ and A_{2A} receptors and their interactions with dopaminergic receptors (Ferré, 2008). Future work will however be needed to evaluate whether similar mechanisms are implicated in the recruitment of tVTA cells by caffeine.

In conclusion, among the 20 drugs tested, only psychostimulant drugs induced the expression of FosB/ Δ FosB in the tVTA. New brain structures may help increasing our knowledge on brain functions, pathology and pharmacological targets. The tVTA, a potential control center for dopaminergic activity, appears as a common target for drugs sharing psychostimulant properties rather than drugs sharing risk of abuse. Future work will be needed to understand the functional implication of tVTA in the stimulant and/or arousing properties of these drugs, and to determine whether this newly defined brain area is a critical neuroanatomical substrate for such properties.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg, and the Fondation pour la Recherche Médicale (JK, MB). We thank Stéphane Doridot for animal care.

Statement of conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edn. *Br J Pharmacol* **158** (Suppl. 1): S1-S254.
- Arnt J, Scheel-Krüger J (1979). GABA in the ventral tegmental area: differential regional effects on locomotion, aggression and food intake after microinjection of GABA agonists and antagonists. *Life Sci* **25**: 1351-1360.
- Berton O, Covington HE 3rd, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P *et al.* (2007). Induction of DeltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* **55**: 289-300.
- Berton O, Guigoni C, Li Q, Bioulac BH, Aubert I, Gross CE *et al.* (2010). Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry* **66**: 554-561.
- Bolanos CA, Perrotti LI, Edwards S, Eisch AJ, Barrot M, Olson VG *et al.* (2003). Phospholipase C γ in distinct regions of the ventral tegmental area differentially modulates mood-related behaviors. *J Neurosci* **23**: 7569-7576.
- Carlezon WA Jr, Haile CN, Coppersmith R, Hayashi Y, Malinow R, Neve RL *et al.* (2000). Distinct sites of opiate reward and aversion within the midbrain identified using a herpes simplex virus vector expressing GluR1. *J Neurosci* **20**: RC62.
- Carter LP, Loel W, France CP (2009). Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms. *Pharmacol Ther* **121**: 100-114.
- de Olmos, Bender, C, de Olmos JS, Lorenzo A (2009). Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine. *Neuroscience* **164**: 1347-1359.

- Ferré S (2008). An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* **105**: 1067-1079.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* **153**: 196-213.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M *et al.* (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* **33**: 2688-2700.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007). Regulation of firing of dopamineergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* **30**: 220-227.
- Hiroi N, Graybiel AM (1996). Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol* **374**: 70-83.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y *et al.* (1994a). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* **13**: 1235-1244.
- Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ (1994b). Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a longlasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* **14**: 4318-4328.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006). Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* **26**: 723-730.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* **56**: 27-78.
- Iversen SD, Iversen LL (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* **30**: 188-193.

- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009a). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* **513**: 566-596.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009b). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* **61**: 786-800.
- Kalivas PW, Duffy P (1988). Effects of daily cocaine and morphine treatment on somatodendritic and terminal field dopamine release. *J Neurochem* **50**: 1498-1504.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* **513**: 597-621.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010). Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* **67**: 88-92.
- Le Moal M, Simon H (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* **71**: 155-234.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Ulery PG, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006). The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem* **98**: 1423-1431.
- McDaid J, Graham MP, Napier TC (2006). Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and Δ -FosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. *Mol Pharmacol* **70**: 2064-2074
- McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004). DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Mol Brain Res* **132**: 146-154.

- McGahan L, Hakim AM, Nakabeppu Y, Robertson GS (1998). Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Mol Brain Res* **56**: 146-161.
- Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* **17**: 139-170.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11042-11046.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* **59**: 1151-1159.
- Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ *et al.* (2005). Regulation of drug reward by CREB: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* **25**: 5553-5562.
- Olson VG, Nestler EJ (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* **61**: 87-95.
- Paxinos G, Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. Academic Press: San Diego, CA.
- Paxinos G, Watson C (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. Academic Press: San Diego, CA, fig 89-92.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS *et al.* (2004). Induction of DeltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* **24**: 10594-10602.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG *et al.* (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* **21**: 2817-2824.

- Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S *et al.* (2008). Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* **62**: 358-69.
- Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997). Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* **275**: 83-86.
- Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ (2005a). Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **31**: 134-145.
- Rodd ZA, Bell RL, Zhang Y, Murphy JM, Goldstein A, Zaffaroni A *et al.* (2005b). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* **30**: 330-338.
- Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* **149**: 217-224.
- Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* **72**: 55-64.
- Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS *et al.* (2000). Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* **20**: 8620-8628.
- Schultz W (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* **30**: 203-210.

- Wallace DL, Vialou V, Rios L, Carle-Florence TL, Chakravarty S, Kumar A *et al.* (2008). The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *J Neurosci* **28**: 10272-10277.
- Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thoren P, Nestler EJ *et al.* (2002). DeltaFosB regulates wheel running. *J Neurosci* **22**: 8133-8138.
- Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002). Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* **22**: 7225-7233.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* **26**: 4901-4907.

Figure Legends

Figure 1 Psychostimulant drugs induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. Control saline injection had no effect on FosB/ Δ FosB in the tVTA (A). The acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹ (B), D-amphetamine 1 mg.kg⁻¹ (C), MDMA 5 mg.kg⁻¹ (D), methylphenidate 10 mg.kg⁻¹ (E), or caffeine 10 mg.kg⁻¹ (F) induced FosB/ Δ FosB in the tVTA. n=3 per group. Abbreviations: CLi, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars = 500 μ m in A₁ (applies to B₁, C₁, D₁, E₁ and F₁); 100 μ m in A₂ (applies to B₂, C₂, D₂, E₂ and F₂).

Figure 2 Quantification and *camera lucida* drawings of FosB/ Δ FosB-positive nuclei in the tVTA. The acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹ (A), D-amphetamine 1 mg.kg⁻¹ (B), MDMA 5 mg.kg⁻¹ (C), methylphenidate 10 mg.kg⁻¹ (D), or caffeine 10 mg.kg⁻¹ (E) induced FosB/ Δ FosB in the whole extent of the tVTA. For each drug, drawings are ordered from rostral to caudal. Each dot represents a positive nucleus for FosB/ Δ FosB immunohistochemistry. The positive nuclei within tVTA are in red; the positive nuclei outside tVTA are in brown. The induction of FosB/ Δ FosB is bilateral, for each drug the total number of FosB/ Δ FosB-positive nuclei per hemi-tVTA is presented as mean \pm SEM. n=3 per group. * = $P < 0.05$, *t*-test against control data (saline).

Figure 3 Quantification of FosB/ Δ FosB-positive nuclei along the anteroposterior extent of the tVTA. Rats received an acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹, D-amphetamine 1 mg.kg⁻¹, MDMA 5 mg.kg⁻¹, methylphenidate 10 mg.kg⁻¹, caffeine 10 mg.kg⁻¹, GBR12909 15 mg.kg⁻¹,

or 0.9 % NaCl (saline) as control. n=3 per group. The mean number of FosB/ Δ FosB-nuclei is given per bregma level, according to the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Figure 4 Psychostimulants induce FosB/ Δ FosB in GABAergic neurons of the tVTA. Following acute injection of cocaine 20 mg.kg⁻¹ (A), D-amphetamine 1 mg.kg⁻¹ (B), MDMA 5 mg.kg⁻¹ (C), methylphenidate 10 mg.kg⁻¹ (D), caffeine 10 mg.kg⁻¹ (E) or GBR12909 15 mg.kg⁻¹ (F), FosB/ Δ FosB-positive nuclei are found in GABAergic but not in dopaminergic neurons in the tVTA. This is shown by double labeling for FosB/ Δ FosB (green) and TH (red) (first column), or for FosB/ Δ FosB (green, second column) and glutamic acid decarboxylase (GAD) (red, third column). The merged image for FosB/ Δ FosB and GAD staining is presented in the fourth column. Quantification of double-labeling immunofluorescence revealed that none of the FosB/ Δ FosB -positive cells co-expressed TH (G₁) whereas 98-100 % were GAD positive (G₂).

Figure 5 Sedative, dissociative or anticonvulsant drugs do not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The acute injection of ethanol (4 mL, 15 %) (A), diazepam 1.5 mg.kg⁻¹ (B), γ -hydroxybutyric acid sodium salt (GHB) 1 g.kg⁻¹ (C), morphine 10 mg.kg⁻¹ (D), ketamine 50 mg.kg⁻¹ (E), phencyclidine (PCP) 3 mg.kg⁻¹ (F), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) 3 mg.kg⁻¹ (G), valproic acid 20 mg.kg⁻¹ (H) or gabapentin 50 mg.kg⁻¹ (I) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. n=3 per group. Abbreviations: CLi, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars = 500 μ m in A₁ (applies to B₁, C₁, D₁, E₁, F₁, G₁, H₁ and I₁); 100 μ m in A₂ (applies to B₂, C₂, D₂, E₂, F₂, G₂, H₂ and I₂).

Figure 6 FosB/ Δ FosB is induced in the tVTA by a DAT inhibitor, but not by antidepressant drugs or by a 5-hydroxytryptamine releasing agent. The acute injection of reboxetine 0.8 mg.kg⁻¹ (A), nortriptyline 15 mg.kg⁻¹ (B), fluoxetine 10 mg.kg⁻¹ (C), venlafaxine 5 mg.kg⁻¹ (D) or S-(+)-fenfluramine (dexfenfluramine) 4 mg.kg⁻¹ (E) did not induce FosB/ Δ FosB in the tVTA. The acute injection of GBR12909 15 mg.kg⁻¹ (F) induced FosB/ Δ FosB in the tVTA. n=3 per group. Abbreviations: CLi, caudal linear nucleus of the raphe; cp, cerebral peduncle; IP, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; tth, trigeminothalamic tract; tVTA, tail of the ventral tegmental area; xscp, superior cerebellar peduncle decussation. Scale bars = 500 μ m in A₁ (applies to B₁, C₁, D₁, E₁ and F₁); 100 μ m in A₂ (applies to B₂, C₂, D₂, E₂ and F₂).

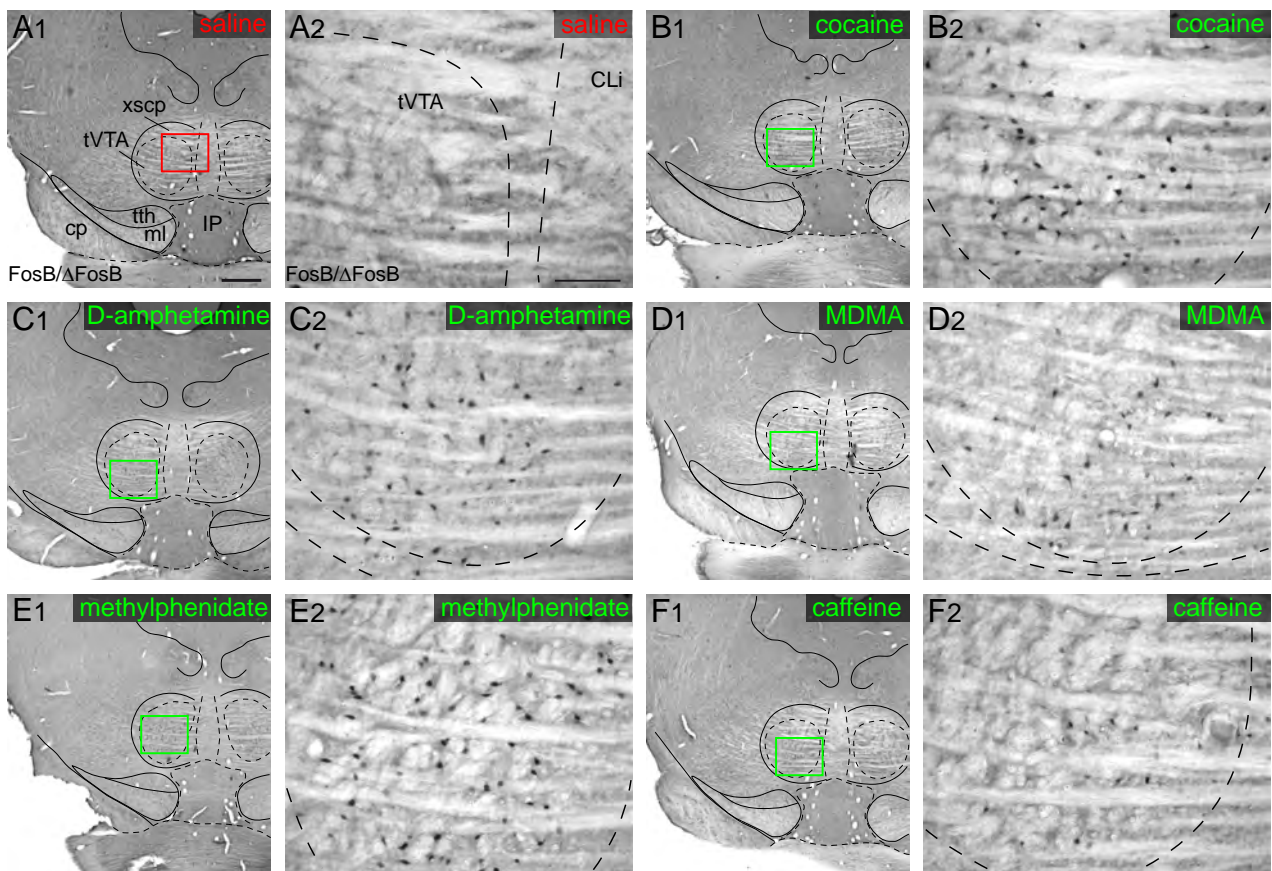


figure 1 :

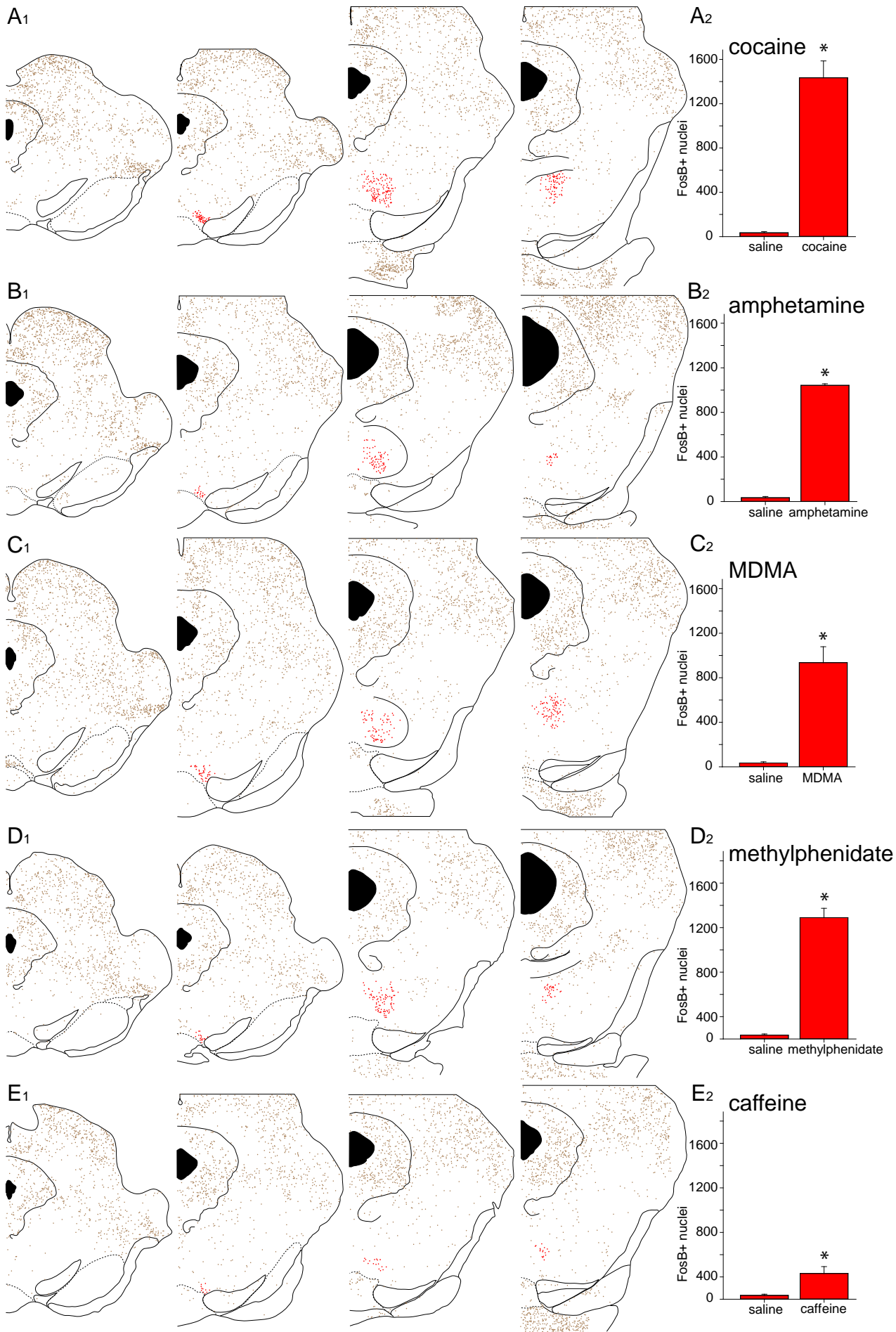


figure 2 :

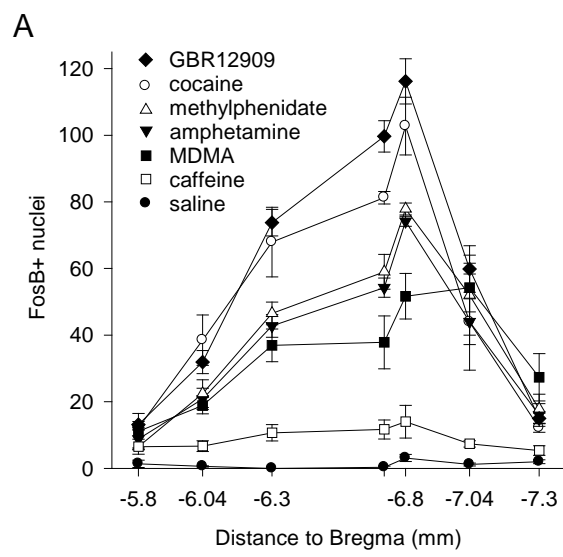
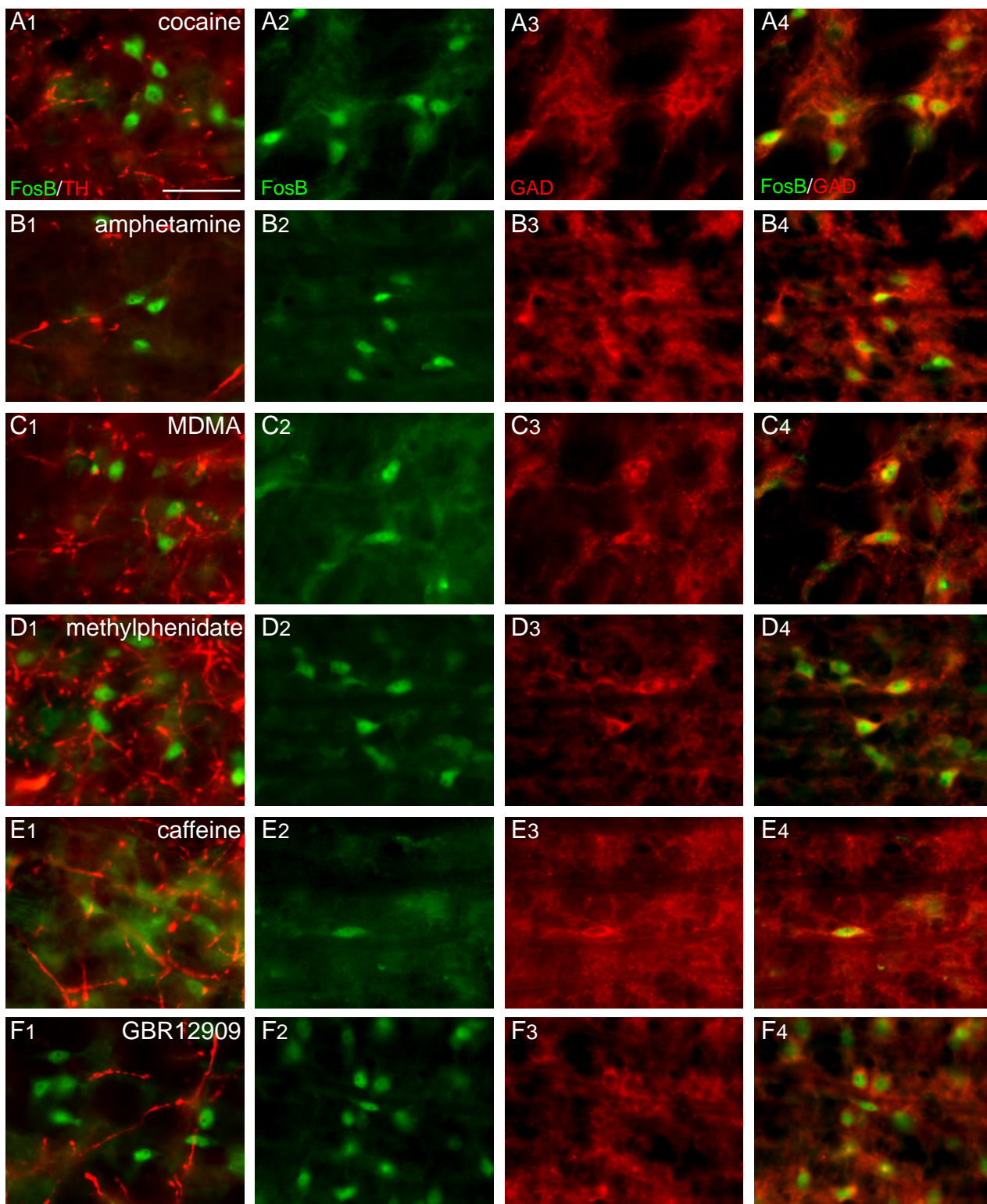


Figure 3 :



G1	FosB ⁺ cells		G2	FosB ⁺ cells	
	TH ⁻	TH ⁺		GAD ⁻	GAD ⁺
cocaine	259	0	cocaine	4	427
amphetamine	307	0	amphetamine	2	263
MDMA	264	0	MDMA	0	218
methylphenidate	480	0	methylphenidate	1	374
caffeine	52	0	caffeine	1	55
GBR12909	320	0	GBR12909	5	315

Figure 4 :

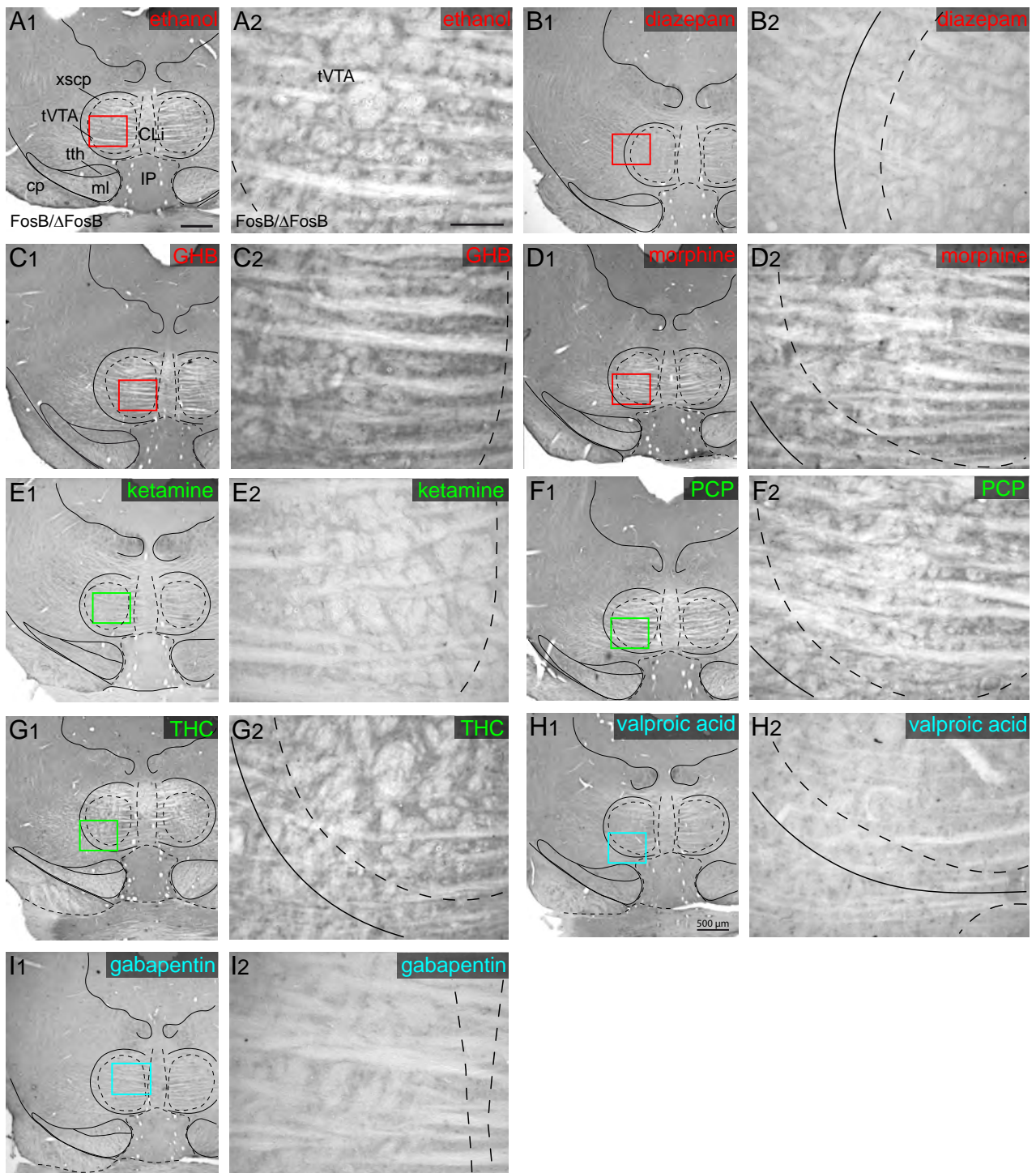


Figure 5 :

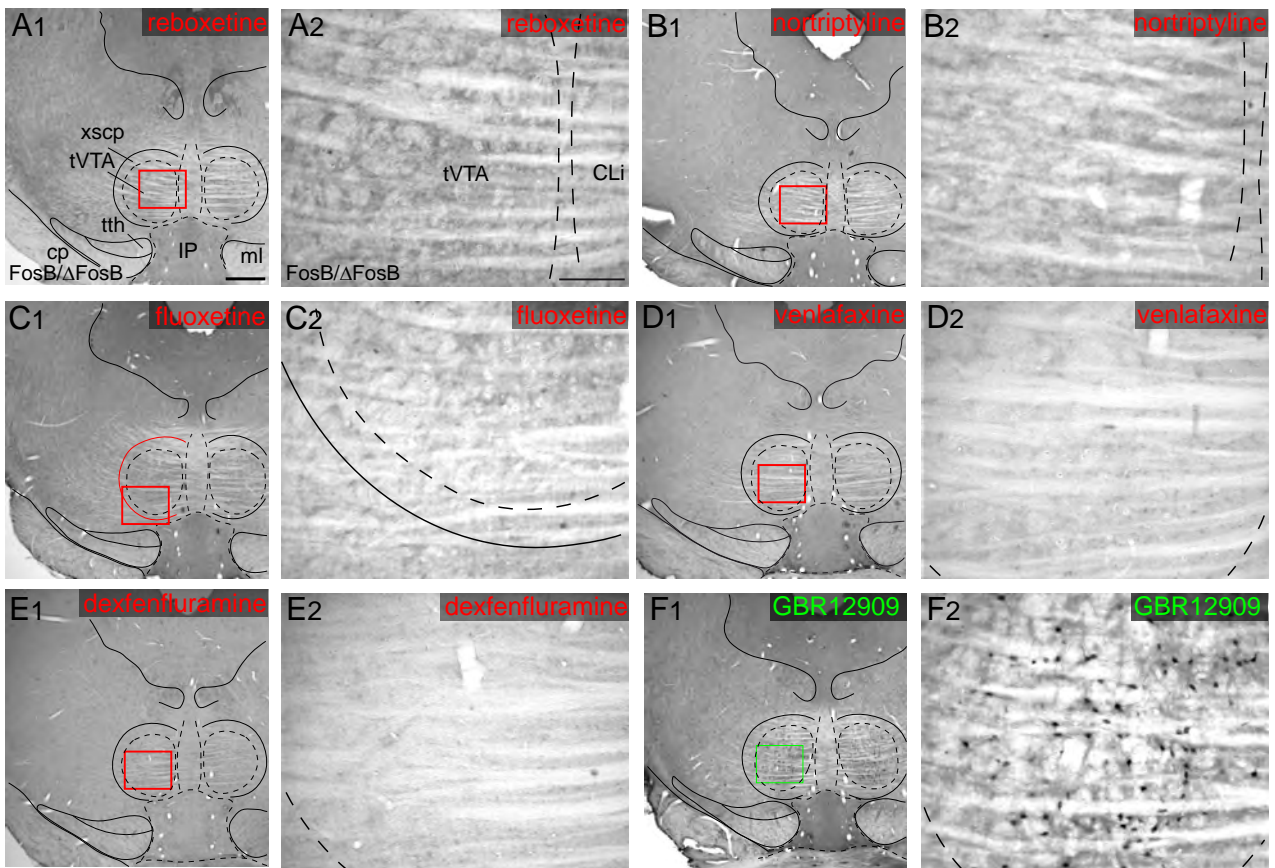


Figure 6 :

DISCUSSION GENERALE

I) Considérations méthodologiques relatives à l'utilisation de traceurs

Pour mieux comprendre le ou les rôles de la tVTA, j'en ai cartographié les connexions. Pour cela j'ai utilisé divers traceurs. Avant de discuter plus avant ces travaux, je pense qu'il est important d'aborder certains aspects méthodologiques inhérents à ce type d'expérimentation. En effet, ce sont les résultats de ces traçages qui sont à la base des théories anatomo-fonctionnelles relatives à la tVTA qui seront discutées dans cette thèse.

Pour mes expériences, j'ai utilisé deux traceurs rétrogrades et un traceur antérograde. Le Fluoro-Gold[®] (FG) et la sous-unité β de la toxine cholérique (CTB) sont des traceurs rétrogrades. Ils sont captés par les terminaisons axonales et transportés de manière rétrograde jusqu'au corps cellulaire. Ils permettent donc de caractériser les entrées, ou afférences, de la région dans laquelle ils sont injectés (pour revue : Köbbert et al., 2000). Le traceur antérograde utilisé est une amine dextran biotynilée (BDA). Il est capturé par les somas et dendrites localisés au site d'injection, et transporté le long de l'axone jusqu'aux terminaisons par transport axonal antérograde. Ce traceur permet ainsi d'observer les sorties, ou efférences, de la région d'injection (pour revue : Köbbert et al., 2000).

A) Considérations relatives à l'utilisation des traceurs rétrogrades

Pour caractériser les afférences à la tVTA, nous avons d'abord choisi le FG. Ce traceur présente de nombreux avantages, comme une incorporation facile par les terminaisons axonales, un transport rétrograde rapide et il donne d'excellents détails morphologiques (Schmued et Fallon, 1986 ; Chang et al., 1990). De plus, ce traceur a été utilisé par le groupe de Daniel S. Zahm dans leur récente description des afférences de la VTA (Geisler et Zham, 2005), justifiant ainsi d'autant plus son utilisation pour notre caractérisation de celles de la tVTA. Néanmoins, il a été suggéré que le FG peut aussi être capté par des fibres de passage endommagées par l'injection (Dado et al., 1990 ; Chen et Aston-Jones, 1998 ; Geisler et Zahm, 2005). Certaines fibres de la décussation du pédoncule cérébelleux supérieur pourraient ainsi capter du FG lors de nos injections dans la tVTA. Afin de minimiser ce risque, une dilution faible en FG (2%) ainsi qu'un protocole d'injection microiontophorétique ont été utilisés. De plus, pour confirmer certaines connexions, des traçages « réciproques » ont également été effectués. Ces expériences consistent à injecter un traceur antérograde dans des régions marquées de façon rétrograde par le FG. L'observation dans la tVTA de fibres marquées de façon antérograde confirme alors la projection. Enfin, nous avons reproduit les

résultats de traçage rétrograde en utilisant un autre traceur, la CTB, moins sensible aux phénomènes de capture par les fibres de passage. Cette approche a confirmé l'ensemble de nos résultats. Il est à noter que les résultats artéfactuels dus à la contamination par les fibres de passage étaient toujours présents avec l'utilisation de la CTB. Par exemple, le marquage dans le noyau mamillaire médian induit par l'injection du FG est toujours présent quand on utilise la CTB, mais cette afférence potentielle est infirmée par l'injection réciproque de BDA dans cette région.

Un autre défaut, observé avec l'utilisation des traceurs rétrogrades, est la difficulté d'effectuer de petits sites d'injection malgré l'utilisation de la technique de microiontophorèse. En effet, la CTB et le FG ont une sphère de diffusion importante qui peut entraîner une contamination par les structures adjacentes au site d'injection. Pour la tVTA, une contamination par le noyau interpédonculaire (IP) ou l'a/pVTA était ainsi possible. L'injection du même traceur autour de la région étudiée a permis de vérifier que le marquage rétrograde ainsi obtenu diffère de celui observé dans le cas d'une injection dans la tVTA.

Enfin, j'aimerais discuter un dernier point relatif à l'interprétation des résultats du traçage rétrograde. Il est commun de trouver dans les études de neuroanatomie, dont la nôtre, des tableaux où le nombre de neurones marqués de manière rétrograde est évalué par région. Souvent ces comptages servent à définir l'importance relative des différentes afférences d'une région. On pourrait penser que l'importance fonctionnelle d'une connexion est d'autant plus importante que le nombre de neurones marqués de façon rétrograde est plus grand. Cependant, une telle analyse ne tient pas compte du patron local de branchement des neurones marqués. Ainsi, on ignore combien de cellules sont contactées par ces neurones et quelle est la densité de leur arborisation terminale. En d'autres termes on ne connaît pas le « niveau d'intégration » du neurone. On peut imaginer que 10 neurones de la région X projetant à la région Y sont fonctionnellement plus importants que 100 neurones de la région X' projetant à la région Y. Ce commentaire ne remet pas en cause les comptages de neurones marqués de manière rétrograde qui sont effectivement nécessaires, cependant l'interprétation de ces données doit se faire avec discernement. Une vision globale de l'ensemble des régions afférentes à une structure donnée est plus informative quant aux rôles fonctionnels potentiels de cette structure.

B) Considérations relatives à l'utilisation d'un traceur antérograde

Le traceur antérograde que nous avons utilisé est la BDA (pour revue : Reiner et al., 2000). Facile d'utilisation, elle permet de réaliser de très petites injections, ce qui est un avantage mais peut aussi être un inconvénient. La taille réduite des injections permet d'étudier la topie des projections d'une structure, mais ne permet pas forcément d'observer en une seule injection l'intégralité des projections de cette structure. On n'observe les efférences que d'une partie de la structure étudiée. Par contre, les problèmes de contamination par les régions adjacentes, sont facilement évitables.

Un point important concernant l'utilisation de la BDA est sa propriété d'être à la fois un traceur antérograde et rétrograde (Fritzsich, 1993 ; Kaneko et al., 1996 ; Medina et al., 1997 ; Reiner et al., 2000). Même si l'utilisation de la BDA d'un poids moléculaire de 10 kDa limite le transport rétrograde, celui-ci reste présent (Veenman et al., 1992). Il est lié à la capture du traceur par les terminaisons axonales lésées par la pipette lors de l'injection (Reiner et al., 2000). Le souci majeur ne vient pas directement de ce transport rétrograde, qui reste facilement distinguable du transport antérograde par l'aspect morphologique du marquage, mais il vient plutôt d'un transport antérograde par les collatérales d'axones de neurones qui auraient été marqués de façon rétrograde (Chen et Aston-Jones, 1998).

II) Historique : tVTA et RMTg, deux dénominations pour une même structure

A) Les deux faces d'une même pièce : tVTA vs. RMTg

La tVTA a été découverte, ou redécouverte, au début des années 2000 par Linda Perrotti et Michel Barrot, dans le laboratoire d'Eric Nestler à Dallas. La publication de ce travail en 2005 (Perrotti et al., 2005) décrit pour la première fois l'induction de FosB/ Δ FosB dans des neurones GABAergiques d'une région directement postérieure à l'a/pVTA suite à l'administration ou l'auto-administration de cocaïne ou l'administration d'amphétamine chez le rat. Cette région fut alors nommée queue GABAergique de la VTA ou tVTA. Revenu en France, Michel Barrot a développé un groupe de recherche sur la plasticité liée à la douleur chronique et ses traitements, tout en gardant un axe de recherche sur la tVTA. C'est dans cet environnement que j'ai réalisé un stage en maîtrise en 2005, puis mon stage de master 2 et finalement mon doctorat sur la caractérisation anatomo-fonctionnelle de la tVTA.

La première étape pour mieux comprendre cette nouvelle région passait par une caractérisation anatomique, c'est-à-dire par l'identification des afférences et efférences de la tVTA. Ces deux caractérisations se sont faites en parallèle et en novembre 2007 nous avons soumis au Journal of Comparative Neurology le premier article sur les entrées à la tVTA. Le processus d'évaluation a duré une année complète. Pendant ce temps, alors que les résultats devaient être présentés au congrès de la Society for Neuroscience (SFN), nous avons réalisé grâce aux résumés du congrès qu'un autre groupe, celui de Daniel Zahm, travaillait sur les mêmes questions. Nous avons alors appris fin août 2008 que leur publication sur la caractérisation anatomique de la tVTA soumise en juillet 2008 (8 mois après nous) était acceptée depuis peu dans le Journal of Comparative Neurology. Après discussion avec l'éditeur, les deux articles ont été publiés dos à dos en avril 2009 (Kaufling et al., 2009 ; Zhou et al., 2009a).

Stephanie Geisler et Daniel Zham ont observé cette région pour la première fois lors de travaux en collaboration avec Micky Marinelli (Geisler et al., 2008). Ils ont étudié les neurones projetant à la VTA et activés, comme indiqué par l'induction de cFos, par l'auto-administration de cocaïne. La protéine cFos était fortement induite dans des neurones du tegmentum qui projettent à l'a/pVTA et ils ont nommé cette région, qui correspond à la tVTA, noyau tegmental rostromédial ou RMTg. La différence de dénomination, tVTA vs. RMTg, s'explique notamment par une approche neuroanatomique différente. Dans notre cas, la tVTA a été découverte en étudiant la VTA et elle se place en continuité antéro-postérieure

de celle-ci, alors que Zahm a une vision postéro-antérieure et associe cette région à d'autres noyaux du tegmentum, comme les noyaux tegmentaux pedunculopontin (PPTg) ou latérodorsal (LDT).

Les résultats obtenus par nos deux équipes concordent largement (Geisler et al., 2008 ; Kaufling et al., 2009, 2010 ; Jhou et al., 2009a) : l'essentiel des entrées à la tVTA sont issues des régions projetant à l'a/pVTA et les neurones dopaminergiques du mésencéphale constituent une efférence majeure de la tVTA. Une différence notable existe cependant, elle concerne la projection de l'amygdale centrale vers la tVTA/RMTg. Nos résultats ne la mettent pas en évidence contrairement à ceux du groupe de Zahm.

De façon intéressante, le groupe de Zahm a observé une immunoréactivité somatostatine et récepteurs μ des opioïdes dans le RMTg (Jhou et al., 2009a), ce qui améliore l'identification neuroanatomique de la tVTA identifiable jusque là par la seule induction de Fos par les psychostimulants. Cette observation reste néanmoins à compléter en étudiant la colocalisation de l'immunoréactivité somatostatine ou des récepteurs μ des opioïdes avec l'immunoreactivité GAD, enzyme de synthèse du GABA, et les protéines Fos après exposition aux psychostimulants.

B) Focus sur une projection : de l'habénula latérale à la tVTA/RMTg

Lors du congrès 2008 de la SFN, nous avons réalisé que les études de Zahm servaient aussi de bases neuroanatomiques aux travaux d'un autre chercheur, Thomas Jhou, qui s'intéressait aux conditionnements aversifs. Pour lui, le RMTg serait à l'interface entre l'habénula latérale (LHb) et la VTA dans le traitement des informations récompensantes et aversives. Avant de discuter leurs données (Jhou et al., 2009b) il me semble important de présenter la LHb et ses liens avec l'a/pVTA.

Un rôle crucial de la LHb dans les mécanismes liés à la récompense a été observé chez le primate. Les études chez l'animal vigile montrent que les cellules de la LHb sont inhibées par des stimulus prédisant une récompense et activées par ceux n'en prédisant aucune (Matsumoto et Hikosaka, 2007). Ce patron d'activité est l'inverse de celui observé pour les neurones dopaminergiques dans les mêmes conditions expérimentales et le précède dans le temps (Matsumoto et Hikosaka, 2007). Cela suggère que les neurones de la LHb pourraient, pour partie, être responsables des pauses dans l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA observées lors de la présentation de stimulus ne prédisant aucune récompense. Cette hypothèse est renforcée par les études montrant une inhibition rapide des neurones

dopaminergiques (Christoph et al., 1986 ; Ji et Shepard 2007 ; Matsumoto et Hikosaka 2007) ou une réduction des taux de dopamine dans le télencéphale (Lecourtier et al., 2008) après stimulation électrique de la LHb. Neuroanatomiquement, une projection de la LHb sur l'a/pVTA a été confirmée (Cf. Introduction, Figure 7) (Herkenham et Nauta 1979 ; Araki et al., 1988 ; Geisler et Zahm 2005 ; Kim 2009), mais elle serait glutamatergique (Kalén et al., 1985 ; Matsuda et Fujimura 1992 ; Herzog et al., 2004 ; Geisler et al., 2007) alors que la stimulation de la LHb inhibe les neurones dopaminergiques. Cette action inhibitrice doit donc être polysynaptique et nécessite un relais inhibiteur. L'hypothèse la plus simple mettrait en jeu les interneurons GABAergiques de l'a/pVTA, mais elle est réfutée par une étude en microscopie électronique du groupe de Susan Sesack (Omelchenko et al., 2009a) qui montre que les neurones de la LHb ne contactent que rarement les interneurons GABAergiques de l'a/pVTA. Selon Thomas Jhou, les neurones GABAergiques de la tVTA constitueraient le relais inhibiteur entre la LHb et l'a/pVTA. Pour tester cette hypothèse, il s'est associé à plusieurs laboratoires pour effectuer une étude regroupant des données neuroanatomiques, comportementales et électrophysiologiques (Jhou et al., 2009b). Dans ce travail, Jhou et collaborateurs observent une activation électrophysiologique phasique des neurones du RMTg et/ou une induction de Fos dans ces neurones après des stimulus aversifs comme des chocs électriques, des indices les prédisant, une privation alimentaire ou l'omission de récompense. Ils sont par contre inhibés après une récompense ou après des indices la prédisant. Des lésions du RMTg réduisent les comportements de peur conditionnée ou d'anxiété. Les neurones GABAergiques du RMTg s'opposeraient ainsi aux fonctions récompensantes modulées par les neurones dopaminergiques du mésencéphale.

Les résultats de cet article doivent toutefois être nuancés. Les lésions du RMTg sont des lésions excitotoxiques très étendues qui touchent massivement les régions adjacentes, comme le noyau interpedonculaire ou le PPTg ce qui peut remettre en question ses conclusions. De plus, ces lésions augmentent légèrement l'activité locomotrice (voir Figure 5 dans Jhou et al., 2009b) ce qui est en accord avec un contrôle des systèmes dopaminergiques mésolimbiques et nigrostriés mais rend plus délicate l'interprétation de données basées sur un comportement d'immobilité. Des résultats récents obtenus dans notre équipe par Romain Bourdy confirment que des lésions de la tVTA peuvent influencer l'activité motrice des animaux.

Finalement, en novembre 2009, lors du dernier congrès de la SFN, nous avons eu la chance de voir deux nouvelles études qui visent à mieux comprendre les relations entre LHb, tVTA et a/pVTA. Le groupe de Susan Sesack s'est penché sur les relations neuroanatomiques

entre ces trois structures. Grâce à la microscopie électronique, ils observent que de nombreux axones issus de la LHb font synapse sur les neurones GABAergiques de la tVTA et que les axones issus de la tVTA projetant sur l'a/pVTA font majoritairement synapse sur les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA (Balcita-Pedicino et al., 2009). Ces données sont importantes car elles démontrent que la connexion LHb - neurones GABAergiques de la tVTA - neurones dopaminergiques de l'a/pVTA est neuroanatomiquement possible.

La seconde étude de Hong et Hikosaka (2009) concerne l'importance fonctionnelle de la voie LHb-tVTA-SNC (neurones dopaminergiques) dans l'erreur de prédiction de récompense chez le primate, en utilisant un paradigme de tâche de récompense directionnelle (1DR) (Hong et Hikosaka, 2008). Dans la tVTA, ils observent 2 groupes de neurones : ceux de type « négatif » sont inhibés par des stimulus visuels prédisant une récompense et excités par des stimulus visuels ne prédisant pas de récompense. Ce patron de réponse concerne deux tiers des neurones enregistrés et est semblable à celui observé pour les neurones de la LHb. Le dernier tiers des neurones est de type « positif » : ils sont excités par la prédiction de récompense et inhibés par son absence. Après avoir testé l'existence de connexions fonctionnelles LHb-tVTA et tVTA-SNC grâce à des stimulations électriques, ils ont ensuite étudié l'ordre d'activation des neurones de ces 3 structures lors du test 1DR. Selon l'hypothèse générale, ils s'attendaient à une activation séquentielle de la LHb, puis de la tVTA et enfin de la SNC. Or, l'activation de la tVTA précède légèrement celle de la LHb. Toutes ces données (Balcita-Pedicino et al., 2009 ; Hong et Hikosaka 2009 ; Jhou et al., 2009b) montrent l'existence de la voie LHb-tVTA-a/pVTA/SNC par neuroanatomie et électrophysiologie, mais cette linéarité ne rend pas compte du traitement réel de l'information lors d'une situation physiologique.

C) Du recrutement de la tVTA : stimulant ou aversif ?

Un point de divergence apparent entre nos données et celles de Jhou porte sur les facteurs induisant les protéines Fos dans la tVTA/RMTg. Selon Jhou, ce sont principalement les stimulus aversifs qui induiraient Fos dans la tVTA alors que nos résultats aboutissent à des conclusions différentes. En effet, l'injection ou l'auto-administration de divers psychostimulants provoque l'accumulation de FosB dans la tVTA (Perrotti et al., 2005 ; Résultats Chapitres 1 et 4), ce qui n'est pas observé après un stress de contention (Perrotti et al., 2005). Jhou relie ces différences à la composante aversive des psychostimulants (Jhou et al., 2009b). Cependant, si l'on prend en considération la façon dont les stimulus naturels ou

les drogues peuvent recruter la tVTA, l'induction de protéines Fos dans la tVTA par des stimulus aversifs et celle par des psychostimulants ne s'excluent pas.

Selon de nombreux auteurs (Schultz 1998 ; Matsumoto et Hikosaka 2007 ; Jhou et al., 2009b) des stimulus naturels récompensant ou prédisant une récompense augmentent l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale. A l'opposé, des stimulus naturels aversifs ou prédisant une réponse aversive diminuent l'activité de ces mêmes neurones. Cela est applicable pour des stimulus traités de façon « naturelle » par le système nerveux, c'est-à-dire amenant les informations à la VTA par les voies neuronales afférentes. Par contre cette règle n'est plus valable lors d'actions pharmacologiques. En effet, les psychostimulants, et plus particulièrement les inhibiteurs de la recapture de la dopamine, sont récompensants alors que de façon aiguë ils diminuent l'activité des neurones dopaminergiques (pour revue Marinelli et al., 2006). Ces drogues court-circuitent tout simplement les voies afférentes pour agir directement sur les neurones dopaminergiques. Le même principe s'applique sans doute aussi pour le recrutement de la tVTA. Dans ce cadre, l'induction de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA à la fois par les psychostimulants et par des stimulus aversifs est compatible. Néanmoins, elle n'est en rien la conséquence d'un stress lié aux psychostimulants mais serait, comme le suggère les résultats avec le GBR12909, la simple conséquence d'une forte augmentation des niveaux extracellulaires de dopamine dans le mésencéphale soit au niveau des terminaisons dopaminergiques dans la tVTA, soit plus vraisemblablement suite à la diffusion, par transmission volumique de dopamine somatodendritique en provenance de l'a/pVTA.

III) Rôle fonctionnel de la tVTA et de l'induction locale de FosB/ Δ FosB

Les discussions informelles entre les acteurs des différentes études sur la tVTA/RMTg lors des derniers congrès SFN, nous permettent d'envisager cette nouvelle structure comme un centre de contrôle des systèmes dopaminergiques mésolimbiques et nigrostriés. Cependant, le ou les rôles physiologiques de ce contrôle et les situations le mettant en jeu restent encore à identifier.

Les études réalisées pendant ma thèse montrent que les neurones GABAergiques de la tVTA projettent sur et contrôlent les neurones dopaminergiques du système mésolimbique (Voir Résultats Chapitre 2 et 3). De plus, nous avons observé qu'un traitement aigu (Voir Résultats Chapitre 1 à 4) ou répété (Voir Résultats Chapitre 2) par des psychostimulants induit l'expression du facteur de transcription FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA. Ces résultats suggèrent donc une implication possible de la tVTA dans les adaptations consécutives à l'exposition aux psychostimulants. Avant de discuter cette hypothèse, il me semble important de détailler les mécanismes pouvant mener à l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA.

A) Induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA par les psychostimulants

Selon nos résultats, les psychostimulants seraient les seules drogues entraînant l'expression du facteur de transcription FosB/ Δ FosB dans la VTA, et cela spécifiquement dans les neurones GABAergiques de la tVTA (Chapitre 4 des résultats). Nous avons aussi montré que ce mécanisme est dépendant de la dopamine puisqu'il peut être observé avec un inhibiteur sélectif de la recapture de la dopamine, le GBR12909, mais pas après exposition à des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et/ou de la noradrénaline (Perrotti et al., 2005 ; Résultats Chapitre 4). Ces données amènent immédiatement une question : d'où provient la dopamine nécessaire à l'expression de ce facteur de transcription dans la tVTA ? Les projections de l'a/pVTA sur la tVTA sont de faible densité et peu de fibres dopaminergiques sont observées dans la tVTA (Jhou et al., 2009a ; Kaufling et al., 2009). On peut alors émettre l'hypothèse que la dopamine utilise la voie de transmission volumique de l'a/pVTA vers la tVTA. Cette possibilité reste toutefois à tester.

L'induction de protéines Fos par des drogues est en général présentée comme résultant d'une détection de coïncidence entre des entrées dopaminergiques activant la voie AMPc via les récepteurs D₁ et des entrées glutamatergiques agissant via les récepteurs NMDA (Liu et

al., 1994 ; Sharp et al., 1995 ; Horowitz et al., 1997). Des résultats préliminaires de notre équipe suggèrent que les récepteurs D₁ seraient effectivement impliqués puisque l'antagoniste SCH23390 diminue significativement le nombre de neurones positifs pour FosB/ Δ FosB dans la tVTA lors d'une exposition à la cocaïne (Figure 8). Cependant, l'ARNm de ces récepteurs n'est pas ou peu exprimé dans le mésencéphale (Mansour et al., 1992), il n'est en tout cas pas exprimé par les neurones de la VTA, mais cela reste à vérifier pour la tVTA. De façon surprenante, des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe suggèrent que le raclopride, antagoniste de récepteurs de la famille D₂ (D₂/D₃) inhibe également l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA. Cette induction est aussi bloquée par la co-injection de cocaïne et de l'antagoniste NMDA MK801 (Figure 8). Cette accumulation de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA pourrait donc nécessiter l'action concomitante de dopamine et de glutamate. Néanmoins, l'origine du glutamate reste à identifier. La cartographie des afférences de la tVTA permet de proposer le PFC comme candidat potentiel. Cependant, des lésions excitotoxiques bilatérales du PFC ne modifient pas l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA par la cocaïne (données de l'équipe non publiées Figure 9). La question des afférences glutamatergiques de la tVTA impliquées reste donc ouverte. Au vu des relations fonctionnelles entre la Lhb et la tVTA (Herkenham et Nauta 1979 ; Jhou et al., 2009a ; Balcita-Pedicino et al., 2009 ; Kaufling et al., 2009), une entrée glutamatergique issue de la Lhb pourrait être impliquée. Là encore, cela reste à tester.

Contrairement au NAc où de nombreuses drogues induisent l'expression de FosB/ Δ FosB (Perrotti et al., 2008), aucune expression de ce facteur de transcription n'est observée dans la tVTA après exposition à des drogues autres que les psychostimulants. La raison de cette différence reste à identifier. Selon nos résultats, un traitement aiguë par des drogues sédatives (alcool, diazépam, GBR12909, morphine), par des drogues dites « dissociatives » (kétamine, PCP, THC), mais également par des anticonvulsivants (valproate, gabapentine) ou des antidépresseurs (réboxétine, nortriptyline, venlafaxine, fluoxétine) n'induit pas d'expression de FosB dans la tVTA. Ce phénomène pourrait être en partie dû aux différences de niveaux de dopamine présente dans l'a/pVTA après traitement par ces substances, mais il pourrait aussi être lié à la présence des récepteurs μ des opioïdes sur les neurones de la tVTA (Jhou et al., 2009a). En effet, la stimulation directe de ces récepteurs pourrait empêcher l'induction de FosB par la dopamine.

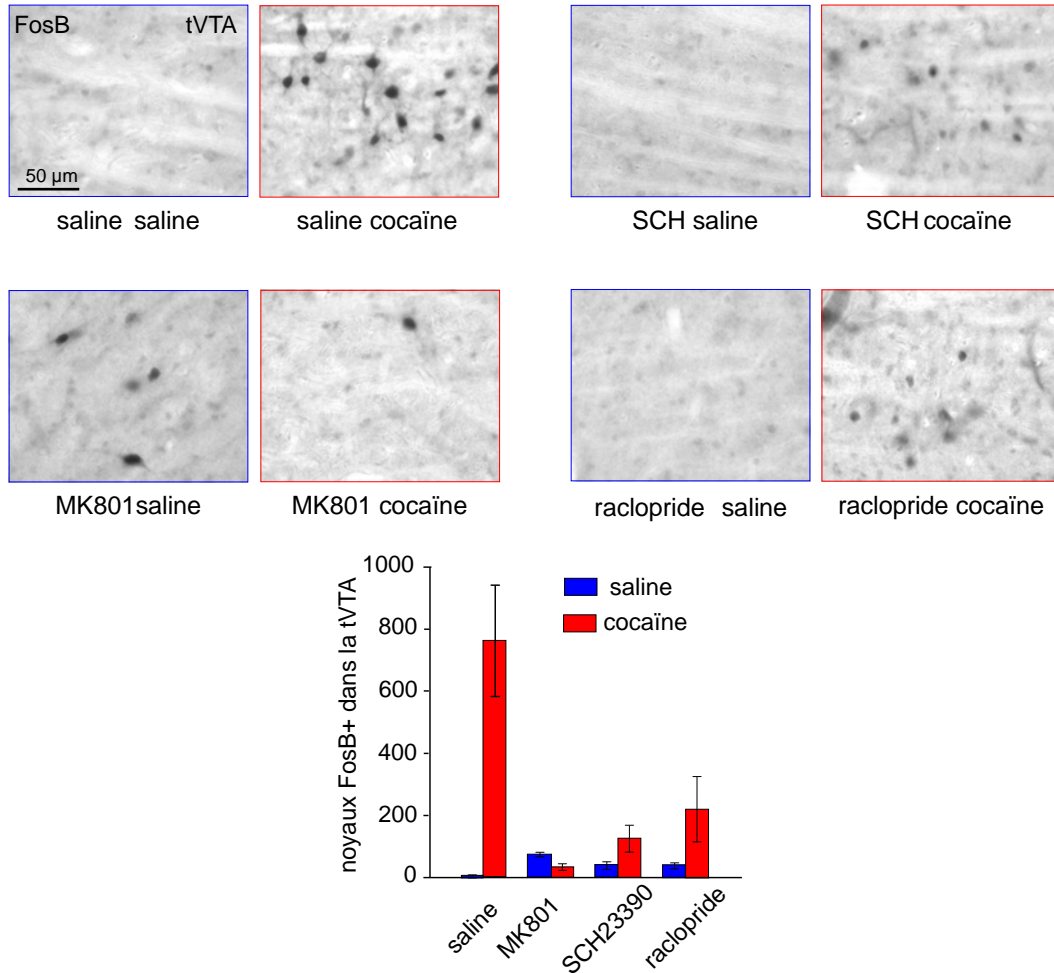
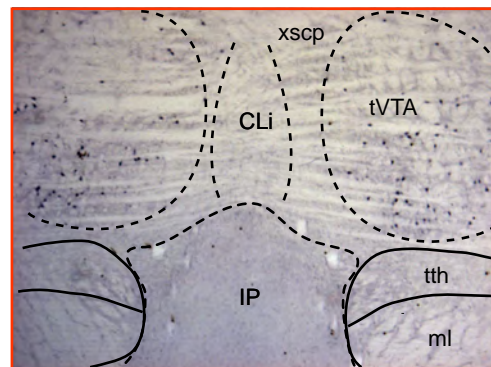
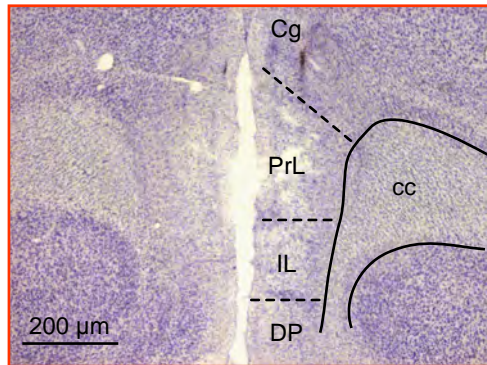
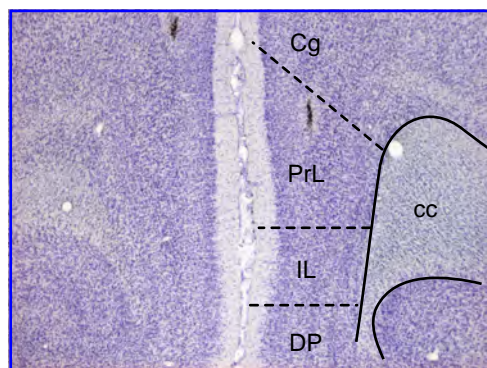


Figure 8 : L'induction de FosB dans la tVTA par la cocaïne nécessite la présence des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 ainsi que des récepteurs glutamatergiques NMDA. Pour chaque groupe d'animaux, un antagoniste des récepteurs D1, le SCH23390 (1 mg/kg i.p.), D2, le raclopride (1 mg/kg i.p.), des récepteurs NMDA, le MK801 (1 mg/kg i.p.), ou une solution saline (NaCl 0,9%) est injecté 30 min avant une injection de cocaïne (20 mg/kg i.p.) ou de saline. Les animaux sont sacrifiés trois heures après la seconde injection. On note une diminution significative de l'induction de FosB par la cocaïne suite à l'injection des trois antagonistes (voir photographies de l'immunoréactivité FosB révélée dans la tVTA de différents animaux). Le graphique du bas représente le nombre moyen de noyaux FosB-positifs dans la tVTA en fonction des différents traitements.

lésions bilatérales du cortex préfrontal



↑
présence de FosB
dans la tVTA



cortex préfrontal d'un animal pseudo-opéré

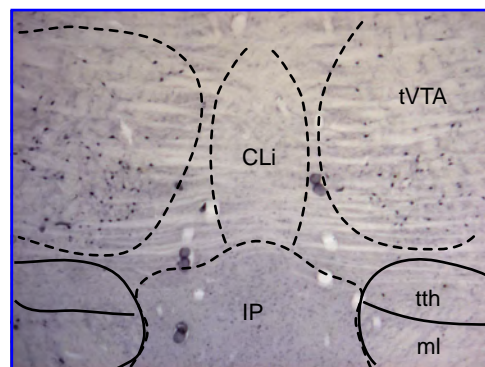


Figure 9 : Les afférences issues du cortex préfrontal ne sont pas nécessaires à l'induction de FosB dans la tVTA par la cocaïne.

En haut à gauche : photographie d'une coupe frontale de rat illustrant la lésion excitotoxique bilatérale induite par injection d'acide quinolinique dans le cortex préfrontal.

En haut à droite : photographie, chez le même animal, d'une coupe frontale illustrant le maintien de l'induction de FosB dans la tVTA suite à l'injection de cocaïne (20 mg/kg, i.p.).

En bas : photographie illustrant l'induction de FosB par la cocaïne (à droite) et chez un animal pseudo-opéré (injection de NaCl 0,9 % dans le cortex préfrontal) (à gauche).

Les coupes du cortex préfrontal sont colorées au crésyl violet pour visualiser les lésions.

Abréviations : cc : corps calleux ; Cg : cortex cingulaire ; CLi : n. linéaire rostral du raphé ; DP: cortex pédonculaire dorsal ; IL : cortex infralimbique ; IP : n. interpédonculaire ; ml : lemnisque médian ; PrL : cortex prélimbique ; tth : tractus trigémino-thalamique ; tVTA : queue de l'aire tegmentale ventrale ; xscp : décussation du pédoncule cérébelleux supérieur.

B) Conséquences fonctionnelles de l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA

1) Effet aigu (à court terme) de la cocaïne sur la tVTA

Imaginons les conséquences possibles d'une exposition à la cocaïne... Une fois injectée, cette drogue bloque les sites de recapture de la dopamine ce qui en augmente fortement les niveaux extracellulaires, notamment dans l'a/pVTA. Par action directe sur les sites de recapture dans la tVTA et/ou par action sur l'a/pVTA et transmission volumique de la dopamine vers la tVTA, la cocaïne pourrait stimuler les neurones GABAergiques de la tVTA, ce que traduit l'induction locale de FosB/ Δ FosB. La stimulation des neurones GABAergiques de la tVTA pourrait alors participer à une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques via la projection GABAergique de la tVTA sur l'a/pVTA. Un tel mécanisme s'apparenterait donc à un rétrocontrôle et pourrait participer à un phénomène bien connu : l'inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques de l'a/pVTA par la cocaïne (pour revue : Marinelli et al., 2009). Cette inhibition a principalement lieu via les autorécepteurs D₂ localisés sur les neurones dopaminergiques (Bunney et al., 2001), mais la tVTA pourrait peut-être aussi y contribuer. Ainsi, lors d'une injection aiguë de cocaïne, la tVTA pourrait exercer un rôle de frein et participer aux processus opposants à l'action primaire de la drogue (Koob et Le Moal, 2008a et b), voire participer à court terme à la dysphorie secondaire à l'action de la cocaïne.

2) Effet chronique (à long ou moyen terme) de la cocaïne sur la tVTA

L'hypothèse décrite ci-dessus concerne l'implication possible de la tVTA dans la réponse aiguë à une administration de cocaïne. Mais cette administration a localement une conséquence secondaire : l'induction de FosB/ Δ FosB, qui peut ensuite affecter la physiologie du neurone et donc modifier sa réponse lors des réexpositions ultérieures à la drogue. Une telle plasticité est d'autant plus significative qu'elle ne s'observe pas seulement suite à l'administration forcée de psychostimulants, mais qu'elle est également présente chez des animaux s'auto-administrant la cocaïne (Perrotti et al., 2005 ; Geisler et al., 2008). A chaque exposition aux psychostimulants, FosB/ Δ FosB va s'accumuler dans la tVTA, mais quelles sont les conséquences de cette induction ? Des possibilités aux conséquences opposées peuvent être évoquées.

Si l'expression de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA augmente l'excitabilité de ces neurones, cela devrait faciliter la libération de GABA dans l'a/pVTA et augmenter l'inhibition des neurones dopaminergiques. Cela pourrait donc

éventuellement conduire à une baisse de la libération de dopamine dans l'a/pVTA ou le NAc. Dans ce cas, comme lors de la réponse aiguë, l'induction de FosB/ Δ FosB dans la tVTA participerait à des processus opposants aux effets de la cocaïne (Koob et Le Moal, 2008a et b). Mais cette hypothèse est peu probable si l'on considère les connaissances disponibles sur les gènes cibles et sur l'action cellulaire de FosB/ Δ FosB.

Si l'expression de FosB/ Δ FosB dans les neurones GABAergiques de la tVTA diminue l'excitabilité de ces neurones, cela devrait alors faciliter les réponses dopaminergiques en affaiblissant l'un des contrôles inhibiteurs des neurones dopaminergiques. Cette seconde hypothèse est la plus plausible au vu des données moléculaires sur FosB/ Δ FosB (Kelz et al., 1999 ; Nestler et al. 2001 ; McClung et al., 2004). En effet, lors d'une conférence plénière au dernier congrès de la SFN (Nestler, 2009), Eric Nestler a précisé qu'une surexpression expérimentale de FosB/ Δ FosB dans le NAc diminuait l'excitabilité des neurones GABAergiques dans lesquels cette surexpression a lieu. Le même phénomène pourrait alors être envisagé pour les neurones GABAergiques de la tVTA. Une telle inhibition de l'excitabilité serait liée aux gènes cibles de FosB/ Δ FosB, parmi lesquels la sous-unité GLUR2 du récepteur AMPA du glutamate qui se trouve surexprimée (Kelz et al., 1999). En effet, la conductance des récepteurs AMPA est directement affectée par la proportion des diverses sous-unités les composant, une forte proportion de sous-unités GLUR2 diminuant cette conductance (Nestler et al., 2001, 2008). Dans ce contexte, les neurones de la tVTA pourraient devenir de moins en moins excitables avec la répétition de l'exposition aux psychostimulants. Une perte de l'inhibition exercée par la tVTA sur les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA pourrait alors participer aux phénomènes de sensibilisation des réponses dopaminergiques. De façon intéressante, il a été montré que l'induction initiale du phénomène de sensibilisation comportementale aux psychostimulants, c'est-à-dire l'augmentation du niveau d'activité locomotrice en fonction de la répétition des injections, a lieu dans la VTA. (Perugini et Vezina, 1994 ; Bjijou et al., 1996 ; Vanderschuren et Kalivas, 2000).

Dans ce cas, des lésions de la tVTA devraient amplifier les effets de la cocaïne et/ou accélérer la sensibilisation comportementale, voire provoquer un état de « présensibilisation ». Pour tester cette hypothèse, des expériences de sensibilisation locomotrice, de préférence de place conditionnée et d'autoadministration intraveineuse de cocaïne seraient nécessaires. Ces approches nous permettraient d'évaluer le rôle potentiel de la tVTA sur divers paramètres, qu'ils s'agissent de la sensibilité aux psychostimulants, de

l'acquisition et de la maintenance du comportement d'autoadministration, de la motivation et des risques de rechute de prise de drogue.

C) Autres aspects fonctionnels de la tVTA

Même si nos résultats associent pour l'instant la tVTA essentiellement à l'action des psychostimulants, il serait très réducteur de ne relier cette nouvelle structure cérébrale qu'à ces seules drogues ou aux seuls phénomènes liés à la dépendance. En effet, tout mécanisme modulé par les systèmes dopaminergiques (Simon et Le Moal 1988 ; Le Moal et Simon 1991) est susceptible d'être influencé par la tVTA. On peut ainsi citer les travaux de Thomas Jhou (Jhou et al., 2009b) ou ceux de Hong et Hikosaka (2009) qui mettent en évidence une participation de la tVTA dans les comportements de peur conditionnée ou d'anxiété ou dans l'erreur de prédiction de récompense. Mais la tVTA peut être impliquée dans de nombreuses autres fonctions. Un des exemples les plus clairement identifiables, compte tenu de la projection massive de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la SNC, est un rôle potentiel de la tVTA dans les processus moteurs. L'influence de la tVTA sur le système dopaminergique nigrostrié est actuellement abordée par Romain Bourdy dans le cadre de son doctorat au laboratoire.

Un dernier point à mentionner concerne les facteurs de transcription inductibles dans les neurones de la tVTA et pouvant donc participer à sa plasticité. Même si les travaux présentés ici se sont focalisés sur l'induction de FosB/ Δ FosB, nous avons observé au laboratoire qu'une administration aiguë de cocaïne induisait également l'expression d'un autre membre de la famille Fos, cFos, ainsi que celle du facteur de transcription Egr-1. Dans ces deux cas, on observe une expression spécifique à la tVTA mais absente du reste de la VTA. Ces facteurs de transcription ont des gènes cibles qui peuvent être eux-même différents, suggérant la complexité des mécanismes adaptatifs pouvant toucher les neurones GABAergiques de la tVTA.

IV) Considérations personnelles

A) La tVTA comme sous-région de la VTA

Dans la dernière partie de cette discussion, il me semble important de regrouper les éléments qui amènent à penser que la tVTA est une sous-région de la VTA.

Nos résultats montrent que la tVTA et l'a/pVTA reçoivent des afférences essentiellement issues des mêmes régions (Kaufling et al., 2009) (Figure 10). Par contre, les afférences sont très différentes puisque la tVTA possède des neurones GABAergiques qui projettent massivement aux neurones dopaminergiques de l'a/pVTA (Kaufling et al., 2010) (Figure 10). De plus nos résultats d'électrophysiologie mettent en évidence que ces neurones, comme les interneurons GABAergiques intra a/pVTA, inhibent les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA (Voir Résultats, chapitre 3). La tVTA est en position pour produire une inhibition antérograde de type « feed forward » sur les neurones de l'a/pVTA suite à l'activation des afférences à la VTA.

Il convient également de rappeler que les interneurons GABAergiques intra a/pVTA et les neurones GABAergiques de la tVTA sont porteurs du récepteur μ des opiacées (Jhou et al., 2009a).

Ces données permettent de proposer que les neurones GABAergiques de la tVTA sont une nouvelle population d'interneurones de la VTA et, de ce fait, que la tVTA appartient à la VTA.

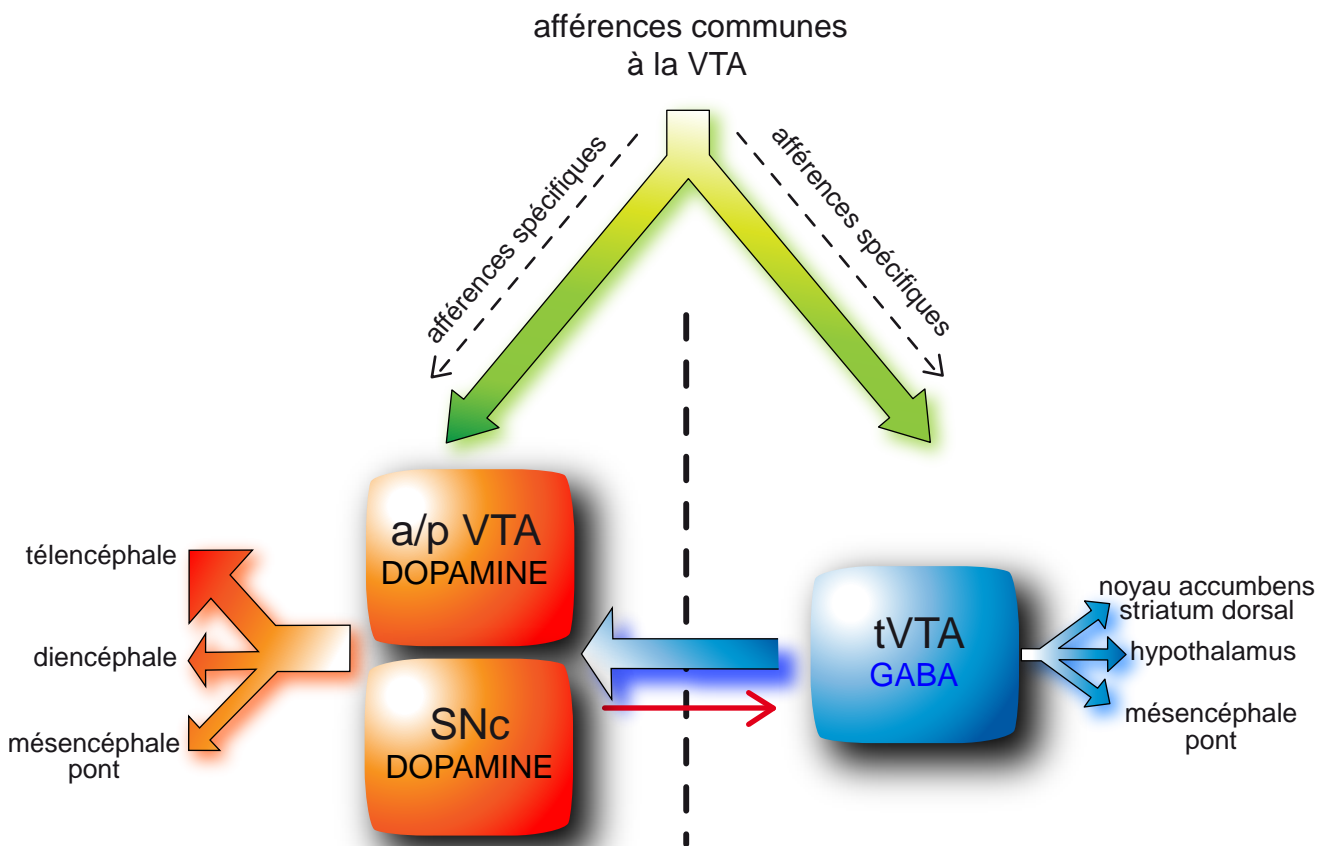


Figure 10 : La tVTA, un centre de contrôle de l'activité dopaminergique des aires A9/A10 ?

Nous avons montré que la tVTA reçoit de nombreuses afférences communes à celles du reste de la VTA, mais que ses afférences sont plus limitées. La tVTA, principalement GABAergique, projette massivement sur les parties antérieure et postérieure de la VTA et sur la substance noire compacte. Ces régions sont principalement dopaminergiques et constituent respectivement les aires A10 et A9. Nos résultats suggèrent que la tVTA pourrait être un centre de contrôle GABAergique de l'activité dopaminergique.

B) Communication GABAergique vs. monoaminergique

Si la tVTA et l'a/pVTA reçoivent des informations issues des mêmes régions, des différences existent cependant quant à la nature neurochimique de certaines de ces afférences. C'est notamment le cas pour celles issues de deux régions principalement monoaminergiques : le raphé dorsal (DR), riche en neurones sérotonergiques et le locus cœruleus, riche en neurones noradrénergiques. Contrairement aux afférences de ces deux régions sur l'a/pVTA (Hervé et al., 1987 ; Grenhoff et al., 1993 ; Kalivas, 1993), celles sur la tVTA ne sont pas monoaminergiques (Chapitre 1 des résultats). De façon intéressante, nous avons également observé que les neurones de ces 2 régions projetant à la tVTA sont localisés « en bordure de structure », c'est-à-dire dans la région péri-raphé adjacente aux neurones sérotonergiques, et péri-cœruléaire, adjacente aux neurones noradrénergiques. A partir de ces données, on peut supposer qu'une communication pourrait exister entre les interneurons GABAergiques bordant les régions monoaminergiques. Cela impliquerait que les entrées du DR et du locus cœruleus à la tVTA soient GABAergiques. Lors de mon doctorat, j'ai tenté de vérifier cette hypothèse, mais l'identification des neurones GAD 67-positifs par immunofluorescence s'est révélée difficile dans le raphé dorsal et le locus cœruleus. Contrairement à la tVTA, la population neuronale de ces deux régions est très dense, ce qui ne permet plus de différencier les corps cellulaires GABAergiques des fibres environnantes. Cependant, des travaux antérieurs ont déjà établi que la population majoritaire de la région péri-cœruléaire est bien GABAergique (Ijima et Ohtomo, 1998 ; Aston-Jones et al., 2004).

Mon hypothèse est donc la suivante (Figure 11). Les neurones sérotonergiques du DR et noradrénergiques du locus cœruleus sont connus pour projeter aux neurones dopaminergiques de l'a/pVTA (Hervé et al., 1987 ; Grenhoff et al., 1993 ; Gervias et Rouillard, 2000 ; Mejías-Aponte et al., 2009), constituant une voie de communication monoaminergique. En bordure de chacune de ces trois régions, des populations d'interneurones GABAergiques contrôleraient les neurones monoaminergiques locaux, constituant un contrôle inhibiteur intrarégional. De plus, les interneurons GABAergiques bordant les régions aminergiques du raphé dorsal et du locus cœruleus projetteraient sur la tVTA, la région comprenant les interneurons GABAergiques périphériques de la VTA. Ceci constituerait une voie de communication GABAergique parallèle à la communication monoaminergique. Elle pourrait constituer le substrat neuroanatomique d'un second niveau de régulation des neurones dopaminergiques de la VTA. Cette hypothèse encore très spéculative reste toutefois à tester.

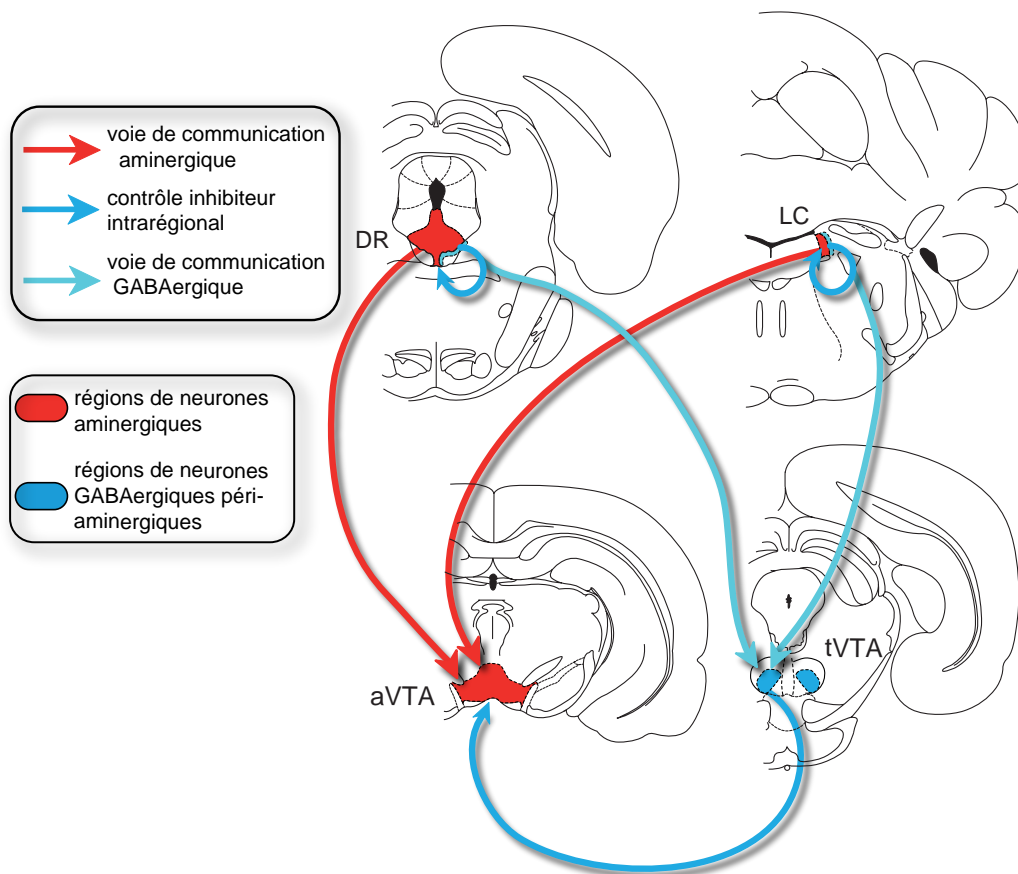


Figure 11 : Une communication GABAergique en parallèle d'une communication aminergique. Les neurones sérotonergiques et noradrénergiques projettent sur les neurones dopaminergiques de l'a/pVTA constituant une voie de communication aminergique (flèches rouges). Les neurones GABAergiques présents en bordure des neurones aminergiques pour le locus coeruleus (zone GABAergique péri-coeruléaire), le raphé dorsal (zone GABAergique péri-raphé) et la VTA (tVTA) projetteraient sur les neurones aminergiques de leurs régions respectives. Ces projections constitueraient des contrôles inhibiteurs intra-régionaux (flèches bleu clair). De plus, les neurones de la zone péri-coeruléaire et de la zone péri-raphé projettent sur les neurones GABAergiques de la tVTA constituant une voie de communication GABAergique (flèches bleu foncé).

C) La tVTA comme « sur-contrôleur » de la VTA, et l'hypothèse phylogénique de la tVTA

Comme décrit dans l'introduction, (partie II D) les neurones dopaminergiques de la VTA sont connus pour être sous le contrôle des interneurons GABAergiques intra a/pVTA. Ces deux populations neuronales sont en outre contrôlées par les neurones GABAergiques de la tVTA. Ainsi, la tVTA serait un sur-contrôleur de ce système.

J'émetts l'hypothèse que la mise en place de ce sur-contrôleur pourrait être plus tardive dans l'échelle phylogénique. A l'heure actuelle, des études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence la tVTA chez la souris C57BL/6J mais aucune donnée n'existe à ma connaissance pour d'autres espèces. Cette hypothèse, très préliminaire, nécessite l'identification de la tVTA chez des espèces plus anciennes au plan phylogénique, comme des amphibiens ou des poissons. Un autre point intéressant serait l'identification de la tVTA chez les primates dont l'homme.

Finalement cette hypothèse de l'apparition plus tardive de la tVTA, après l'a/pVTA, au cours de l'évolution phylogénique pourrait avoir son pendant ontogénique. Si comme l'a dit Ernst Haeckel en 1866, " l'ontogénie récapitule la phylogénie " l'étude de la localisation de la tVTA chez le rat à différents stades de développement serait particulièrement intéressante.

V) Perspectives

La tVTA est une région découverte récemment et peu de groupes de recherche se sont penchés sur son organisation et son ou ses rôles potentiels. L'étude de cette région ouvre néanmoins de nombreuses perspectives. En plus de celles déjà évoquées dans la discussion générale, je souhaiterais développer un peu plus en détail deux projets.

Le premier concerne la continuité directe de mon travail de thèse. Il porte sur la caractérisation des neurones GABAergiques de la tVTA et sur l'implication de la tVTA dans la dépendance aux psychostimulants. En effet, je souhaite d'une part définir les caractéristiques électrophysiologiques des neurones GABAergiques de la tVTA, ce qui permettrait de les comparer à celles des interneurons GABAergiques intra-a/pVTA. Des injections microiontophorétiques de différents agonistes et antagonistes pendant l'enregistrement des neurones GABAergiques de la tVTA permettraient aussi d'identifier les récepteurs portés par ces cellules. D'autre part, comme déjà évoqué dans la discussion, j'aimerais étudier les conséquences comportementales de lésions bilatérales de la tVTA sur des paramètres liés à la dépendance aux psychostimulants, cela en utilisant la préférence de place conditionnée et l'autoadministration intraveineuse. Ces perspectives constituent, pour partie, mon projet postdoctoral que je vais réaliser au sein du laboratoire de Gary Aston Jones, directeur de l'équipe Neuromodulation & Behavior de la Medical University of South Carolina (MUSC) à Charleston aux Etats-Unis.

Le second projet que j'aimerais aborder concerne la continuité des recherches sur la tVTA menée dans mon laboratoire actuel. Ce travail fait partie du projet de thèse de Romain Bourdy et porte sur l'étude de la projection de la tVTA sur la substance noire compacte. Les études en cours portent sur les conséquences de lésions unilatérales de la tVTA sur le comportement de rotation induit par les psychostimulants. En parallèle des études comportementales, des travaux de traçages visent à identifier les appositions des projections des neurones GABAergiques de la tVTA sur les neurones dopaminergiques de la SNC projetant au striatum dorsal. Cette étude doit être associée à la mesure des taux de dopamine extracellulaire dans le striatum dorsal par microdialyse lors de manipulations de la tVTA.

REFERENCES

A

Adell A, Artigas F (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 28:415-431.

Aghajanian GK, Bunney BS (1973) Central dopaminergic neurons - neurophysiological identification and responses to drugs. *Life Sci* 13:643-648.

Albanese A, Minciacchi D (1983) Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 216:406-420.

Alibhai IN, Green TA, Potashkin JA, Nestler EJ (2007) Regulation of fosB and DeltafosB mRNA expression: in vivo and in vitro studies. *Brain Res* 1143:22-33.

Andersson M, Westin JE, Cenci MA (2003) Time course of striatal DeltaFosB-like immunoreactivity and prodynorphin mRNA levels after discontinuation of chronic dopaminomimetic treatment. *Eur J Neurosci* 17:661-666.

Araki M, McGeer PL, Kimura H (1988) The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res* 441:319-330.

Arnt J, Scheel-Krüger J (1979) GABA in the ventral tegmental area: differential regional effects on locomotion, aggression and food intake after microinjection of GABA agonists and antagonists. *Life Sci* 25:1351-1360.

Atkins JB, Chlan-Fourney J, Nye HE, Hiroi N, Carlezon WA Jr, Nestler EJ (1999) Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs. *Synapse* 33:118-128.

Au-Young SM, Shen H, Yang CR (1999) Medial prefrontal cortical output neurons to the ventral tegmental area (VTA) and their responses to burst-patterned stimulation of the VTA: neuroanatomical and in vivo electrophysiological analyses. *Synapse* 34:245-255.

B

Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR (2007) Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 503:668-684.

Balcita-Pedicino J, Omelchenco R, Bell R, Sesack SR (2009) The rostromedial mesopontine tegmentum as a relay between the lateral habenula and dopamine neurons in the ventral tegmental area: Ultrastructural evidence in the rat. National congress of the American society of neuroscience, poster 817.7.

Barone FC, Wayner MJ, Scharoun SL, Guevara-Aguilar R, Aguilar-Baturoni HU (1981) Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res Bull* 7:75-88.

Bayer VE, Pickel VM (1991) GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* 559:44-55.

Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175:191-217.

Berendse HW, Groenewegen HJ, Lohman AH (1992) Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *J Neurosci* 12:2079-2103.

Bjijou Y, Stinus L, Le Moal M, Cador M (1996) Evidence for selective involvement of dopamine D1 receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 277:1177-1187.

Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.

Black MD, Crossman AR (1992) Changes in dopamine D1 and D2 receptor binding in the substantia nigra following intrastriatal injection of a retrograde neurotoxin (volkensin). *Neurosci Lett* 134:180-182.

Bolaños CA, Perrotti LI, Edwards S, Eisch AJ, Barrot M, Olson VG, Russell DS, Neve RL, Nestler EJ (2003) Phospholipase C gamma in distinct regions of the ventral tegmental area differentially modulates mood-related behaviors. *J Neurosci* 23:7569-7576.

Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC (1987) A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [¹²⁵I]iodosulpride. *Neuroscience* 20:117-155.

Bozarth MA, Wise RA (1981) Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci* 28:551-555.

Bunney BS, Aghajanian GK (1976) Dopaminergic influence in the basal ganglia: evidence for striatonigral feedback regulation. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 55:249-267.

Bunney EB, Appel SB, Brodie MS (2001) Electrophysiological effects of cocaethylene, cocaine, and ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 May;297(2):696-703.

C

Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, Willis WD (1995) The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. *J Comp Neurol* 351:585-601.

Cameron DL, Williams JT (1993) Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366:344-347.

- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360:213-245.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* 25:3009-3019.
- Carlezon WA Jr, Haile CN, Coppersmith R, Hayashi Y, Malinow R, Neve RL, Nestler EJ (2000) Distinct sites of opiate reward and aversion within the midbrain identified using a herpes simplex virus vector expressing GluR1. *J Neurosci* 20:RC62.
- Carlsson A, Falck B, Hillarp NA (1962) Cellular localization of the brain monoamines, *Acta Physiol Scand* 196:1-28.
- Carr DB, Sesack SR (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20:3864-3873.
- Carter DA, Fibiger HC (1977) Ascending projections of presumed dopamine-containing neurons in the ventral tegmentum of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase. *Neuroscience* 2:569-576.
- Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ (1986) Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 246:478-499.
- Castaldi L (1923) Studi sulla struttura e sullo sviluppo del mesencefalo. I ricerche in *Cavia cobaya*, *Arch Ital Anat Embriol* 20:23-225.
- Chang HT, Kuo H, Whittaker JA, Cooper NGF (1990) Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold: notes on the application of antibodies to Fluoro-Gold. *J Neurosci Meth* 35:31-37.
- Chao J, Nestler EJ (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113-132.
- Charara A, Smith Y, Parent A (1996) Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labelling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 364:254-266.
- Chen A, Aston-Jones G (1998) Axonal collateral-collateral transport of tract tracers in brain neurons: False anterograde labeling and useful tool. *Neuroscience* 82:1151-1163.
- Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17:4933-4941.

Chen JF, Qin ZH, Szele F, Bai G, Weiss B (1991) Neuronal localization and modulation of the D2 dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6-hydroxydopamine. *Neuropharmacology* 30:927-941.

Chen Y, Phillips K, Minton G, Sher E (2005) GABA(B) receptor modulators potentiate baclofen-induced depression of dopamine neuron activity in the rat ventral tegmental area. *Br J Pharmacol* 144:926-932.

Chiba T, Murata Y (1985) Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res Bull* 14:261-272.

Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS (1986) Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6:613-619.

Coizet V, Comoli E, Westby GW, Redgrave P (2003) Phasic activation of substantia nigra and the ventral tegmental area by chemical stimulation of the superior colliculus: an electrophysiological investigation in the rat. *Eur J Neurosci* 17:28-40.

Conrad LC, Leonard CM, Pfaff DW (1974) Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol* 156:179-205.

Conrad LC, Pfaff DW (1976a) Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol* 169:185-219.

Conrad LC, Pfaff DW (1976b) Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J Comp Neurol* 169:221-261.

Cornwall J, Phillipson OT (1988) Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport--I. The mediodorsal nucleus. *Neuroscience* 24:1035-1049.

Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271-284.

Cruz HG, Ivanova T, Lunn ML, Stoffel M, Slesinger PA, Lüscher C (2004) Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci* 7:153-159.

D

Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ Jr (1990) Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. *Brain Res* 533:329-333.

Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* S 232:1-55.

David V, Segu L, Buhot MC, Ichaye M, Cazala P (2004) Rewarding effects elicited by cocaine microinjections into the ventral tegmental area of C57BL/6 mice: involvement of dopamine D(1) and serotonin(1B) receptors. *Psychopharmacology* 174:367-375.

Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D (2003) D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* 23:5693-5697.

Devine DP, Wise RA (1994) Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14:1978-1984.

Ding ZM, Toalston JE, Oster SM, McBride WJ, Rodd ZA (2009a) Involvement of local serotonin-2A but not serotonin-1B receptors in the reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 204:381-390.

Ding ZM, Liu W, Engleman EA, Rodd ZA, McBride WJ (2009b) Differential effects of dopamine D2 and GABA(A) receptor antagonists on dopamine neurons between the anterior and posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 92:404-412.

Dong HW, Swanson LW (2006a) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. *J Comp Neurol* 494:108-141.

Dong HW, Swanson LW (2006b) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol* 494:142-178.

Duva MA, Tomkins EM, Moranda LM, Kaplan R, Sukhaseum A, Stanley BG (2005) Origins of lateral hypothalamic afferents associated with N-methyl-d-aspartic acid elicited eating studied using reverse microdialysis of NMDA and Fluorogold. *Neurosci Res* 52:95-106.

E

Einhorn LC, Johansen PA, White FJ (1988) Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: studies in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 8:100-112.

Erhardt S, Mathé JM, Chergui K, Engberg G, Svensson TH (2002) ABA(B) receptor-mediated modulation of the firing pattern of ventral tegmental area dopamine neurons in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:173-180.

F

Fadel J, Deutch AY (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111:379-387.

Fallon JH, Moore RY (1978a) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-580.

Fallon JH, Riley JN, Sipe JC, Moore RY (1978a) The islands of Calleja: organization and connections. *J Comp Neurol* 181:375-395.

Fallon JH, Koziell DA, Moore RY (1978b) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 180:509-532.

Fallon JH, Loughlin SE (1987) Monoamine innervation of cerebral cortex and a theory of the role of monoamines in cerebral cortex and basal ganglia. In: *Cerebral Cortex* (Eds. Jones EG, Peters A). Plenum, New York. 27-41.

Fallon JH, Loughlin SE (1995) Substantia nigra. In: *The rat nervous system*, 2nd edition (Ed. Paxinos G). Academic press, SanDiego. 215-238.

Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 154:261-274.

Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968-973.

Fritsch B (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Meth* 50:95-103.

G

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145-177.

Gao C, Wolf ME (2007) Dopamine alters AMPA receptor synaptic expression and subunit composition in dopamine neurons of the ventral tegmental area cultured with prefrontal cortex neurons *J Neurosci* 27:14275-1485.

Gatto GJ, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK (1994) Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* 11:557-564.

Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490:270-294.

Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27:5730-5743.

Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS (2008) Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine.. *Neuropsychopharmacology* 33:2688-2700.

Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173-5187.

German DC, Manaye KF (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* 331:297-309.

Gervais J, Rouillard C (2000) Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Synapse* 35:281-291.

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

Gonzales C, Chesselet MF (1990) Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 297:182-200.

Grace AA, Bunney BS (1980) Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-dopa injection and histofluorescence. *Science* 210:654-656.

Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10:301-315.

Grace AA, Bunney BS (1985) Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 333:271-284.

Grace AA, Onn SP (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9:3463-3481.

Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6912-6916.

Grenhoff J, Nisell M, Ferré S, Aston-Jones G, Svensson TH (1993) Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 93:11-25.

Groenewegen HJ, Berendse HW, Haber SN (1993) Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 57:113-142.

Guyenet PG, Aghajanian GK (1978) Antidromic identification of dopaminergic and other output neurons of the rat substantia nigra. *Brain Res* 150:69-84.

H

Haber SN, Ryoo H, Cox C, Lu W (1995) Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 362:400-410.

- Haber SN, Fudge JL (1997) The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* 11:323-342.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369-2382.
- Haglund L, Köhler C, Ross SB, Kelder D (1979) Forebrain projections of the ventral tegmentum as studied by axonal transport of [3H]dopamine in the rat. *Neurosci Lett* 12:301-306.
- Halliday GM, Törk I (1986) Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. *J Comp Neurol* 252:423-445.
- Harris HW, Nestler EJ (1996) Immunohistochemical studies of mesolimbic dopaminergic neurons in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 706:1-12.
- Hassani OK, François C, Yelnik J, Féger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749:88-94.
- Hassler R, (1937) Zur pathologie der paralysis agitans und des postenkephalitischer parkinsonismus. *J psychol Neurol* 48: 387-476.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454:15-33.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125.
- Herkenham M, Nauta WJ (1977) 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.
- Herkenham M, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 187:19-47.
- Hervé D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A (1987) Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res* 435:71-83.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123:983-1002.
- Hiroi N, Graybiel AM (1996) Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol* 374:70-83.

Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10397-10402.

Hiroi N, Marek GJ, Brown JR, Ye H, Saudou F, Vaidya VA, Duman RS, Greenberg ME Nestler EJ (1998) Essential role of the fosB gene in molecular, cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 18:6952-6962.

Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225:1326-1334.

Hong S, Hikosaka O (2008) The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* 60:720-729.

Hong S, Hikosaka O (2009) Negative reward signals from lateral habenula to dopamine neurons are mediated by a group of medial mesopontine neurons. National congress of the American society of neuroscience. Poster 482.6.

Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci* 89:5764-5768.

Hope BT, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ (1994a) Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a longlasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14:4318-4328.

Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994b) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-1244.

Horowitz JM, DiPirro JM, Kristal MB, Torres G (1997) Dopaminergic and glutamatergic mechanisms mediate the induction of FOS-like protein by cocaethylene. *Brain Res Bull* 42:393-398.

I

Ikai Y, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N (1992) Dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 51:719-728.

Ikemoto S (2004) Unconditional hyperactivity and transient reinforcing effects of NMDA administration into the ventral tegmental area in rats. *Psychopharmacology* 172:202-210.

Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27-78.

Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ (1997) Self-infusion of GABA(A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. *Behav Neurosci* 111:369-380.

Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ (1998) Regional differences within the rat ventral tegmental area for muscimol self-infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 61:87-92.

Ikemoto S, Wise RA (2002) Rewarding effects of the cholinergic agents carbachol and neostigmine in the posterior ventral tegmental area. *J Neurosci* 22:9895-9904.

Ikemoto S, Wise RA (2004) Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology Suppl* 1:190-201.

Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006) Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26:723-730.

J

Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009a) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513:566-596.

Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009b) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61:786-800.

Ji H, Shepard PD (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27:6923-6930.

Johnson SW, North RA (1992) Two types of neurons in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450:455-468.

Jones BE, Yang TZ (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242:56-92.

K

Kalén P, Karlson M, Wiklund L (1985) Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[³H]aspartate tracing. *Brain Res* 360:285-297.

Kalén P, Skagerberg G, Lindvall O (1988) Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component. *Exp Brain Res* 73:69-77.

Kalivas PW (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Rev* 18:75-113.

Kalivas PW, Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5379-5388.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993) GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 57:1047-1060.

Kaneko T, Saeki K, Lee T, Mizuno N (1996) Improved retrograde axonal transport and subsequent visualization of tetramethylrhodamine (TMR)-dextran amine by means of an acidic injection vehicle and antibodies against TMR. *J Neurosci Meth* 65:157-165.

Kauffling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597-621.

Kauffling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Gamma-Aminobutyric Acid Cells with Cocaine-Induced DeltaFosB in the Ventral Tegmental Area Innervate Mesolimbic Neurons. *Biol Psychiatry* 67:88-92.

Kelland MD, Freeman AS, Rubin J, Chiodo LA (1993) Ascending afferent regulation of rat midbrain dopamine neurons. *Brain Res Bull* 31:539-546.

Kelz MB, Chen J, Carlezon WA Jr, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272-276.

Kim U (2009) Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat. *J Comp Neurol* 513:173-187.

Kirouac GJ, Pittman QJ (2000) A projection from the ventral tegmental area to the periaqueductal gray involved in cardiovascular regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1643-1650.

Kirouac GJ, Li S, Mabrouk G (2004) GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 469:170-184.

Klitenick MA, Deutch AY, Churchill L, Kalivas PW (1992) Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. *Neuroscience* 50:371-386.

Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327-351.

Koob GF, Le Moal M (2008a) Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59:29-53.

Koob GF, Le Moal M (2008b) Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3113-3123.

Kontkanen O, Toronen P, Lasko M, Wong G, Castren E (2002) Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *J Neurochem* 83:1043-1053.

Korotkova TM, Ponomarenko AA, Brown RE, Haas HL (2004) Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons. *Mol Neurobiol* 29:243-259.

Kosaka K, Hiraiwa K (1915) Zur anatomie der sehnervenbahn und ihrer zentren. *Folia Neurobiol (leipzig)* 9:367.

Krieger MS, Conrad LC, Pfaff DW (1979) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 183:785-815.

L

Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416.

Lecourtier L, DeFrancesco A, Moghaddam B (2008) Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *Eur J Neurosci* 27:1755-1762.

Lee DY, Guttilla M, Fung KD, McFeron S, Yan J, Ranaldi R (2007) Rostral-caudal differences in the effects of intra-VTA muscimol on cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 86:542-549.

Leontovich TA, Zhukova GP (1963) The specificity of the neuronal structure and topography of the reticular formation in the brain and spinal cord of carnivora. *J Comp Neurol* 121:347-379.

Le Moal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71:155-234.

Li YQ, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N (1993) The sites of origin of dopaminergic afferent fibers to the lateral habenular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 333:118-133.

Liu J, Nickolenko J, Sharp FR (1994) Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:8537-8541.

Liu W, Thielen RJ, Rodd ZA, McBride WJ (2006) Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 40:167-176.

Lodge DJ, Grace AA (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci* 103:5167-5172.

Lu XY, Churchill L, Kalivas PW (1997) Expression of D1 receptor mRNA in projections from the forebrain to the ventral tegmental area. *Synapse* 25:205-214.

Luo AH, Aston-Jones G (2009) Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: a novel circadian output pathway. *Eur J Neurosci* 29:748-760.

M

Mansour A, Meador-Woodruff JH, Zhou Q, Civelli O, Akil H and Watson SJ (1992) A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 46:959-971.

Mantz J, Thierry AM, Glowinski J (1989) Effect of noxious tail pinch on the discharge rate of mesocortical and mesolimbic dopamine neurons: selective activation of the mesocortical system. *Brain Res* 476:377-381.

Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL (2003) Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23:9981-9986.

Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL (2006) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* 577:907-924.

Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ (2006) Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:79-97.

Matsuda Y, Fujimura K (1992) Action of habenular efferents on ventral tegmental area neurons studied in vitro. *Brain Res Bull* 28:743-749

Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111-1115.

McClung CA, Ulerly PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 132:146-154.

McHaffie JG, Jiang H, May PJ, Coizet V, Overton PG, Stein BE, Redgrave P (2006) A direct projection from superior colliculus to substantia nigra pars compacta in the cat. *Neuroscience* 138:221-234.

McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol* 480:115-142.

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H, Civelli O, Watson SJ Jr (1991) Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5:231-242.

Medina L, Veenman CL, Reiner A (1997) Evidence for a possible avian dorsal thalamic region comparable to the mammalian ventral anterior, ventral lateral and oral ventroposterolateral nuclei. *J Comp Neurol* 384:86-108.

Mejías-Aponte CA, Drouin C, Aston-Jones G (2009) Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: prominent inputs from medullary homeostatic centers. *J Neurosci* 29:3613-3626.

Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 7:462-469.

Miller SM, Lonstein JS (2009) Dopaminergic projections to the medial preoptic area of postpartum rats. *Neuroscience* 159:1384-1396.

Montagu KA (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180:244-245.

Mooney KE, Inokuchi A, Snow JB Jr, Kimmelman CP (1987) Projections from the ventral tegmental area to the olfactory tubercle in the rat. *Otolaryngol Head Neck Surg* 96:151-157.

Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM (1996) Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17:147-156.

N

Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024-1031.

Nauta WJ (1958) Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain* 81:319-340.

Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201-217.

Nestler EJ (2009) transcriptional mechanism of addiction: role of deltaFosB. *Phil Trans R Soc* 363:3245-3255.

Nestler EJ (2009) Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. National congress of the American society of neuroscience, Spetial lecture 791.

Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci* 98:11042-11046.

Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59:1151-1159.

Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J (2002) $I(h)$ channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22:1290-1302.

Nye HE, Hope BT, Kelz MB, Iadarola MJ, Nestler EJ (1995) Pharmacological studies of the regulation of chronic FOS-related antigen induction by cocaine in the striatum and ucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1671-1680.

Nye HE, Nestler EJ (1996) Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* 49:636-645.

O

Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.

Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK (1995) Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5859-5869.

Ohara PT, Granato A, Moallem TM, Wang BR, Tillet Y, Jasmin L (2003) Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J Neurocytol* 32:131-141.

Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ, Hughes T, Self DW, Neve RL, Nestler EJ (2005) Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 25:5553-5562.

Omelchenko N, Sesack SR (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483:217-235.

Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87-95.

Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009a) Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 30:1239-1250.

Omelchenko N, Sesack SR (2009b) Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 63:895-906.

Ornstein K, Milon H, McRae-Degueurce A, Alvarez C, Berger B, Würzner HP (1987) Biochemical and radioautographic evidence for dopaminergic afferents of the locus coeruleus originating in the ventral tegmental area. *J Neural Transm* 70:183-191.

P

Paladini CA, Tepper JM (1999) GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* 32:165-76.

Pang Y, Kiba H, Jayaraman A (1993) Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Mol Brain Res* 20:162-170.

Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th edition (San Diego, CA: Academic Press).

Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edition (San Diego, CA: Academic Press).

Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004) Induction of DeltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24:10594-10602.

Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M (2005) DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817-2824.

Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthall W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, Sim-Selley L, Bachtell RK, Self DW, Nestler EJ (2008) Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* 62:358-369.

Perugini M, Vezina P (1994) Amphetamine administered to the ventral tegmental area sensitizes rats to the locomotor effects of nucleus accumbens amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 270:690-696.

Phillipson OT (1979a) The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187:85-98.

Phillipson OT (1979b) A golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 187:99-115.

Phillipson OT (1979c) Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and intrerfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187:116-143.

Phillipson OT, Pycocck CJ (1982) Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. Some implications for habenular function. *Exp Brain Res* 45:89-94.

Phillipson OT, Griffiths AC (1985) The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 16:275-296.

Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275:83-86.

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 Meth* 65:113-136.

Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM (1992) Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 49:857-865.

Pucak ML, Grace AA (1994) Evidence that systemically administered dopamine antagonists activate dopamine neuron firing primarily by blockade of somatodendritic autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1181-1192.

R

Ramon-Moliner E, Nauta WJH (1966) The isodendritic core of the brainstem. *J Comp Neurol* 126:311-366.

Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103:23-37.

Reynolds SM, Geisler S, Béroud A, Zahm DS (2006) Neurotensin antagonist acutely and robustly attenuates locomotion that accompanies stimulation of a neurotensin-containing pathway from rostromedial forebrain to the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 24:188-196.

Ricardo JA (1981) Efferent connections of the subthalamic region in the rat. II. The zona incerta. *Brain Res* 214:43-60.

Sharp FR, Liu J, Nickolenko J, Bontempi B (1995) NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. *Behav Brain Res* 66:225-230.

Risold PY, Canteras NS, Swanson LW (1994) Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348:1-40.

Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-236.

Rodaros D, Caruana DA, Amir S, Stewart J (2007) Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 150:8-13.

Rodd ZA, Melendez RI, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ (2004) Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons. *J Neurosci* 24:1050-1057.

Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ (2005) Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 313:134-145.

Rodd ZA, Gryszowka VE, Toalston JE, Oster SM, Ji D, Bell RL, McBride WJ (2007) The reinforcing actions of a serotonin-3 receptor agonist within the ventral tegmental area: evidence for subregional and genetic differences and involvement of dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1003-1012.

Rodd ZA, Oster SM, Ding ZM, Toalston JE, Deehan G, Bell RL, Li TK, McBride WJ (2008) The reinforcing properties of salsolinol in the ventral tegmental area: evidence for regional

heterogeneity and the involvement of serotonin and dopamine. *Alcohol Clin Exp Res* 32:230-239.

Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000) Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 149:217-224.

Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:55-64.

Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Melendez RI, Berry N, Murphy JM, McBride WJ (2003) Effects of serotonin-3 receptor antagonists on the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of Wistar rats. *Psychopharmacology* 165:252-259.

Rodriguez JJ, Garcia DR, Nakabeppu Y, Pickel VM (2001a) Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration. *Exp Neurol* 168:392-401.

Rodriguez JJ, Garcia DR, Nakabeppu Y, Pickel VM (2001b) FosB in rat striatum: normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. *Synapse* 39:122-132.

Roeling TA, Veening JG, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R (1993) Efferent connections of the hypothalamic "grooming area" in the rat. *Neuroscience* 56:199-225.

S

Santiago AC, Shammah-Lagnado SJ (2005) Afferent connections of the amygdalopiriform transition area in the rat. *J Comp Neurol* 489:349-371.

Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169:409-442.

Saper CB, Loewy AD (1980) Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 197:291-317

Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB (2000) Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20:8620-8628.

Scarnati E, Campana E, Pacitti C (1984) Pedunculo-pontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat. *Brain Res* 1984 304:351-61.

Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S (1980) Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neurosci Lett* 18:125-131.

Scheibel ME, Scheibel AB (1958) Structural substrates for integrative patterns in the brainstem reticular core. In: Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC, Costello RT, editors. *Reticular formation of the brain*. Boston: Little Brown p 31-55.

- Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377:147-154.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Schultz W (2006) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57:87-115.
- Schultz W (2007a) Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 30:203-10.
- Schultz W (2007b) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30:259-288.
- Schultz W, Romo R (1987) Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *J Neurophysiol* 57:201-217.
- Seabrook GR, Howson W, Lacey MG (1990) Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 101:949-957.
- Sesack SR, Aoki C, Pickel VM (1994) Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14:88-106.
- Sesack SR, Carr DB (2002) Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 77:513-517.
- Shabat-Simon M, Levy D, Amir A, Rehavi M, Zangen A (2008) Dissociation between rewarding and psychomotor effects of opiates: differential roles for glutamate receptors within anterior and posterior portions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 28:8406-8416.
- Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L (1999) Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostriatal transition area in the rat. *Neuroscience* 94:1097-1123.
- Shammah-Lagnado SJ, Beltramino CA, McDonald AJ, Miselis RR, Yang M, de Olmos J, Heimer L, Alheid GF (2000) Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J Comp Neurol* 422:533-555.
- Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L (2001) Striatal and central extended amygdala parts of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure: evidence from tract-tracing techniques in the rat. *J Comp Neurol* 439:104-126.
- Shin JW, Geerling JC, Loewy AD (2008) Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 511:628-657.

Simerly RB, Swanson LW (1988) Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270:209-242.

Simon H, Le Moal M, Calas A (1979a) Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of [³H]leucine and horseradish peroxidase. *Brain Res* 178:17-40.

Simon H, Le Moal M, Stinus L, Calas A (1979b) Anatomical relationships between the ventral mesencephalic tegmentum--a 10 region and the locus coeruleus as demonstrated by anterograde and retrograde tracing techniques. *J Neural Transm* 44:77-86.

Simon H, Le Moal M (1988) Mesencephalic dopaminergic neurons: role in the general economy of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 537:235-253.

Singer W, Holländer H, Vanegas H (1977) Decreased peroxidase labeling of lateral geniculate neurons following deafferentation. *Brain Res* 120:133-137.

Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259-265.

Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2009) Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 29:1735-1742.

Sugimoto T, Hattori T (1984) Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects. *Neuroscience* 11:931-946.

Sugita S, Johnson SW, North RA (1992) Synaptic inputs to GABA_A and GABA_B receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci Lett* 134:207-211.

Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321-353.

Swanson LW, Cowan WM (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* 186:621-655.

T

Tan Y, Brog JS, Williams ES, Zahm DS (1995) Morphometric analysis of ventral mesencephalic neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold following injections in the shell, core and rostral pole of the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 689:151-156.

Tokita K, Inoue T, Boughter JD Jr (2009) Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice. *Neuroscience* 161:475-488.

Tsai C (1925) The optic tracts and centers of the opossum, *didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* 39:173-219.

Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, Deisseroth K (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324:1080-1084.

Turner PT (1977) Effect of pentobarbital on uptake of horseradish peroxidase by rabbit cortical synapses. *Exp Neurol* 54:24-32.

U

Ulery PG, Rudenko G, Nestler EJ (2006) Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci* 26:5131-5142.

Ulery-Reynolds PG, Castillo MA, Vialou V, Russo SJ, Nestler EJ (2009) Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience* 158:369-72.

Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* 303:2040–2042.

Usuda I, Tanaka K, Chiba T (1998) Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Res* 797:73-93.

Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, Wree A (2006) Brain stem afferent connections of the amygdala in the rat with special references to a projection from the parabrachial nucleus: a fluorescent retrograde tracing study. *Anat Embryol (Berl)* 211:475-496.

V

Vahid-Ansari F, Nakabeppu Y, Robertson GS (1996) Contrasting effects of chronic clozapine, Seroquel (TM) (ICI 204,636) and haloperidol administration of deltaFosB-like immunoreactivity in the rodent forebrain. *Eur J Neurosci* 8:927-936.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151:99-120.

Veazey RB, Severin CM (1980) Efferent projections of the deep mesencephalic nucleus (pars medialis) in the rat. *J Comp Neurol* 190:245-258.

Veazey RB, Severin CM (1982) Afferent projections to the deep mesencephalic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 204:134-150.

Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-label studies. *J Neurosci Meth* 41:239-254.

Vertes RP (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643-668.

Vertes RP, Martin GF, Waltzer R (1986) An autoradiographic analysis of ascending projections from the medullary reticular formation in the rat. *Neuroscience* 19:873-898.

Vertes RP, Martin GF (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 275:511-541.

Vertes RP, Crane AM (1996) Descending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: Phaseolus vulgaris leucoagglutinin analysis in the rat. *J Comp Neurol* 374:607-631.

Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 407:555-582.

Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 499:768-796.

Vertes RP, Hoover WB (2008) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 508:212-237.

Von Krosigk M, Smith Y, Bolam JP, Smith AD (1992) Synaptic organization of GABAergic inputs from the striatum and the globus pallidus onto neurons in the substantia nigra and retrorubral field which project to the medullary reticular formation. *Neuroscience* 50:531-549.

W

Walaas I, Fonnum F (1980) Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 5:63-72.

Wamsley JK, Gehlert DR, Filloux FM, Dawson TM (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 2:119-137.

Waszczak BL, Eng N, Walters JR (1980) Effects of muscimol and picrotoxin on single unit activity of substantia nigra neurons. *Brain Res* 188:185-97.

Weil-Malherbe H, Bone AD (1957) Intracellular distribution of catecholamines in the brain. *Nature* 180:1050-1051.

Welzl H, Kuhn G, Huston JP (1989) Self-administration of small amounts of morphine through glass micropipettes into the ventral tegmental area of the rat. *Neuropharmacology* 28:1017-1023.

White FJ, Wang RY (1984) Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 231:275-280.

Wise RA (1988) The neurobiology of craving: implications for the understanding and treatment of addiction. *J Abnorm Psychol* 97:118-132.

Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6:243-251.

Y

Yim CY, Mogenson GJ (1980a) Electrophysiological studies of neurons in the ventral tegmental area of Tsai. *Brain Res* 181:301-313.

Yim CY, Mogenson GJ (1980b) Effect of picrotoxin and nipecotic acid on inhibitory response of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area to stimulation of the nucleus accumbens. *Brain Res* 199:466-473.

Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ (1991) Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1291-1295.

Z

Zahm DS (1989) The ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat--II. Compartmentation of ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 30:33-50.

Zahm DS, Heimer L (1993) Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol* 327:220-232.

Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002) Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22:7225-7233.

Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006) Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26:4901-4907.

Zhou L, Furuta T, Kaneko T (2003) Chemical organization of projection neurons in the rat accumbens nucleus and olfactory tubercle. *Neuroscience* 120:783-798.

RESUME

Les systèmes dopaminergiques (DA) mésencéphaliques jouent un rôle clé dans de nombreuses fonctions cérébrales. Leur dysfonctionnement est ainsi associé à diverses pathologies neurologiques, telle la maladie de Parkinson, ou psychiatriques, comme la dépendance, la schizophrénie ou certains troubles de l'humeur. Comprendre les mécanismes régulant l'activité de ces systèmes est donc crucial pour mieux aborder leurs dysfonctionnements et l'étiologie des pathologies associées. A l'origine de ces systèmes, se trouve notamment le groupe DA A10 dans l'aire tegmentale ventrale (VTA). Au début des années 2000, une nouvelle sous-région de la VTA a été identifiée, elle comprend le tiers postérieur de la structure et a été nommée tVTA. Essentiellement GABAergique, elle accumule le facteur de transcription DeltaFosB en réponse à la cocaïne ou aux amphétamines.

La tVTA ayant été découverte grâce à une plasticité moléculaire provoquée par des drogues, un criblage d'une vingtaine de molécules a été réalisé chez le rat pour évaluer leur capacité à exprimer FosB dans la tVTA. Les résultats montrent que l'induction de FosB dans la tVTA est spécifique aux psychostimulants et n'a lieu que dans les neurones GABAergiques. Cette induction est de plus dépendante du système dopaminergique. Notre travail a également permis de délimiter avec précision les frontières neuroanatomiques de la tVTA et d'analyser par des approches de traçage neuroanatomique les connexions de cette région. Les afférences sont essentiellement similaires à celles de la VTA, suggérant l'appartenance de la tVTA à la VTA. Par contre, les efférences sont plus restreintes. Nous observons que la tVTA projette majoritairement vers les groupes DA A9 et A10. Ces projections sont GABAergiques et forment des appositions avec les corps cellulaires des neurones DA de la VTA, notamment ceux projetant vers le noyau accumbens. Enfin, en utilisant une approche d'électrophysiologie *in vivo*, nous avons démontré que la stimulation de la tVTA inhibe les neurones DA de la VTA.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce doctorat ont permis de définir une nouvelle région cérébrale pouvant être un centre de contrôle des systèmes dopaminergiques. Cette découverte majeure devrait, dans les années à venir, déboucher sur de nombreuses études fonctionnelles pour comprendre comment la tVTA participe à la physiologie et aux pathologies des systèmes dopaminergiques.

Mots clés : aire tegmentale ventrale, dopamine, GABA, neuroanatomie, électrophysiologie.