



Electrophysiologie multi-site et optogénétique appliquées à l'étude de corrélats neurobiologiques de l'addiction à la cocaïne chez le rat se comportant

Jean-Francois Fiancette

► To cite this version:

Jean-Francois Fiancette. Electrophysiologie multi-site et optogénétique appliquées à l'étude de corrélats neurobiologiques de l'addiction à la cocaïne chez le rat se comportant. Neurobiologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0901 . tel-01689838

HAL Id: tel-01689838

<https://theses.hal.science/tel-01689838>

Submitted on 22 Jan 2018

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

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

**Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé
Spécialité Neurosciences**

Jean-François FIANCETTE

**ELECTROPHYSIOLOGIE MULTI-SITE ET OPTOGENETIQUE
APPLIQUEES A L'ETUDE DE CORRELATS NEUROBIOLOGIQUES DE
L'ADDICTION A LA COCAÏNE CHEZ LE RAT SE COMPORTANT**

Directrice de thèse : Véronique DEROCHE-GAMONET

Soutenue le 19 décembre 2017

Membres du jury

Mickaël NAASSILA (Président, rapporteur), Professeur des universités, Université de Picardie

Marcello SOLINAS (Rapporteur), Directeur de Recherche Inserm, Université de Poitiers

Stéphanie CAILLE-GARNIER (Examinatrice), Chargée de Recherche CNRS, Université de Bordeaux

Karine GUILLEM (Examinatrice), Chargée de Recherche CNRS, Université de Bordeaux

Cyril HERRY (invité), Directeur de Recherche INSERM, Université de Bordeaux

Cyril DEJEAN (invité), Chargé de Recherche INSERM, Université de Bordeaux

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Mickaël NAASSILA et au docteur Marcello SOLINAS de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse ainsi qu'au Docteur Stéphanie CAILLE-GARNIER et au docteur Karine GUILLEM d'en être examinatrices.

Un grand merci à toute l'équipe Piazza et à tous les membres qui la composent. Merci pour leur accueil il y a déjà 11 ans, et leur soutien au quotidien. Merci à ma directrice de thèse Véronique Deroche d'avoir accepté de me laisser soutenir ce travail de thèse.

Merci à la team Tronic, Bertrand, Nicolas, Julien, Alexandre, Richard, Kevin sans oublier Audrey la dernière arrivée, pour leur disponibilité et leur réactivité.

Un grand merci à la dream team Herry pour leur soutien et leurs conseils. Hélène W. Fabrice C. Un merci particulier à Cyril Dejean et au big Boss Cyril Herry. Grâce à eux j'ai pu mettre le 1/4 de la moitié du 1/3 du bout du petit orteil dans le monde merveilleux de l'électrophysiologie et c'est aussi grâce à eux bien sûr que la lumière bleue ou verte de l'optogénétique me sont apparues. Pas en continu bien sûr, il ne faut pas exagérer mais aux alentours 1Hz, on me voit, on me voit plus..... Merci à eux.

Une pensée toute particulière pour Jess, mon éternelle acolyte un grand merci à toi : ce ne doit pas être tous les jours faciles de me supporter et rien que pour ça tu le mérites ton prix Nobel, MERCI.

Merci à Amélie pour tout son travail, nos échanges, parce que les « chir » c'est plus facile à deux ; merci pour avoir été une oreille attentive et surtout compréhensive. Quand on vit les mêmes choses c'est plus facile à partager.

Je ne pourrais pas oublier Prikette, qui m'a sauvé la vie à son arrivée, avec qui j'ai partagé des lendemains de fêtes difficiles, auxquelles je n'étais pas invité d'ailleurs!!! l'humour un petit peu breton et ça tout le monde ne peut pas comprendre, sans oublier le petit passage aux urgences et les légendaires « il est où ??? » Partie aujourd'hui dans un pays où il fait froid, non d'un Karibou.

Une énorme pensée pour ma Citrouille pour ces moments passés à m'asseoir sur un banc, 5 minutes avec toi et regarder les gens devant « ce beau bâtiment » ; tu as cru plus en moi que jamais je ne pourrais le faire. Merci pour ton énergie, tes sourires et tes « fous » rires ; ... qui lézarde les murs... ; je les entends encore qui raisonnent parfois dans les couloirs.

Un grand merci aussi à Mimie l'optimiste, pour ces repas partagés au soleil....ou pas, merci pour ton soutien, tes encouragements, ta patience....

Une pensée toute particulière pour Bérengère à qui, je dis à la fois merci et pardon pour tout le temps que j'ai passé à me plaindre. Merci pour ton écoute, ton calme et ta Gentillesse.

Merci à Vernon et Maria, pour leur soutien leur regard avisé, leurs conseils et le temps qu'ils m'ont accordés lors de la préparation de ma soutenance.

Merci à Vanessa, tu as été un exemple pour moi ; bien que si j'avais su ;-)

Un gros clin d'œil à Cédric, merci.

Une pensée amicale à Françoise et un grand merci pour tous ses encouragements.

Des remerciements tout particulier à ma Pitite et à Coupinette ; vous étiez là au tout début, je suis tellement fier de vous, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour votre présence.

Pour n'oublier personne, je tiens à remercier tous ceux qui ont pu participer de près ou de loin à ce travail de thèse.

Merci à ma petite sœur que j'aime tant ; à Thomas et Anaël mes deux champions et à Tobaloph, le papa des champions!

Un énorme merci aussi à Dette et Jean-Luc pour tout, et notamment pour avoir gardé Noé pour que je puisse travailler.

Et puis avant de terminer ; Merci à toi Maman et à toi Papa sans vous rien n'aurait été possible, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, les concessions, les sacrifices Merci pour la confiance que vous m'avez accordé.

Et pour terminer ; merci à Hélène et Noé ; mes rayons de soleil. Merci pour votre patience, votre confiance, votre amour, et vos encouragements. Sans vous non plus, cela n'aurait sûrement pas été possible.

Angèle, Marie-Louise et Gilles ; c'est aussi pour vous et grâce à vous..... MERCI !

« Croire, Vouloir et Continuer... » Devise du Professeur Christian Cabrol.

RESUME

L'addiction se caractérise par une recherche et une consommation pathologiques de la drogue, maintenues malgré leurs conséquences néfastes. C'est une pathologie chronique car, le plus souvent, les tentatives de sevrage se soldent par une rechute.

L'addiction à la cocaïne se développe chez 15 à 20 % des usagers, après un usage plus ou moins prolongé. Les solutions thérapeutiques font gravement défaut et c'est un enjeu que de comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent cette addiction.

Les études cliniques et précliniques proposent que l'addiction résulte d'un déséquilibre entre les circuits cortico-subcorticaux qui gèrent la valeur motivationnelle de la drogue et ceux qui sont impliqués dans le contrôle cognitif inhibiteur. Des changements séquentiels dans des circuits interconnectés qui incluent notamment le noyau basolatéral de l'amygdale, le noyau accumbens et le cortex préfrontal seraient au cœur de processus motivationnels pathologiques et d'une difficulté à inhiber le « craving » et la consommation.

L'étude de l'addiction, à l'échelle des circuits neuronaux, fait face à plusieurs défis. Techniquement limitée chez l'homme, elle peut bénéficier des modèles animaux, mais seulement s'ils capturent des dimensions de la pathologie. Au cours des dix dernières années, de tels modèles ont été mis en œuvre, mais exclusivement chez le rat. Or, les outils pour l'exploration fonctionnelle fine des circuits neuronaux ont été majoritairement développés chez la souris. Un autre défi consiste à pouvoir questionner la fonctionnalité des circuits, en temps réel, sur l'individu se comportant.

Mes travaux de thèse ont eu pour objectif :

1. L'étude de marqueurs de connectivité fonctionnelle chez des rats *addicts* et des rats *non-addicts* à la cocaïne. Notre modèle d'addiction à la cocaïne permet d'identifier 15 à 20 % de rats qui, après une période prolongée d'auto-administration intraveineuse de cocaïne, et bien qu'ils aient consommé la même quantité de cocaïne que les autres, montrent une très forte motivation pour la substance, une difficulté à limiter la recherche de drogue, et maintiennent la prise de cocaïne malgré ses conséquences néfastes.

L'électrophysiologie *in vivo*, multi-site, au moyen d'enregistrements unitaires ou de potentiels de champ locaux est un outil de choix pour l'exploration de la connectivité fonctionnelle chez le rongeur. Un défi technique a été de l'adapter pour la coupler à notre modèle d'addiction à la cocaïne chez le rat. Nous avons montré des différences significatives de connectivité fonctionnelle entre rats *addicts* et *non-addicts*, suggérant un défaut de fonctionnalité du cortex préfrontal médian (PFM) chez les *addicts*.

2. L'étude du rôle du cortex prélimbique (PL) dans le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Des données récentes de la littérature remettent en

cause le dogme selon lequel le PL exerce exclusivement un rôle facilitateur sur les propriétés motivationnelles de la cocaïne. Nous avons cherché à clarifier le rôle du PL dans le comportement d'auto-administration de cocaïne avant que ne se développe une addiction : comprendre son rôle dans l'usage précoce de cocaïne pour, à terme, étudier l'évolution de son implication selon que l'individu développe ou non une addiction. Nous avons montré que l'inactivation du PL peut s'accompagner, chez le même individu, d'une diminution ou d'une exacerbation du comportement de recherche de cocaïne selon les contingences expérimentales. Les neurones du PL émettent des projections vers plusieurs structures. Pour étudier leur rôle dans les effets comportementaux observés, nous avons travaillé à la mise au point d'outils optogénétiques pour la manipulation de l'activité de voies neuronales spécifiques, chez le rat, pour lequel ils sont encore très peu développés.

Mes travaux de thèse contribuent tant sur le plan théorique que technique à la compréhension des mécanismes psychobiologiques de l'addiction à la cocaïne.

ABSTRACT

Drug addiction is characterized by pathological drug seeking and taking, maintained despite their negative consequences. This is a chronic pathology, withdrawal attempts being unsuccessful in most cases.

Cocaine addiction develops in about 15 to 20 % of habitual users. For cocaine, therapeutic options are lacking, which could be explained by the relatively poor understanding of the neurobiological mechanisms underlying cocaine addiction to date.

Clinical and preclinical studies propose that addiction results from an imbalance between the cortical-subcortical circuits that process motivational value of drug-related stimuli versus those involved in cognitive inhibitory control. Hierarchical sequential changes in distinct, but interconnected circuits, including the basolateral amygdala, the nucleus accumbens and the prefrontal cortex could be at the core of pathological incentive processes and difficulty to control craving and drug taking.

Studying addiction at the neuronal circuit level faces many challenges. Technically limited in humans, it can benefit from animal models, but only if they properly capture dimensions of the pathology. Over the last ten years, such models have been developed, but exclusively in rats. However, tools for a refined functional exploration of neuronal circuits have been established mostly in mice, and until recently they have begun to be explored in rats. In addition, another main challenge is the ability to investigate functional connectivity in real time in behaving animals.

My thesis work had two objectives:

1. Studying markers of functional connectivity in rats showing a cocaine addiction-like behavior (*Addict*) or not (*Non-addict*). Our model of cocaine addiction allows identifying 15-20% of rats that show a high motivation for cocaine, a difficulty to limit drug seeking and that maintain drug taking despite negative consequences. These extreme behaviors occur after prolonged cocaine self-administration and despite that these rats have used a comparable amount of cocaine as compared to the others.

In vivo, multi-site electrophysiology recordings, applied to single units or local field potentials, is a tool of choice for studying functional connectivity in rodents. A technical challenge has been to adapt and couple it to our model of cocaine addiction in the rat. We have evidenced significant differences in connectivity between *Addict* and *Non-addict* rats, which suggest a default of functionality of the medial prefrontal cortex in the *Addict* rats.

2. Studying the role of the prelimbic cortex (PL) in cocaine self-administration behavior in the rat. The canonical role of the PL in exclusively promoting drug seeking was recently questioned, with studies involving it also in inhibition of drug seeking. Our first goal was to

clarify this role of the PL in early cocaine self-administration, i.e. before addiction-like behavior develops: understanding its early role to eventually compare it to its late role and whether an addiction-like behavior develops or not. We have shown that optogenetic PL inactivation can decrease or increase cocaine seeking in the same individual, according to experimental contingencies.

PL neurons project to several remote structures. To study the role of these different neuronal pathways, we have worked in establishing optogenetic tools for the manipulation of specific neuronal pathways, in the rat, for which they are still poorly developed.

My thesis work contribute, both theoretically and technically, to the understanding of the psychobiology of cocaine addiction.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Fiancette JF*, Simonnet A*, Courtin J, Renault P, Herry C, Deroche-Gamonet V. Alteration in brain connectivity associated with cocaine addiction-like behavior in the rat, en préparation.

Fiancette JF, Garcia-Rivas V, Dejean C, Chaudun F, Valério S, Tostain J, Deroche-Gamonet V*, Herry C*. Double site combinatorial viral infection for optogenetic targeting of specific neuronal pathways in the rat, en préparation.

Martín-García E, Courtin J, Renault P, **Fiancette JF**, Wurtz H, Simonnet A, Levet F, Herry C, Deroche-Gamonet V. Frequency of cocaine self-administration influences drug seeking in the rat: optogenetic evidence for a role of the prelimbic cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2014, 39(10):2317-30.

Fiancette JF, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V. Mifepristone and spironolactone differently alter cocaine intravenous self-administration and cocaine-induced locomotion in C57BL/6J mice. *Addict Biol*. 2010 Jan; 15(1):81-7.

Deroche-Gamonet V*, Revest JM*, **Fiancette JF**, Balado E, Koehl M, Grosjean N, Abrous DN*, Piazza PV*. Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine seeking, *Mol Psychiatry*, en révision.

Martín-García E, Bourgoin L, Cathala A, Kasanetz F, Mondesir M, Gutiérrez-Rodríguez A, Reguero L, **Fiancette JF**, Grandes P, Spampinato U, Maldonado R, Piazza PV, Marsicano G, Deroche-Gamonet V. Differential Control of Cocaine Self-Administration by GABAergic and Glutamatergic CB1 Cannabinoid Receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2016, 41(9):2192-205.

Kasanetz F*, Lafourcade M*, Deroche-Gamonet V*, Revest JM, Berson N, Balado E, **Fiancette JF**, Renault P, Piazza PV, Manzoni OJ. Prefrontal synaptic markers of cocaine addiction-like behavior in rats. *Mol Psychiatry*. 2013, 18(6):729-37.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Fiancette JF, Martín-García E, Renault P, Courtin J, Levet F, Herry C*, Deroche-Gamonet V* Pattern of cocaine use influences drug seeking and neuronal activity in a relevant network. 11ème Colloque de la Société française des Neurosciences, 21-24 mai 2013, Lyon.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME	4
ABSTRACT	6
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	8
TABLE DES MATIERES	9
INDEX DES FIGURES	12
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	15
INTRODUCTION GENERALE	16
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	18
<i>L'addiction à la cocaïne</i>	18
Quelques Données épidémiologiques sur l'usage de cocaïne et ses conséquences	18
Préambule : Dépendance, Addiction ou Désordre Lié à l'Usage d'une Substance ?	19
Evolution de la définition clinique	20
Du DSM-III au DSM-5.....	21
De la compulsivité	23
<i>Modéliser l'addiction à la cocaïne</i>	24
Modélisation chez le rongeur	24
Fin des années 1990 – début des années 2000 : un tournant pour la modélisation animale de l'addiction	24
La modélisation spécifique de la rechute	26
Modèles d'addiction à la cocaïne : points communs et différences	27
Modélisation chez l'homme	33
<i>Connectivité fonctionnelle et Addiction à la cocaïne</i>	34
La connectivité cérébrale	34
Connectivité cérébrale, Neuropsychiatrie et addiction à la cocaïne	35
Connectivité cérébrale et Addiction à la cocaïne	36
Données de connectivité chez le rat obtenues au moyen des modèles d'addiction.....	39
Comment étudier la connectivité fonctionnelle chez l'animal	41
Comment mesurer la connectivité chez l'animal	41
Comment manipuler la connectivité fonctionnelle chez l'animal	45
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	51
MATERIELS ET METHODES.....	52
MATERIELS ET METHODES GENERAUX	53
<i>Animaux/conditions d'élevage</i>	53
Substances pharmacologiques	53
Chirurgies.....	53
La Cathétérisation	53
La stéréotaxie	54
Les vérifications histologiques.....	55
Comportement	55
L'Auto-administration intraveineuse.....	55
Electrophysiologie : Enregistrement de l'activité neuronale	61
Matériels	61
Stimulation optogénétique.....	62

Matériels	62
<i>Variables d'intérêt et Analyses</i>	63
Variables Comportementales	63
Le diagnostic d'addiction.....	63
Variables électrophysiologiques.....	64
Analyse des activités unitaires	64
Analyse des potentiels de champ.....	65
Analyses statistiques	66
 CHAPITRE 1 : MARQUEURS DE CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DE L'ADDICTION A LA COCAÏNE CHEZ LE RAT	
.....	67
A. INTRODUCTION	68
B. EXPERIENCES	68
1. Marqueurs de connectivité fonctionnelle de l'addiction à la cocaïne chez le rat.....	68
1.1 Matériels et méthodes spécifiques.....	68
Les électrodes	68
Implantation des électrodes	69
1.2 Protocole	69
1.3 Résultats	70
Caractérisation comportementale	70
Données électrophysiologiques	73
Données histologiques	79
1.4 Discussion	80
2. Manipulation d'un marqueur de connectivité fonctionnelle de l'addiction à la cocaïne chez le rat : les oscillations theta	82
2.1 Matériels et Méthodes spécifiques	83
2.2 Protocole	84
2.3 Résultats	85
Données comportementales et électrophysiologiques.....	85
Données histologiques : sites d'enregistrement	90
2.4 Discussion	91
C. CHAPITRE 1 : CONCLUSIONS ET DISCUSSION.....	93
Enjeux techniques	93
Enjeux conceptuels	94
Limites et Perspectives.....	95
 CHAPITRE 2 : ETUDE DU ROLE DU CORTEX PRELIMBIQUE (PL) DANS LE CONTROLE DU COMPORTEMENT D'AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE CHEZ LE RAT.	96
A. INTRODUCTION	97
B. EXPERIENCES	99
1. Implication du PL dans le comportement d'auto-administration de cocaïne en fonction de la fréquence de prise de la drogue : Etude par manipulation optogénétique du PL.....	99
1.1 Discussion.....	125
2. Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et Auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore.....	126
2.1. Matériels et méthodes spécifiques	127
Virus	127
Chirurgie.....	127
Stimulations optogénétiques	128
2.2. Protocole	128

2.3. Résultats	129
Données comportementales.....	129
Données histologiques	133
2.4. Discussion	133
3. Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une infection virale double.....	134
3.1. Détermination des conditions pour un ciblage optogénétique de la voie PL-NAcCore : infection virale combinée	135
3.1.1 Matériels et Méthodes spécifiques	135
3.1.2. Protocole	139
3.1.3. Résultats	139
Données histologiques	139
Données électrophysiologiques	140
3.1.4. Conclusions	141
3.2. Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une infection virale double.....	142
3.2.1 Matériels et Méthodes spécifiques	142
3.2.2. Protocole	142
3.2.3. Résultats	143
Données comportementales.....	143
Données histologiques	147
3.2.4. Discussion.....	147
C. CHAPITRE 2 : CONCLUSIONS ET DISCUSSION	148
Enjeux techniques	148
Enjeux conceptuels	148
Limites et Perspectives.....	148
CONCLUSION GENERALE	150
RESULTATS OBTENUS AU COURS DES TRAVAUX DE THESE	151
PERSPECTIVES.....	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre annuel d'overdoses à la cocaïne depuis 2001, aux Etats-Unis.	18
Figure 2 : Classement des drogues en fonction des risques physique, social et de dépendance.	19
Figure 3 : Part des usagers développant une dépendance à la substance qu'ils consomment.	19
Figure 4 : Comparaison des items de diagnostic de SUD selon le DSM-IV et le DSM-5, et dimensions comportementales majeures qui pourraient être utilisées pour une approche de type RDoC.....	22
Figure 5 : Correspondance, pour différentes drogues dont la cocaïne, entre les classifications du DSM-IV du DSM5	23
Figure 6 : Nombre de publications référencées dans PubMed de 1969 à 2017, par tranches de 13 ans, qui portent sur l'addiction à une drogue et qui comportent le terme Escalation (gauche), Addiction-like (centre) ou Compulsive-like (droite) dans le titre.	26
Figure 7 : Photo d'un cathéter de rat.....	54
Figure 8 : Le système d'auto-administration.....	56
Figure 9 : Organisation générale d'une expérience d'auto-administration classique du modèle multi-symptomatique d'addiction.	57
Figure 10 : Session de base composée de 3 périodes d'accès à la drogue (D) séparées par des périodes de non-drogue (ND), pendant lesquelles la drogue n'est pas disponible.	58
Figure 11 : Représentation des sessions de tests permettant d'évaluer deux des critères d'addiction.	60
Figure 12 : Représentation de la session de réinstallation ou rechute provoquée par, la cocaïne.	61
Figure 13 : Collecteur tournant électrique	62
Figure 14 : Rat doublement connecté.....	63
Figure 15 : Représentation des deux connecteurs 32 canaux implantés sur les rats enregistrés et schématisation de leur disposition à la surface du crâne.....	69
Figure 16 : Schéma du protocole expérimental de l'expérience couplant modèle multi-symptomatique d'addiction et électrophysiologie <i>in vivo</i>	70
Figure 17 : Mesures de la sévérité de l'usage de cocaïne. a-c. Scores dans les 3 critères d'addiction des rats caractérisés <i>addicts</i> et <i>non-addicts</i>	72
Figure 18 : Scores d'addiction individuels des rats <i>addicts</i> et <i>non-addicts</i> testés pour les marqueurs de connectivité fonctionnelle au moyen de l'électrophysiologie multi-sites.	72
Figure 19 : Comportement d'auto-administration post-chirurgie cérébrale.	73
Figure 20 : Représentations du nombre de neurones enregistrés et de leur répartition par structure chez les rats <i>non-addicts</i> et <i>addicts</i>	75
Figure 21 : Index de co-décharge par paires de neurones enregistrés.	76
Figure 22 : Analyse de l'activité de triplet de neurones.	77
Figure 23 : Courbes représentant la densité spectrale de puissance des potentiels de champ enregistrés chez les <i>addicts</i> et <i>non-addicts</i>	78
Figure 24 : Paires de neurones significativement corrélées enregistrées par rapport à un évènement de référence.....	79
Figure 25 : Représentation des sites d'implantations des électrodes au niveau des structures enregistrées. .	80
Figure 26 : Protocole expérimental de l'expérience visant à tester l'influence des oscillations thêta sur le comportement d'auto-administration.	84
Figure 27 : Acquisition du comportement d'auto-administration de cocaïne des sessions 1 à 28.	85
Figure 28 : Effet d'une injection de muscimol sur le taux d'oscillations thêta au niveau du PL (a), du NAc (b) et de l'HPC (c).	86

Figure 29 : Activité locomotrice en réponse à une injection i.c. de muscimol.	87
Figure 30 : Effet de l'injection intra-septum médian de muscimol sur la cohérence de l'activité thêta entre les structures enregistrées. Nac/HPC (a), mPFC/NAc (b), mPFC/HPC (c).	88
Figure 31 : Effet d'une injection intra-septum médian de muscimol sur le comportement d'auto-administration de cocaïne.	89
Figure 32 : Effet de l'injection intra-septum médian sur les latences d'initiation des demandes et de la prise de cocaïne.	90
Figure 33 : Représentation des sites d'implantation.	91
Figure 34 : Protocole expérimental de l'expérience intitulée « Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore ».	129
Figure 35 : Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne chez les rats <i>ArchT</i> et contrôle <i>EYFP</i>	130
Figure 36 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore, par stimulation optique au niveau du NAcCore, sur la réinstallation du comportement d'auto-administration de cocaïne.	131
Figure 37 : Effet d'une inhibition optogénétique de la voie PL-NAcCore, par stimulation au niveau du NAcCore, sur le comportement d'auto-administration de cocaïne.	132
Figure 38 : Contrôles histologiques de l'expression virale, de sa localisation dans le PL et des sites d'implantation des fibres optiques dans le NAcCore (Effet d'une inactivation de la voie PL-NAcCore : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore).	133
Figure 39 : Comparaison des deux approches virales utilisées pour exprimer l'opsine.	136
Figure 40 : Caractéristiques des optrodes.	137
Figure 41 : Mise en place de l'optrode pour la stimulation optique et l'enregistrement électrophysiologique.	138
Figure 42 : Protocole expérimental pour la « détermination des conditions pour un ciblage optogénétique de la voie PL-NAcCore : infection virale combinée ».	139
Figure 43 : Expression de la protéine fluorescente en fonction du temps après une infection virale combinée.	140
Figure 44 : Effet d'une manipulation optogénétique sur la fréquence de décharges des neurones du PL chez des rats exprimant l'opsine (<i>ArchT</i>) suite à une double infection virale.	141
Figure 45 : Effet d'une stimulation optogénétique sur la fréquence de décharges des neurones du PL chez des rats exprimant l'opsine (<i>ArchT</i>) suite à une simple infection virale.	141
Figure 46 : Protocole expérimental de l'expérience « Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une infection virale double ».	143
Figure 47 : Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne chez les rats <i>ArchT</i> et contrôle GFP.	144
Figure 48 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore, au moyen d'une double infection virale, sur la réinstallation du comportement d'auto-administration de cocaïne.	145
Figure 49 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore, au moyen d'une double infection virale, sur le comportement d'auto-administration.	146
Figure 50 : Représentation des sites d'implantation des fibres optiques au niveau du PL.	147

LISTE DES ABREVIATIONS

D : drogue
ND : non-drogue
TO : Time out
FR : Fixed Ratio
PR : Progressive ratio (ratio progressif en français)
Sec : seconde
Min : minute
dB : décibel
CPFm : cortex préfrontal médian
PL : cortex Pré-limbique
BLA : Amygdale baso-latérale
HPc : hippocampe
NAc : Noyau accumbens
NAcCore : Core du Noyau accumbens
i.p. : intrapéritonéale
s.c. : sous cutané
i.c. : intracérébral
CS1 : conditioned stimulus 1 (son 1)
CS2 : conditioned stimulus 2 (son 2)
CSF : cerebrospinal fluid (liquide cérébro-spinal)
SM : septum médian

INTRODUCTION

"Cocaine use is extraordinarily difficult to disrupt either in the laboratory or in the clinic." (2009)

Margaret Haney

Director of the Marijuana Research Laboratory
Co-Director of the Substance Use Research Center
Columbia University Medical Center

INTRODUCTION GENERALE

L'addiction aux drogues est une des pathologies neuropsychiatriques les plus prévalentes et son coût médico-social est très important, puisqu'elle est responsable de près de 12% de la mortalité mondiale annuelle (OMS, 2002).

Malgré plus de cinq décennies de recherche clinique et préclinique sur les mécanismes neurobiologiques d'action des drogues, les thérapies disponibles sont rares et d'efficacité limitée. Pour la cocaïne qui, après l'héroïne (figure 1), est la drogue la plus à risque en termes de dépendance et de dommages physiques, aucun médicament n'a obtenu l'approbation des agences de pharmacovigilance, telles que la FDA américaine ou l'ANSM française. À ce jour, aucun traitement médicamenteux n'a révélé de bénéfice significatif pour les patients dépendants à la cocaïne, qui aurait justifié une mise sur le marché. Cet échec traduit la faible validité prédictive des modèles d'addiction utilisés jusque-là, tant chez l'animal que chez l'homme. Il a conduit à questionner les validités de ressemblance et de construit de ces modèles.

En effet, l'addiction n'est pas un simple usage de drogue. Elle se caractérise par une recherche et une consommation de drogue dont les conséquences sont néfastes, mais que l'individu ne peut plus contrôler et qui peut prendre à échéance une dimension compulsive. Par ailleurs, elle ne concerne pas l'ensemble des consommateurs, mais un nombre restreint de sujets à risque. Un tournant a eu lieu au début des années 2000 avec le développement de modèles animaux d'addiction qui tiennent compte de ces caractéristiques de la pathologie (Ahmed and Koob, 1998a; Deroche-Gamonet *et al*, 2004; Vanderschuren and Everitt, 2004).

La question de la nature de l'objet d'étude (usage/effets renforçants vs addiction, i.e normal vs pathologique) est devenue **un pilier de la recherche** en addiction (pour revues : Ahmed, 2010, 2012; Belin-Rauscent *et al*, 2016; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013; Vanderschuren and Ahmed, 2013). Depuis peu, ce tournant impacte même d'autres domaines de la psychopathologie expérimentale comme la recherche sur l'obésité (Brown *et al*, 2017) ou sur les comportements agressifs (Golden *et al*, 2017).

De nombreuses études sur les mécanismes psychobiologiques d'action des drogues ont été réalisées au cours des 50 dernières années, notamment au moyen de modèles précliniques. Elles ont contribué à identifier l'addiction comme une psychopathologie complexe associée à des dysfonctions des mécanismes cérébraux impliqués dans la motivation, les émotions, l'apprentissage, le contrôle comportemental, la prise de décision, entre autres.

L'ensemble de ces travaux, combiné notamment à des études de neuroimagerie chez l'homme, a conduit à considérer que l'addiction résulte d'un déséquilibre entre les circuits

qui gèrent la valeur motivationnelle de la drogue et ceux qui sont impliqués dans le contrôle cognitif inhibiteur. Des changements séquentiels dans ces circuits préfronto-souscorticaux, qui sont interconnectés et qui incluent notamment le noyau basolatéral de l'amygdale, le noyau accumbens, l'hippocampe et le cortex préfrontal, seraient au cœur de processus motivationnels pathologiques et d'une difficulté à inhiber le *craving* (envie irrésistible de consommer la drogue) et la consommation.

La recherche préclinique, qui s'intéresse à la pathogénèse de l'addiction et aux mécanismes psychobiologiques qui sous-tendent le comportement d'addiction, s'oriente vers l'étude de ces circuits, par des approches variées.

Pour notre part, deux aspects nous paraissent importants. Il nous paraît pertinent d'aborder la question par une étude de connectivité fonctionnelle. Elle permet une vision globale et offre un potentiel translationnel avec la neuroimagerie chez l'homme. Il paraît également important d'utiliser une stratégie « temps réel ». Etudier et manipuler la fonctionnalité des réseaux, alors que l'animal se comporte, est complexe mais présente les avantages suivants. Un parallèle peut être réalisé entre le comportement pathologique et le fonctionnement cérébral. Il est théoriquement possible d'interroger séparément des processus psychopharmacologiques différents, en lien, soit avec les processus motivationnels, soit avec le contrôle cognitif inhibiteur, par exemple.

Pour une telle approche neurobiologique, centrée sur l'étude des circuits chez l'animal se comportant, des techniques sont disponibles, bien qu'encore peu combinées au comportement opérant complexe et majoritairement développées pour la souris. Pour l'étude de la connectivité fonctionnelle, il s'agit notamment de l'électrophysiologie multi-site appliquée à des enregistrements unitaires ou de potentiels de champ. Pour la manipulation, « temps réel » et réversible, des populations neuronales qui constituent ces circuits, l'optogénétique est un outil de choix.

Le premier enjeu de mes travaux a été d'adapter ces outils, au rat et au comportement opérant d'auto-administration de cocaïne. Le second enjeu a été d'utiliser ces outils pour : 1. rechercher des altérations de connectivité fonctionnelle, associées au comportement d'addiction à la cocaïne, au sein d'un circuit composé du CPFm, du BLA, du NAc et de l'hippocampe, 2. étudier le rôle du cortex PL dans le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'addiction à la cocaïne

QUELQUES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR L'USAGE DE COCAÏNE ET SES CONSEQUENCES

Selon Nutt et al. (2007), la cocaïne fait partie, avec l'héroïne, des drogues à haut risque en termes de dommages physiques. En aigu, elle peut être à l'origine de crises cardiaques. Sur la Figure 1, on note, pour exemple, l'évolution du nombre de morts par overdose à la cocaïne aux Etats-Unis de 2001 à 2014. L'usage chronique peut conduire à des atteintes physiques graves [cardiovasculaires (troubles du rythme cardiaque, thromboses artérielles et veineuses...), respiratoires (bronchospasme, pneumothorax, hémorragies), ORL (lésions de la cloison nasale, perforation du palais), neurologiques (AVC), psychiatriques (psychoses, paranoïa, attaques de panique, dépression), dermatologiques] (Nutt et al, 2007). Pour le risque social, elle est 3ème après l'héroïne et l'alcool (Figure 2).

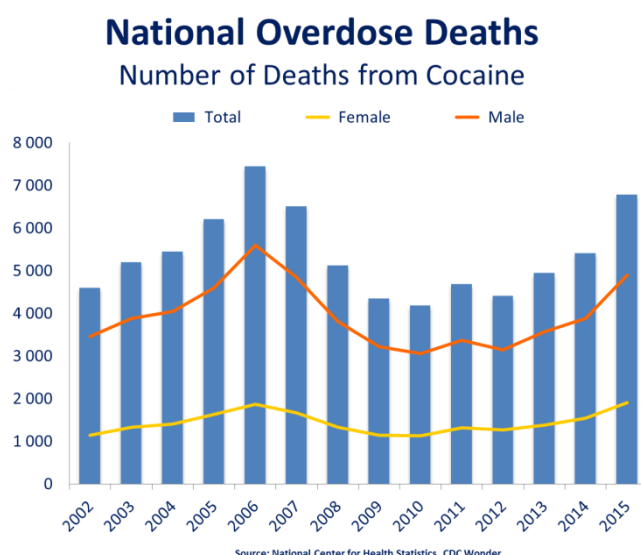


Figure 1 : Evolution du nombre annuel d'overdoses à la cocaïne depuis 2001, aux Etats-Unis.

Pour ce qui est du risque de dépendance, quelle que soit la manière de l'analyser (Anthony et al, 1994; Nutt et al, 2007), elle est dans le trio de tête avec l'héroïne et le tabac (Figure 2 et Figure 3). Selon Anthony et al. (1994), environ 20% des usagers de cocaïne développent une dépendance ; une forme extrême de trouble comportemental lié à l'usage d'une drogue.

A l'échelle mondiale, le nombre d'usagers de cocaïne est estimé à 14 millions. En France, la cocaïne est le deuxième produit illicite le plus consommé, après le cannabis. En 2014 parmi les personnes âgées de 18 à 64 ans, 5,6 % ont expérimenté la cocaïne et 1,1 % en ont consommé au moins une fois dans l'année.

Malheureusement, la dépendance à la cocaïne fait partie des dépendances les plus pauvres en termes d'options thérapeutiques (Shorter *et al*, 2015).

	Physical harm				Dependence				Social harm			
	Mean	Acute	Chronic	Intravenous	Mean	Pleasure	Psychological dependence	Physical dependence	Mean	Intoxication	Social harm	Health-care costs
Heroin	2.78	2.8	2.5	3.0	3.00	3.0	3.0	3.0	2.54	1.6	3.0	3.0
Cocaine	2.33	2.0	2.0	3.0	2.39	3.0	2.8	1.3	2.17	1.8	2.5	2.3
Barbiturates	2.23	2.3	1.9	2.5	2.01	2.0	2.2	1.8	2.00	2.4	1.9	1.7
Street methadone	1.86	2.5	1.7	1.4	2.08	1.8	2.3	2.3	1.87	1.6	1.9	2.0
Alcohol	1.40	1.9	2.4	NA	1.93	2.3	1.9	1.6	2.21	2.2	2.4	2.1
Ketamine	2.00	2.1	1.7	2.1	1.54	1.9	1.7	1.0	1.69	2.0	1.5	1.5
Benzodiazepines	1.63	1.5	1.7	1.8	1.83	1.7	2.1	1.8	1.65	2.0	1.5	1.5
Amphetamine	1.81	1.3	1.8	2.4	1.67	2.0	1.9	1.1	1.50	1.4	1.5	1.6
Tobacco	1.24	0.9	2.9	0	2.21	2.3	2.6	1.8	1.42	0.8	1.1	2.4
Buprenorphine	1.60	1.2	1.3	2.3	1.64	2.0	1.5	1.5	1.49	1.6	1.5	1.4
Cannabis	0.99	0.9	2.1	0	1.51	1.9	1.7	0.8	1.50	1.7	1.3	1.5
Solvents	1.28	2.1	1.7	0	1.01	1.7	1.2	0.1	1.52	1.9	1.5	1.2
4-MTA	1.44	2.2	2.1	0	1.30	1.0	1.7	0.8	1.06	1.2	1.0	1.0
LSD	1.13	1.7	1.4	0.3	1.23	2.2	1.1	0.3	1.32	1.6	1.3	1.1
Methylphenidate	1.32	1.2	1.3	1.6	1.25	1.4	1.3	1.0	0.97	1.1	0.8	1.1
Anabolic steroids	1.45	0.8	2.0	1.7	0.88	1.1	0.8	0.8	1.13	1.3	0.8	1.3
GHB	0.86	1.4	1.2	0	1.19	1.4	1.1	1.1	1.30	1.4	1.3	1.2
Ecstasy	1.05	1.6	1.6	0	1.13	1.5	1.2	0.7	1.09	1.2	1.0	1.1
Alkyl nitrites	0.93	1.6	0.9	0.3	0.87	1.6	0.7	0.3	0.97	0.8	0.7	1.4
Khat	0.50	0.3	1.2	0	1.04	1.6	1.2	0.3	0.85	0.7	1.1	0.8

Table 3: Mean independent group scores in each of the three categories of harm, for 20 substances, ranked by their overall score, and mean scores for each of the three subscales

Figure 2 : Classement des drogues en fonction des risques physique, social et de dépendance.

La cocaïne, avec l'héroïne, est une drogue à haut risque en termes de dépendance et de dommages physiques. (table 3 – Nutt et al. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse, Lancet, 2007).

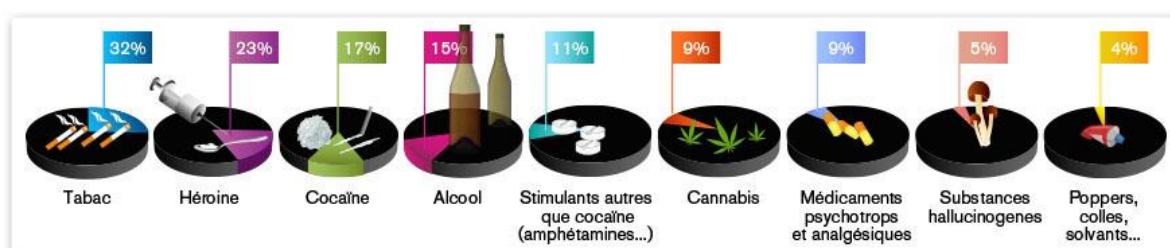


Figure 3 : Part des usagers développant une dépendance à la substance qu'ils consomment.

[d'après (Anthony et al, 1994)]. Illustration/Inserm/F.Koulikoff

(<https://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/addictions>).

PREAMBULE : DEPENDANCE, ADDICTION OU DESORDRE LIE A L'USAGE D'UNE SUBSTANCE ?

La psychopathologie qui nous intéresse ici a plusieurs dénominations. Officiellement, la plus ancienne est dépendance. Plus récemment, le terme officiel générique adopté est Désordre Lié à l'Usage d'une Substance (SUD en anglais, pour Substance Use Disorder) ou ici spécifiquement Désordre lié à l'Usage de Cocaïne (CUD en anglais, pour Cocaine Use Disorder). Entre temps, est apparu le terme d'addiction, particulièrement utilisé dans le

cadre de la recherche, bien qu'il n'ait jamais obtenu de statut officiel dans les manuels de psychiatrie.

Pourtant un institut de recherche tel que le NIDA (National Institute on Drug Abuse - institut fédéral américain de recherche scientifique sur l'usage de drogues et l'addiction) utilise le terme addiction et propose de le situer par rapport à la dépendance et au SUD de la façon suivante :

Is there a difference between physical dependence and addiction? Y a-t-il une différence entre la dépendance physique et l'addiction ? (NIDA, décembre 2012)

Yes. Addiction—or compulsive drug use despite harmful consequences—is characterized by an inability to stop using a drug; failure to meet work, social, or family obligations; and, sometimes (depending on the drug), tolerance and withdrawal. The latter reflect physical dependence in which the body adapts to the drug, requiring more of it to achieve a certain effect (tolerance) and eliciting drug-specific physical or mental symptoms if drug use is abruptly ceased (withdrawal). Physical dependence can happen with the chronic use of many drugs—including many prescription drugs, even if taken as instructed. Thus, physical dependence in and of itself does not constitute addiction, but it often accompanies addiction. This distinction can be difficult to discern, particularly with prescribed pain medications, for which the need for increasing dosages can represent tolerance or a worsening underlying problem, as opposed to the beginning of abuse or addiction.

What is drug addiction?- Qu'est-ce que l'addiction à une drogue ? (NIDA, mars 2017)

Drug addiction is the most severe form of a substance use disorder (SUD). A SUD develops when a person's continued use of alcohol and/or drugs causes significant issues, such as health problems, disability, and failure to meet responsibilities at work, school, or home. An SUD can range from mild to severe.

EVOLUTION DE LA DÉFINITION CLINIQUE

La conception et la définition clinique de l'addiction aux drogues ont fortement évolué au cours des 30 à 40 dernières années.

Je présente ici succinctement les étapes clés de cette évolution, qui a été décrite récemment de façon exhaustive et dans une perspective historique par (Robinson and Adinoff, 2016). Cette évolution a par ailleurs été mise en parallèle avec le développement des modèles animaux par (Piazza and Deroche-Gamonet, 2013).

Cette évolution est bien visible au travers des révisions successives du DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux, publié par l'Association Américaine de Psychiatrie (APA).

Du DSM-III au DSM-5

Avant 1980 et le DSM-III (APA, 1980), la dépendance n'existe pas comme une pathologie primaire mais est conçue comme une conséquence (trouble secondaire) d'un trouble primaire de la personnalité (Sociopathie dans le DSM-I, Désordre de la personnalité et autres désordres mentaux non-psychotiques dans le DSM-II).

De façon notable, jusqu'au DSM-5 (APA, 2013), qui est sa dernière version, le manuel (DSM-III et III-R, DSM-IV et IV-R) comprend deux conséquences pathologiques de l'usage d'une drogue : l'abus et la dépendance. Jusqu'au DSM-5, abus et dépendance ne sont pas considérés comme deux étapes ou stades d'une même pathologie, mais bien comme deux entités différentes.

Pour ce qui concerne la dépendance, l'évolution la plus profonde s'effectue du DSM-III (APA, 1980) au DSM-IV (APA, 1994). Dans le DSM-III, la dépendance se définit par une tolérance aux effets de la drogue et par l'apparition de symptômes de sevrage à l'arrêt de la consommation.

De façon notable, dans le DSM-IV (APA, 1994) et le DSM-IV-R (APA, 2000), tolérance et sevrage sont toujours présents, mais ne sont plus nécessaires au diagnostic. Au contraire, les critères comportementaux de perte de contrôle augmentent en nombre par rapport au DSM-III-R et il devient nécessaire qu'un de ces critères, au moins, soit présent pour un diagnostic de dépendance.

Le changement majeur apporté par le DSM-5 (APA, 2013) est la fusion des entités abus et dépendance en une seule appelée *Désordre lié à l'Usage d'une Substance* (Substance Use Disorder - SUD) et pour laquelle est introduite une notion de dimensionnalité avec quatre niveaux de sévérité : 1. Non affecté (0 ou 1 critère présent), 2. Léger (2 à 3 critères), 3. Modéré (4 à 5 critères), 4. Sévère (6 critères ou plus). Un autre changement notable est l'introduction du critère *craving*, dont l'usage avait pourtant été prohibé pendant des années par l'OMS (Skinner and Aubin, 2010).

La Figure 4 résume et compare les classifications du DSM-IV et du DSM-5, ainsi qu'une proposition faite par (Piazza and Deroche-Gamonet, 2013) de classification basée sur une approche RDoC (Research Domain Criteria). RDoC, à l'initiative récente du NIMH (Miller, 2010), est une initiative pour une approche différente de la pathologie du comportement, avec une classification basée sur des endophénotypes de la pathologie, qu'on pense favorable à l'identification de marqueurs biologiques diagnostiques. Avec une approche de type RDoC, l'étude des symptômes comportementaux de l'usage pathologique de drogue selon le DSM-IV et le DSM-5 fait apparaître trois dimensions majeures : 1. une escalade dans la prise associée à une augmentation de la motivation pour la drogue, qui couvre les

catégories abus du DSM-IV et les SUDs léger et modéré du DSM-5, 2. Des modifications des effets pharmacologiques de la drogue (tolérance et sevrage) qui ne sont ni nécessaires ni suffisants pour un diagnostic d'usage pathologique, 3. Une perte de contrôle sur la prise qui est une condition nécessaire pour un diagnostic de dépendance selon le DSM-IV ou de SUD sévère selon le DSM-5, et dont on peut résumer les 6 critères par trois symptômes : une très forte motivation pour la substance avec l'abandon d'activités au profit de la consommation, une difficulté à contrôler la prise et un maintien de la prise malgré ses conséquences néfastes.

DSM IV criteria for drug abuse (1994)	DSM V criteria for Substance Use Disorders (SUDs) (2013)	RDoC-Like Dimensional Approach
At least one of these four criteria	0-1 unaffected; 2-3 Mild; 4-5 Moderate; 6 or more Severe	
1. Recurrent failure to fulfill major role obligations	1. Recurrent failure to fulfill major role obligations	Sustained Escalated drug intake with high motivation for the drug
2. Recurrent substance use in physically hazardous situations	2. Recurrent substance use in physically hazardous situations	
3. Recurrent substance-related legal problems		
4. Continued substance use despite persistent or recurrent social or interpersonal problems	3. Continued substance use despite persistent or recurrent social or interpersonal problems	
DSM IV criteria for drug addiction (1994)		
Three out of these seven criteria		
1. Tolerance	4. Tolerance	Physiological adaptations to drug intake
2. Withdrawal	5. Withdrawal	
3. The substance is often taken in larger amounts or over a longer period than intended	6. The substance is often taken in larger amounts or over a longer period than intended	Loss of control on drug intake
4. Persistent desire or unsuccessful efforts to cut down	7. Persistent desire or unsuccessful efforts to cut down	
	8. Craving	
5. Considerable time spent in obtaining the substance or using, or recovering from its effects	9. Considerable time spent in obtaining the substance or using, or recovering from its effects	
6. Important social, work, or recreational activities given up because of use	10. Important social, work, or recreational activities given up because of use	
7. Continued use despite knowledge of problems caused by or aggravated by use	11. Continued use despite knowledge of problems caused by or aggravated by use	

Figure 4 : Comparaison des items de diagnostic de SUD selon le DSM-IV et le DSM-5, et dimensions comportementales majeures qui pourraient être utilisées pour une approche de type RDoC
(Issu de: Piazza & Deroche-Gamonet, Psychopharmacology, 2013).

La Figure 5 propose une ré-analyse des données de (Peer *et al*, 2013) qui compare les diagnostics produits avec les classifications du DSM-IV et du DSM-5. On note, en particulier pour la cocaïne, une très bonne correspondance entre un diagnostic de dépendance selon le DSM-IV et un diagnostic de CUD sévère avec le DSM-5 (91%), ainsi qu'une excellente correspondance entre l'abus selon le DSM-IV et un diagnostic de CUD strictement inférieur à sévère avec le DSM-5 (99%). Les CUDs léger et modéré pourraient donc définir plus finement des stades indifférenciés par l'abus dans le DSM-IV.

		DSM IV							
		Alcohol n (%)		Cocaine n (%)		Opioid n (%)		Cannabis n (%)	
		abuse only	Dependence	abuse only	Dependence	abuse only	Dependence	abuse only	Dependence
DSM 5	< Severe	931 (99)	569 (15%)	171 (99)	422 (9%)	115 (100)	168 (7%)	876 (99)	692 (33)
	Severe	11 (1)	3238 (85)	11 (1)	4042 (91)	0 (0)	2332 (93)	5 (1)	1395 (67)

Figure 5 : Correspondance, pour différentes drogues dont la cocaïne, entre les classifications du DSM-IV du DSM5 (Issu de: Piazza & Deroche-Gamonet, Psychopharmacology, 2013).

Si l'on devait résumer ; on peut dire que certains des critères diagnostiques de perte de contrôle communs au DSM-IVR et au DSM-5 sont redondants. On peut les synthétiser en quatre critères principaux : 1. Le sujet éprouve des difficultés à réfréner la recherche de drogue. 2. Le sujet montre une très grande motivation pour la drogue, ses activités se focalisent sur la recherche et la consommation de la substance. 3. L'usage de la drogue est maintenu malgré ses conséquences néfastes. A ces critères s'ajoute désormais un quatrième critère, le craving, dans le DSM-5.

De la compulsivité

Le terme *compulsif* est souvent utilisé pour qualifier la prise de drogue dans l'addiction tant chez l'homme que dans les modèles animaux. Mais il existe des différences dans les conceptions "*clinique*" et "*recherche*" de la compulsivité dans l'addiction.

Tout d'abord, il faut rappeler que le terme "compulsif" est initialement issu d'une psychopathologie désignée dans le DSM5 sous l'entrée *Troubles obsessionnels compulsifs* (TOC) *et connexes*. Les compulsions sont des comportements répétitifs (se laver, ordonner, ranger, vérifier, etc.) ou actes mentaux (compter, répéter des mots, etc.) que le sujet se sent poussé à accomplir en réponse à une obsession ou selon certaines règles qui doivent être appliquées de manière inflexible. Ces compulsions sont destinées à neutraliser ou diminuer le sentiment de détresse ou à empêcher un événement ou une situation redoutés. Elles sont soit sans relation réaliste avec ce qu'elles proposent de neutraliser ou de prévenir, soit manifestement excessives et ne sont pas source de plaisir au-delà du soulagement de l'angoisse. Un grand nombre de patients développent, pour limiter la survenue des obsessions et des compulsions, un évitement vis à vis des situations favorisant l'émergence d'obsessions ou compulsions (SIDES, 2017).

L'histoire naturelle de l'addiction indique que, dans une phase avancée, la prise de drogue peut prendre une dimension compulsive. Plus que la répétition du comportement, déjà présente, c'est l'apparition d'un conflit que cette dimension décrit. L'individu continue à rechercher la drogue, malgré l'apparition à ce stade d'un désir d'y résister. Il continue à la consommer de façon excessive malgré son intention de contrôler son usage. Cette intention de

contrôle est en lien avec la prise de conscience/la perception des conséquences néfastes du comportement (Keramati *et al*, 2017).

La recherche préclinique identifie l'addiction à la recherche et à la prise compulsives de drogue. Elle définit cet usage compulsif comme "un usage répété, persistant, malgré ses conséquences néfastes" (Everitt, 2014). C'est notamment sur cet usage malgré ses conséquences néfastes que la recherche préclinique a focalisé son attention récemment. Comme nous le verrons plus loin, il est possible de mettre en évidence, par différentes procédures, 20% de rats qui persistent à s'auto-administrer de la cocaïne malgré les conséquences néfastes de ce comportement. Si, opérationnellement, l'animal se trouve face à une situation conflictuelle (la drogue, mais une conséquence négative – un choc électrique par exemple), il n'est pas certain que le rongeur soit réellement en conflit et ait l'intention de contrôler son usage.

Modéliser l'addiction à la cocaïne

Avec le DSM-III, puis le DSM-IV, il apparaît clairement que l'addiction ne se définit plus comme un simple usage de drogue, conséquence d'un comportement asocial, maintenu et amplifié par des facteurs pharmacologiques (tolérance et symptômes de sevrage). C'est une perte de contrôle sur l'usage et la recherche de drogue qui apparaît après une prise plus ou moins prolongée de la substance. Faire usage de drogue est une chose, être *addict* en est clairement une autre. Par ailleurs, les données cliniques et épidémiologiques indiquent que la pathologie ne se développe que chez un nombre limité d'usagers (Figure 3).

Comment les recherches cliniques et précliniques sont-elles pris en compte cette évolution majeure de conception de l'addiction ? Malgré plus de 50 ans de recherche, l'addiction, et en particulier l'addiction à la cocaïne, manque de solutions thérapeutiques. L'inadaptation, ou l'adaptation tardive, des modèles expérimentaux à cette nouvelle vision de la pathologie peut avoir contribué à cet échec (Deroche-Gamonet and Piazza, 2010). Pourtant dès la fin des années 1960 (Wikler and Pescor 1967; Wikler et al. 1971), puis au début des années 1990 (Wolffgramm 1991; Wolffgramm and Heyne 1991; Wolffgramm et al. 2000), deux groupes de chercheurs se questionnent sur la perte de contrôle et donnent accès, pendant des mois, à de la drogue par voie orale, à des rats. Bien que pionniers, ces travaux n'ont eu que peu d'écho.

MODELISATION CHEZ LE RONGEUR

Fin des années 1990 – début des années 2000 : un tournant pour la modélisation animale de l'addiction

Deux enjeux majeurs ont guidé la majorité des premières études dans ce contexte : 1. les animaux devaient pouvoir consommer la drogue sur une période beaucoup plus longue que précédemment, plusieurs mois et non juste quelques jours ou semaines. 2. Les animaux devaient être testés dans des protocoles explorant la sévérité de l'usage, une perte de contrôle. Dans ce cadre, des tests divers ont été réalisés seuls ou combinés. Les plus emblématiques sont le maintien de la recherche et/ou de la prise de drogue malgré la présence d'un stimulus aversif (choc électrique) ou malgré la présence d'un renforçateur naturel alternatif.

Pour les psychostimulants, c'est Jochen Wolffgramm et Andrea Heyne, de l'Université libre de Berlin, qui les premiers, au début des années 1990, questionnent la validité des modèles d'addiction, dans une revue publiée dans *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Il propose un modèle de perte de contrôle sur l'usage de différents types de drogues dont l'amphétamine, (Wolffgramm, 1991).

Mais c'est la fin des années 1990 et le début des années 2000 qui constituent une étape importante dans la prise en compte, par la recherche préclinique, de ces changements de définition de l'addiction. L'étape est importante car elle implique plusieurs groupes de recherche et que tous s'intéressent à la cocaïne. On voit apparaître trois nouveaux termes dans les articles précliniques pour caractériser la prise de drogue: *escalation/escalated*, *addiction-like* et *compulsive* (Figure 6).

Ces termes trouvent leur origine dans trois articles publiés dans le journal *Science*. Le premier est publié en 1998 par (Ahmed and Koob, 1998) et est intitulé *Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point*. Les deux autres sont publiés dans un même numéro du journal en 2004. Ils sont intitulés *Evidence for addiction-like behavior in the rat* (Deroche-Gamonet et al, 2004) et *Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration* (Vanderschuren and Everitt, 2004). Progressivement, cette nouvelle approche expérimentale de l'addiction à la cocaïne, qui tient compte de l'évolution des conceptions et définitions cliniques de la pathologie, a été adoptée par des neurobiologistes de l'addiction et étendue à la souris (Chen et al, 2013a; Pascoli et al, 2015). Récemment, elle a même été appliquée à d'autres formes d'addictions ; addiction à la nourriture conduisant à l'obésité (Brown et al, 2017) ou addiction aux comportements agressifs (Golden et al, 2017).

Ces études « pionnières » exploraient par des approches différentes, au moyen du modèle d'auto-administration intraveineuse, le développement, chez le rat, d'un comportement

pathologique, une perte de contrôle sur l'usage de cocaïne, comparable à l'addiction humaine. Plusieurs revues, (Ahmed, 2010, 2012; Belin-Rauscent *et al*, 2016; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013; Vanderschuren and Ahmed, 2013), soulignent l'importance de l'étude d'un usage pathologique de drogue, plutôt que d'un usage normal/contrôlé pour l'identification de mécanismes neurobiologiques et de cibles thérapeutiques pertinentes. Ces mêmes « pionniers », pour certains, ont raffiné leurs modèles ou en ont proposé d'autres.

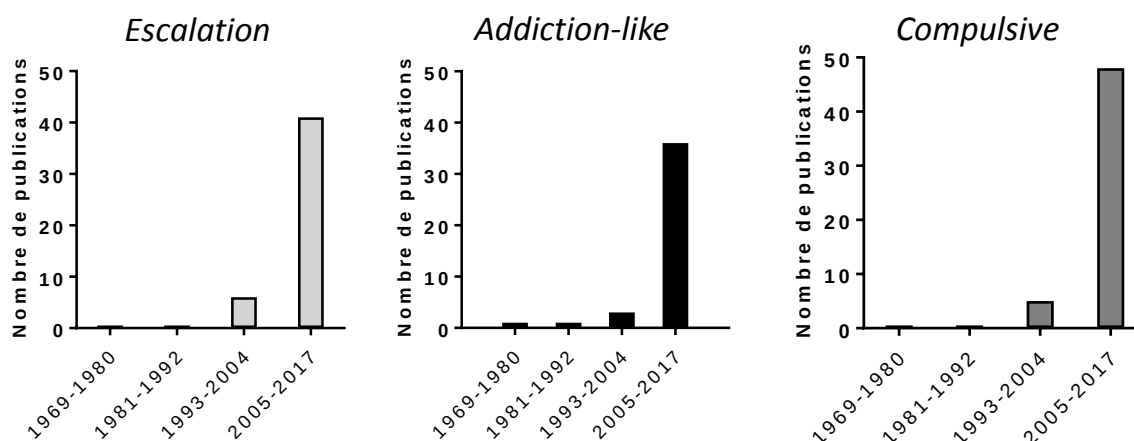


Figure 6 : Nombre de publications référencées dans PubMed de 1969 à 2017, par tranches de 13 ans, qui portent sur l'addiction à une drogue et qui comportent le terme Escalation (gauche), Addiction-like (centre) ou Compulsive-like (droite) dans le titre.

En octobre 2017, les trois articles à l'origine de ces termes ont été respectivement cités 592, 509 et 383 fois depuis leur parution.

La modélisation spécifique de la rechute

A côté de l'usage pathologique de drogue, la rechute du comportement chez le patient en sevrage constitue le problème clinique majeur de l'addiction. Elle est modélisée chez l'animal depuis près de 40 ans par la réinstallation du comportement d'auto-administration. Généralement après une courte expérience d'auto-administration (quelques semaines), et après abstinence ou extinction, la réinstallation du comportement d'auto-administration par l'administration non contingente de la drogue, un stimulus discret conditionné, le contexte d'auto-administration ou encore un stress, a été largement utilisé pour modéliser la rechute dans le comportement addictif chez le patient sevré. Ces facteurs sont connus pour provoquer des rechutes chez les patients dépendants sevrés. Malgré cette validité de ressemblance, cette préparation présente une assez faible validité prédictive. Depuis quelques années, des chercheurs se questionnent sur la nature de cette réinstallation dans les conditions expérimentales classiques et ont proposé de nouvelles procédures pour modéliser la rechute dans un contexte d'usage pathologique de drogue (Venniro *et al*, 2016).

Récemment, des chercheurs ont étudié la réinstallation du comportement chez des rats ayant eu préalablement un accès prolongé à la cocaïne (Caprioli *et al*, 2015) ou encore en

situation de conflit ; pour accéder au levier opérant censé donner accès à la drogue, le rat doit passer une zone électrifiée (Peck *et al*, 2013).

Par ailleurs, pour augmenter la validité de ressemblance et de construit, l'abstinence (forcée ou volontaire) est préférée à l'extinction (sauf dans des études visant à tester le potentiel thérapeutique et les mécanismes de l'extinction). Pour provoquer l'abstinence volontaire, les animaux sont placés dans une situation de conflit (drogue et choc électrique) ou de choix (drogue et nourriture palatable). Il est proposé que cette abstinence volontaire basée sur le choix modélise la thérapie comportementale de sevrage dite « contingency management » qui consiste à utiliser des récompenses alternatives pour maintenir l'abstinence (Venniro *et al*, 2017). Une fois l'abstinence atteinte, les animaux sont exposés aux facteurs susceptibles de provoquer une réinstallation du comportement (Venniro *et al*, 2016).

Modèles d'addiction à la cocaïne : points communs et différences

Ces modèles ont été largement décrits (Belin-Rauscent *et al*, 2016; Deroche-Gamonet and Piazza, 2014; Nadège Berson, 2009; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013; Vanderschuren and Ahmed, 2013b; Venniro *et al*, 2016). Ils ont pour objectif commun ; d'identifier, chez le rat, un comportement extrême vis-à-vis de la cocaïne ("une prise compulsive"), qui ressemble à l'addiction humaine, mais ils présentent aussi des différences majeures. Ce sont ces différences que nous proposons de décrire, ainsi que la façon dont elles peuvent influencer la pertinence des mécanismes neurobiologiques identifiés.

Trois facteurs majeurs différencient ces modèles d'addiction : 1. L'identification d'une vulnérabilité individuelle à la perte de contrôle, 2. La modélisation d'un ou plusieurs symptômes/critères de l'addiction, 3. Une approche longitudinale de la perte de contrôle.

1. L'identification d'une vulnérabilité individuelle à la perte de contrôle

Dans sa version la plus récente, le DSM (DSM5, APA, 2013) reconnaît que les usagers de drogue ne sont pas tous vulnérables au SUD et, comme nous l'indiquions plus haut, les données de la littérature indiquent que 15-20% des usagers de cocaïne développent une addiction (Anthony *et al*, 1994). Pourtant, dans leur majorité, les modèles de perte de contrôle (ou de *prise compulsive* de drogue) ont très peu considéré cette dimension individuelle.

Les modèles n'identifiant pas de vulnérabilité individuelle.

Les concepteurs de ces nouveaux modèles avaient tous pris en compte la nécessité de questionner le contrôle sur la prise de drogue, mais la conception dominante était que cette perte de contrôle dépendait uniquement d'un usage prolongé de la drogue. La majorité des modèles a donc d'abord consisté à comparer deux groupes d'animaux pour leur « contrôle » sur la prise de cocaïne. Les individus ayant consommé durablement de la cocaïne « perdaient tous le contrôle », contrairement au groupe qui avait peu consommé de drogue.

Ces modèles présentent deux limitations majeures. En ne considérant pas la vulnérabilité individuelle, une caractéristique fondamentale de l'addiction, ils présentent un défaut de validité de ressemblance et de construit. Par ailleurs, l'approche utilisée compromet les études neurobiologiques. Les animaux qualifiés d'*addicts* (accès prolongé) ont consommé plus de cocaïne et ont produit plus de comportement d'auto-administration que ceux qualifiés de *non-addicts* (accès limité). Les différences biologiques identifiées combinent des différences en lien avec ce comportement de type addict, et des différences dues à une exposition différentielle à la cocaïne et à un surentraînement comportemental.

- *L'escalade de la prise après accès quotidien étendu* (Ahmed and Koob, 1998) : Les animaux *Long access* (*LgA* - 6h par session) et les animaux *Short access* (*ShA* - 1h par session) diffèrent dans leur consommation de cocaïne : lors de la première heure de session, les *LgA* montrent une prise très supérieure à celle des rats *ShA*.

Cette escalade de la prise touche l'ensemble des individus testés et apparaît rapidement (après 4 à 5 sessions d'auto-administration). Par ailleurs, les rats *LgA* perdent leur intérêt pour la cocaïne lorsqu'on leur présente simultanément une solution de sucre.

Il a été proposé que le *Long access* à la cocaïne provoque une élévation du seuil hédonique à l'origine de l'escalade. Soutenant cette hypothèse, le seuil d'autostimulation électrique des animaux *LgA* est plus élevé que celui des animaux *ShA*. Par ailleurs, ils présentent un déplacement vers le haut de la courbe dose-réponse pour l'auto-administration de cocaïne à ratio fixe 1 (FR1) (Ahmed and Koob, 1998).

A cette élévation de seuil hédonique s'ajouterait un changement de sensibilité aux effets motivationnels de la cocaïne. Les rats *LgA* présentent une apparente tolérance aux effets de la cocaïne dans une procédure de ratio progressif ; une motivation plus élevée pour les fortes doses de cocaïne et moindre pour les faibles doses (Oleson and Roberts 2009). Paradoxalement, ils sont aussi plus sensibles aux propriétés motivationnelles de la cocaïne dans un test de réinstallation par l'administration non contingente de cocaïne, mesurée après extinction du comportement d'auto-administration (Ahmed and Cador 2006). Des différences de pharmacodynamique liées à des différences de protocoles (ratio progressif vs FR1) ou des adaptations liées à l'extinction et/ou sevrage pourraient rendre compte de ces effets apparemment opposés.

L'ensemble de ces caractéristiques, dont l'absence de différences individuelles, a conduit à proposer que cette escalade de la prise ne modélise pas une addiction, mais une prise soutenue/intensifiée de cocaïne consécutive à une exposition plus importante à la cocaïne (Everitt, 2014; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013). La difficulté à limiter la prise de drogue après un accès prolongé correspondrait plus à une augmentation compensatoire de la

consommation (en raison d'une élévation du seuil hédonique et d'un changement de sensibilité à certains effets de la cocaïne), plutôt qu'à un symptôme de perte de contrôle.

Hors de cette limitation en termes de validités de ressemblance et de construit, ce modèle présente des limites pour la neurobiologie du CUD. L'identification d'altérations spécifiques du comportement d'escalade de la prise est compromise par les différences propres à une exposition plus importante à la cocaïne et au contexte d'auto-administration ainsi qu'à une plus grande expérience du comportement opérant.

- *Le maintien du comportement de recherche de drogue malgré l'adultération de la solution.*

Ce modèle pionnier développé par Wolffgramm et collaborateurs (Wolffgramm and Heyne 1995) se base sur l'exposition prolongée à un protocole d'auto-administration orale dans lequel l'animal a le choix entre obtenir un renforçateur naturel (de l'eau) ou de la drogue. Ce modèle a été le premier à s'adresser à la vision moderne de l'addiction (une perte de contrôle sur la prise de drogue) en démontrant un maintien de la prise malgré ses conséquences néfastes.

Après plusieurs mois d'exposition à la drogue (amphétamine, opiacés ou alcool), les animaux augmentent la prise de drogue ; leur choix s'orientant exclusivement vers la drogue. Après plusieurs mois de sevrage, les rats exposés à la drogue présentent une rechute contrairement aux rats contrôles ainsi qu'un maintien de la consommation de la drogue lorsque celle-ci est additionnée d'une substance amère, la quinine. Les rats contrôles réagissent à cette dévaluation en délaissant la drogue pour le renforçateur naturel. Grâce à ce modèle, Wolffgramm et collaborateurs ont montré que cette « perte de contrôle » sur la prise d'amphétamine ne se développait que si les animaux avaient le choix entre l'eau et la drogue (Heyne and Wolffgramm 1998) et seulement après un usage prolongé (Galli and Wolffgramm 2004). Wolffgramm et collaborateurs ont identifié des différences individuelles avec seulement 50% des animaux ayant eu un accès prolongé à la drogue développant une augmentation de la prise et une résistance à l'adultération (Galli and Wolffgramm 2004). Néanmoins, pour cet aspect, la fiabilité de leur modèle peut être questionnée puisque dans une de leurs études précédentes ces mêmes auteurs relataient que tous les animaux développaient le phénotype (Heyne and Wolffgramm 1998).

- *Le maintien du comportement de recherche de cocaïne en présence d'un stimulus aversif conditionné (Vanderschuren and Everitt, 2004) :* Après avoir consommé durablement de la cocaïne, tous les animaux « perdaient le contrôle », recherchaient la cocaïne malgré la présence d'un stimulus aversif conditionné (un stimulus visuel préalablement associé à un choc électrique).

Ici aussi, l'absence de différences individuelles compromet la validité de ressemblance et de construit du modèle et met en doute la dimension addictive du comportement. Comme

l'indique BJ Everitt (Everitt, 2014): « Cette expérience indique un effet de la prise chronique de cocaïne sur la sensibilité aux signaux de danger, - et bien que spécifique du contexte cocaïne et non de façon générale -, elle ne révèle pas de propensions individuelles et de sous-populations vulnérables à cet effet. »

- Les Modèles de rechute

Il est très peu question de différences individuelles dans les modèles de rechute. La raison en est simple. Comme le rappelle Venniro et al. (Venniro *et al*, 2016) : “High rates of relapse to drug use during abstinence is a defining feature of drug addiction”. La rechute chez le sujet dépendant, en particulier à la cocaïne, est un phénomène qui touche plus de 80% des individus.

Néanmoins, les patients dépendants pourraient être différemment sensibles aux facteurs provoquant la rechute ; certains répondant plus au stress, d'autres aux stimuli environnementaux... Ces sources de différences individuelles commencent juste à être prises en compte dans les modèles précliniques (Cooper *et al*, 2007; Peck *et al*, 2013; Robinson *et al*, 2014).

Par ailleurs, l'abstinence volontaire (punition ou choix d'un renforçateur alternatif) ne fait apparemment pas l'objet de différences individuelles ou celles-ci ne sont pas étudiées. Personne ne perd le contrôle, tous les rats choisissent le renforçateur alternatif ou stoppent l'auto-administration en présence du choc. Soit le nombre d'animaux testés est trop faible pour observer des animaux qui perdent le contrôle, soit l'exposition préalable à la cocaïne est trop courte pour que s'exprime une perte de contrôle. Il est donc difficile de savoir à quoi correspondent les différences individuelles observées lors de la réinstallation du comportement (Cooper *et al*, 2007; Peck *et al*, 2013). Elles peuvent probablement être interprétées comme une différence de sensibilité aux propriétés motivationnelles d'un stimulus conditionné aux effets de la cocaïne.

Les modèles identifiant une vulnérabilité individuelle

Initialement, un seul modèle a intégré la dimension individuelle dans ses critères de validité de ressemblance et de construit. Il s'agit du modèle multi-symptomatique d'addiction que nous utilisons dans cette thèse (Deroche-Gamonet *et al*, 2004) et que nous décrivons plus loin.

Progressivement, ce critère de dimension individuelle s'impose. BJ Everitt en 2014 indique : *“Experimental animal models of addiction have always faced a major challenge when trying to capture compulsive drug use as they require chronic, not acute, drug self-administration (and therefore, in the case of cocaine or heroin, long-term maintenance of i.v. catheters) and also should reveal individual differences in the propensity to lose control over drug seeking*

and taking. Not every individual who takes drugs loses that control and compulsively uses drugs despite the adverse or aversive consequences of doing so” (Everitt, 2014).

- *Maintien de la recherche de cocaïne malgré la punition par un choc électrique dans un protocole dit de seeking-taking chain* (une séquence de réponses sur un levier *seeking* donne accès à un levier *taking*, une séquence de réponses sur ce levier *taking* déclenche une injection de cocaïne) (Pelloux *et al*, 2007). Comme dans le modèle multi-symptomatique, après une prise prolongée de cocaïne (70 sessions, 5j/7), environ 20% des rats maintiennent le comportement malgré la punition.

- Maintien de la consommation de cocaïne en présence d'un renforçateur alternatif, le sucre.

Ce modèle est un bon exemple de l'importance qu'il y a à considérer les différences individuelles. Il a été initialement développé sans considérer une possible propension individuelle. Même après accès prolongé à la cocaïne, la totalité des individus d'un groupe limité de rats continuait à choisir le sucre quand les deux options étaient proposées. En d'autres termes, et à l'inverse des modèles précédemment décrits où tous les individus « perdaient apparemment le contrôle », ici personne « ne perdait le contrôle ». Ce qui conduit tout autant à écarter le modèle comme modèle d'addiction, voire même à remettre en cause la possibilité d'étudier l'addiction chez le rongeur puisqu'un critère majeur de l'addiction chez l'homme est l'abandon d'autres sources de renforcement au profit de la drogue.

Testant ce comportement sur un nombre suffisant d'individus, il est apparu qu'après accès prolongé à la cocaïne, environ 20% des rats maintiennent la consommation de cocaïne en présence de sucre (Lenoir *et al*, 2013).

La vulnérabilité individuelle est un critère fondamental de l'addiction à la cocaïne. Puisqu'elle contribue aux validités de ressemblance et de construit des modèles (Everitt, 2014; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013), sa prise en compte doit contribuer à l'identification de mécanismes psychobiologiques plus pertinents.

2. La modélisation d'un ou plusieurs symptômes/critères de l'addiction

Modélisation d'un symptôme/critère

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des modèles reproduisent un seul critère d'addiction. Il peut s'agir du maintien de la prise malgré des conséquences néfastes, avec pour objectif de modéliser la prise « compulsive » (Everitt, 2014). Il peut s'agir également de l'abandon d'autres renforçateurs au profit de la drogue comme dans les procédures de choix entre drogue et nourriture palatable ou sucre.

Mais hors des équipes *pionnières* dans ces modèles, souvent, la supposée complexité de ces réponses comportementales conduit les chercheurs à n'introduire dans leur études que la seule dimension d'accès prolongé/étendu à la drogue et à y associer une mesure d'escalade de la prise ou de motivation pour la cocaïne au moyen d'un protocole de ratio progressif.

Modélisation de plusieurs symptômes/critères

Récemment, (Pelloux *et al*, 2015) ont associé les critères de maintien malgré les conséquences néfastes et de désintérêt pour un renforçateur naturel (sucrose). L'étude compare des animaux ayant eu un accès court (*ShA* – 1h/session) et des animaux ayant eu un accès long (*LgA* – 6h/session) à la cocaïne. Entre 15-20% des rats *ShA* et 30% des rats *LgA* montrent un comportement « compulsif » dans cette procédure de punition de la recherche de drogue dans un protocole *seeking-taking chain*. La présence d'un renforçateur alternatif réduit le maintien de la recherche de drogue punie par un choc électrique, mais un nombre significatif de rats maintient son comportement de recherche de cocaïne, en particulier après une expérience prolongée avec la cocaïne (*LgA*) : - de 10 % des rats *ShA* maintiennent la recherche de cocaïne contre 25% chez les rats *LgA*.

Un seul modèle est pluri-symptomatique (Deroche-Gamonet *et al*, 2004). Il consiste en l'opérationnalisation des trois symptômes majeurs de l'addiction humaine tels que définit dans le DSM-IVR (APA, 2000) : 1) une forte motivation pour la drogue, mesurée au moyen d'une procédure de ratio progressif ; 2) la difficulté à contrôler le craving mesurée par la recherche de drogue alors qu'elle est signalée comme indisponible ; 3) le maintien de la prise malgré ses conséquences néfastes, mesuré par la résistance de la recherche et de la prise de drogue alors qu'elles sont associées à une punition (un choc électrique). Ce modèle intègre la dimension individuelle comme un critère majeur d'addiction puisque, sur la base de ces trois critères, l'équivalent d'un diagnostic individuel est établi.

15 à 20 % des rats présentent des scores élevés dans ces trois critères (rats *3crit*) et seulement après une exposition prolongée à la drogue (plus de 60 sessions, 2h d'accès à la cocaïne/session).

En introduisant un aspect dimensionnel au diagnostic et le *craving* comme nouvel item, le DSM5 (APA, 2013) ne remet pas en cause le modèle mais le conforte (Deroche-Gamonet and Piazza, 2014). En effet, ce modèle permet d'identifier des rats qui présentent un score élevé dans un ou deux des 3 critères (rats *1crit* et rats *2crit*) et une majorité de rats (40%) présentant un score faible dans les 3 critères (rats *0crit*). Par ailleurs, les animaux *3crit* (de type *addicts*) présentant un score élevé dans le test de réinstallation du comportement provoqué par la cocaïne, proposé comme modèle de craving provoqué par la drogue (Belin *et al*, 2009).

Enfin, ce modèle présente une caractéristique importante : les différences comportementales entre ces 4 sous-populations (*0crit*, *1crit*, *2crit*, *3crit*) peuvent être

observées en l'absence de différence dans la consommation de cocaïne, d'exposition au contexte de prise de drogue et de pratique du comportement opérant donnant accès à la drogue.

L'approche de (Pelloux *et al*, 2015) est instructive. Une même réponse comportementale (non-inhibition du comportement en réponse à une punition) n'identifie pas le même phénotype après un usage court et un usage long de cocaïne : l'introduction du renforçateur alternatif réduit dramatiquement le nombre d'individus caractérisés 'compulsifs' après un usage court de cocaïne et beaucoup moins après un usage long. Par ailleurs, même si cette baisse est moindre après usage long, des animaux identifiés 'compulsifs' dans une condition (sans renforçateur alternatif), ne le sont plus dans l'autre (avec renforçateur alternatif).

De la même manière, dans le modèle multi-symptomatique, dans chacun des trois tests comportementaux utilisés pour opérationnaliser les critères d'addiction, certains individus se montrent extrêmes. Pour autant, seuls 15-20% des individus se montrent extrêmes dans les trois.

Pour une étude neurobiologique fiable (capable d'identifier des mécanismes pertinents), la question de la nature des individus caractérisés comme *addicts*, et donc de la nature du phénotype étudié et de sa validité par rapport à l'addiction, est essentielle.

3. Etudier la perte de contrôle

Dans leur majorité, les modèles précédemment cités identifient une recherche et/ou une prise inadaptée de drogue après une exposition durable. L'étude de la neurobiologie de l'addiction consiste ensuite à comparer : i. des animaux exposés durablement à la cocaïne (et montrant tous un 'défaut de contrôle') à des animaux moins exposés à la cocaïne (et ne montrant pas ce 'défaut de contrôle'), ii. des animaux exposés durablement à la cocaïne ; les uns montrant un 'défaut de contrôle', les autres pas.

Mais l'addiction se définit, non pas comme un défaut initial de contrôle sur l'usage, mais comme une perte de contrôle. Idéalement, il faudrait donc pouvoir suivre les mêmes individus d'un usage précoce contrôlé à un usage tardif non contrôlé. Cela implique l'existence de facteurs prédictifs de cette perte de contrôle permettant d'identifier précocement les individus qui vont perdre le contrôle. Le modèle multi-symptomatique offre cette possibilité avec un patron précoce de recherche et de prise de drogue différent chez les futurs *addicts* (Belin *et al*, 2009; Kasanetz *et al*, 2010a).

MODELISATION CHEZ L'HOMME

Dans leur majorité, que ce soit pour étudier les mécanismes de l'addiction, pour tester le risque addictif ou le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules, ces modèles

expérimentaux chez l'homme consistent à évaluer les effets subjectifs de la drogue et/ou le *craving* ressenti par le sujet. Mais la validité prédictive, de cette étape intermédiaire entre les modèles animaux et l'étape ultime des essais cliniques longs et coûteux, est presque aussi faible que celle des modèles animaux, en particulier pour ce qui concerne la cocaïne (Haney, 2009).

Depuis le début des années 2000, on commence aussi à questionner la validité des préparations utilisées chez l'homme en laboratoire (Haney, 2009; Sinha and O'Malley, 1999).

Une analyse du craving par des approches multiples, intégrant de la neuroimagerie et des tests psychométriques, a été développée, notamment dans le cadre de l'alcool (Sinha, 2013). Pour la cocaïne, le modèle d'auto-administration chez les patients en laboratoire apparaît comme une alternative intéressante aux mesures des effets subjectifs de la drogue et du craving, avec une validité prédictive qui semble meilleure, en particulier pour la cocaïne (Haney, 2009). En effet, plusieurs molécules, capables de diminuer les effets subjectifs de la cocaïne et le craving, et sans effet sur l'abus de cocaïne évalué dans des essais cliniques, sont également sans effet sur le comportement d'auto-administration en laboratoire. Ce modèle identifie aussi des molécules actives, comme le Modafinil, et permet une caractérisation des mécanismes psychopharmacologiques de leur action. Ainsi, le Modafinil diminue le comportement d'auto-administration de cocaïne, seulement si le travail nécessaire pour l'obtention de la dose de cocaïne est important et la valence du renforçateur alternatif est élevée (Foltin *et al*, 2016).

Connectivité fonctionnelle et Addiction à la cocaïne

LA CONNECTIVITE CEREBRALE

Dans sa thèse, intitulée *Etudes sur la connectivité cérébrale: aspects méthodologiques et applications au cerveau au repos, à la motricité et à la lecture*, Sébastien Treserras définit trois niveaux d'analyse de la connectivité cérébrale ; les niveaux structurel (ou anatomique), fonctionnel et effectif (Treserras, 2008).

La connectivité structurelle, ou anatomique, s'intéresse aux connexions physiques entre groupes de neurones, qui peuvent être étudiées à une échelle locale (intra-structure cérébrale) ou entre structures distantes.

La connectivité fonctionnelle correspond à une étude de la corrélation temporelle des activités de groupes de neurones distincts. Cette corrélation des activités peut mettre en jeu une connectivité anatomique, mais pas nécessairement. L'activité des groupes de neurones d'intérêt peut être communément modulée par un autre groupe neuronal. Il est également

possible que le lien entre les groupes de neurones d'intérêt ne soit pas anatomiquement direct, mais passe par un groupe/une structure intermédiaire.

Comme son nom l'indique, la connectivité effective fait référence à un lien fonctionnel qui ne serait pas juste corrélatif mais, causal. La connectivité fonctionnelle met en lumière une activité coordonnée dans le fonctionnement de groupes de neurones ou de structures cérébrales. La connectivité effective implique la notion de hiérarchie temporelle, impliquant une possible relation causale ; de quel groupe de neurones ou de quelle structure dépend le fonctionnement d'un autre groupe de neurones, ou d'une autre structure. Néanmoins, à l'échelle de la neuroimagerie, cette connectivité effective demeure très corrélative (O'Neill *et al*, 2017).

Les notions de connectivité fonctionnelle et effective sont majoritairement issues de la neuroimagerie, initialement utilisée dans un contexte médical chez l'homme, puis dans un contexte de recherche, chez l'homme, le primate non humain puis plus récemment chez le rongeur.

Mais le terme de connectivité fonctionnelle apparaît dans PubMed en 1983 et concerne des études sur le cortex auditif du chat au moyen de l'électrophysiologie (Kimura *et al*, 1976). L'étude de la connectivité bénéficie d'approches complémentaires à la neuroimagerie, en particulier chez l'animal. Il s'agit d'approches plus invasives mais qui offrent une meilleure définition spatiale et temporelle. Par ailleurs, chez l'animal, il peut être fait une réelle distinction entre connectivité fonctionnelle (corrélative) et connectivité effective (causale). Au cours des dix dernières années, les approches se sont raffinées. Ainsi, par des techniques variées que nous évoquerons plus loin, il est possible de mesurer simultanément l'activité dans des populations neuronales au sein de plusieurs structures cérébrales différentes, et ainsi d'établir des liens fonctionnels, corrélatifs, entre ces populations neuronales. Il est également possible de manipuler cette connectivité fonctionnelle et ainsi établir des liens de causalité.

CONNECTIVITE CEREBRALE, NEUROPSYCHIATRIE ET ADDICTION A LA COCAÏNE

Le potentiel de la neuroimagerie fonctionnelle chez l'homme a beaucoup évolué, au cours des 25 dernières années, de la mesure de l'activité au sein d'aires cérébrales isolées à celle de co-activations entre plusieurs régions distantes. Des réseaux de structures fonctionnellement connectées (*networks*) ont ainsi pu être identifiés, notamment au repos (*resting state functional connectivity*).

Il est important de noter que connectivités fonctionnelle (ou effective) et structurelle sont étroitement liées. Notamment, si la structure d'un réseau détermine sa fonction (Honey *et al*, 2007), il a aussi été clairement montré que le fonctionnement des réseaux neuronaux

influence leur structure, avec la formation ou l'élimination de connexions. Ainsi les notions de connectivité et de plasticité cérébrales sont étroitement liées. On connaît de nombreux exemples de « façonnage » cérébral par l'expérience. C'est le cas de l'apprentissage de la musique (Cantou *et al*, 2017) qu'on propose même aujourd'hui comme un outil thérapeutique dans des maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (Guetin *et al*, 2013).

Des changements de connectivité accompagnent l'acquisition de compétences chez le sujet jeune (Cantou *et al*, 2017) mais aussi chez l'adulte (Wang *et al*, 2015).

L'étude de ces réseaux prend une place de plus en plus importante en neuropsychiatrie. La connectivité fonctionnelle est proposée comme une cible potentielle des expériences précoces traumatisantes (Teicher *et al*, 2016). Des altérations de connectivité fonctionnelle ont été associées à de nombreux désordres dont l'Alzheimer (Zhao *et al*, 2017), l'autisme (Keown *et al*, 2017), la schizophrénie (Du *et al*, 2017), mais aussi l'addiction à la cocaïne (Goldstein and Volkow, 2002, 2011a; McHugh *et al*, 2017; Sutherland *et al*, 2012), d'autres sont des marqueurs de la réponse aux traitements (pour revue O'Neill *et al*, 2017).

La capacité d'auto-manipuler la connectivité cérébrale, en couplant la technique de neurofeedback à la fMRI, est explorée chez les sujets sains (Watanabe *et al*, 2017; Yamashita *et al*, 2017), mais aussi comme un outil thérapeutique dans l'autisme (Ramot *et al*, 2017), l'Alzheimer (Zhao *et al*, 2017), l'abus d'alcool (Karch *et al*, 2015) ou la dépendance au tabac (Kim *et al*, 2015). Controversée (Thibault *et al*, 2016; Thibault and Raz, 2016), notamment dans sa version couplée à l'EEG, cette approche, couplée à la fMRI, fait l'objet d'investigations poussées qui doivent permettre à terme d'écarter l'hypothèse d'éventuels effets placebo.

La synchronisation des activités neuronales oscillatoires apparaît comme un facteur fondamental de la fonctionnalité de ces réseaux (Chan *et al*, 2017a; Schnitzler and Gross, 2005) et de l'élaboration de réponses comportementales adaptées (Dejean *et al*, 2016; Karalis *et al*, 2016).

CONNECTIVITE CERVEALE ET ADDICTION A LA COCAÏNE

Un travail considérable a été produit au cours des 50 dernières années, notamment chez l'animal, puis plus récemment chez l'homme, qui a conduit aux conceptions courantes de l'addiction et de sa neurobiologie.

Les travaux réalisés, grâce aux études chez l'animal, ont largement contribué à l'identification de structures, et de leurs projections, impliquées dans les réponses conditionnées et inconditionnées à la drogue, dans le comportement opérant renforcé par la drogue. L'intégration de ces données a permis de concevoir un ensemble de théories sur les

mécanismes psycho- et neurobiologiques de l'addiction. Des revues récentes synthétisent, voire intègrent, l'ensemble de ces conceptions de l'addiction (Everitt, 2014; Koob and Volkow, 2010, 2016; Piazza and Deroche-Gamonet, 2013).

L'addiction en général est désormais conçue comme le résultat d'altérations, au sein et entre les circuits cérébraux impliqués dans les processus motivationnels, émotionnels et de contrôle cognitif (Goldstein *et al*, 2009; Goldstein and Volkow, 2011a; Hyman *et al*, 2006; Koob and Volkow, 2016), qui apparaîtraient avec l'usage, ou pour certaines préexisteraient (Ersche *et al*, 2005), mais uniquement dans une sous-population d'usagers vulnérables.

Les études cliniques et précliniques proposent notamment que l'addiction implique un déséquilibre fonctionnel entre les structures et circuits cortico-subcorticaux qui gèrent la valeur motivationnelle de la drogue (Goldstein and Volkow, 2011a; Hyman *et al*, 2006; Koob and Volkow, 2010) et ceux qui sont impliqués dans le contrôle cognitif inhibiteur (Baler and Volkow, 2006; Kober *et al*, 2010; Mihindou *et al*, 2013; Volkow *et al*, 2010). Ces changements seraient au cœur de ce que R. Goldstein and N. Volkow appellent le syndrome *I-RISA* pour '*Impaired response inhibition and salience attribution*' ou 'réponse d'inhibition et attribution de saillance altérées' (Goldstein and Volkow, 2002).

Des changements séquentiels (Belin and Everitt, 2008; Belin-Rauscent *et al*, 2012; Lüscher and Malenka, 2011), dans des circuits interconnectés, qui incluraient notamment, chez le rongeur, le noyau basolatéral de l'amygdale, le noyau accumbens et le cortex préfrontal, seraient responsables de processus motivationnels pathologiques et d'une difficulté à inhiber la recherche et la consommation de drogue.

La découverte que les drogues, et notamment la cocaïne, peuvent affecter durablement la plasticité synaptique, et la connectivité structurelle, a été une étape décisive, offrant un possible mécanisme cellulaire et moléculaire à ces changements progressifs, mais durables à l'échelle de circuits (Lüscher and Malenka, 2011).

Cette conception neurobiologique de l'addiction doit aussi beaucoup aux études de connectivité fonctionnelle en neuroimagerie chez l'homme. Un nombre important de réseaux fonctionnels ont été identifiés actifs, au repos. Notamment certains de ces réseaux ont plus particulièrement été reliés à l'addiction à la cocaïne. Il s'agit des réseaux du mode par défaut (*default mode network*), du contrôle exécutif (*executive control network*) et de la saillance (*salience network*).

Des altérations de connectivité au repos, au sein de ces réseaux (Goldstein and Volkow, 2002), ainsi qu'entre ces réseaux, et notamment entre les réseaux de la saillance et du mode en défaut (Liang *et al*, 2015), ont été identifiées dans l'addiction à la cocaïne. Des perturbations dans les interactions entre les réseaux de la saillance et du mode par défaut prédisent le risque de rechute (Geng *et al*, 2017), alors que le risque de rechute est d'autant

moindre que la force de la connectivité inter-hémisphérique entre les réseaux du contrôle exécutif droit et gauche et la force de la connectivité inter-hémisphérique entre le réseau du contrôle exécutif et celui de la saillance sont élevées (McHugh *et al*, 2017).

Le réseau du mode par défaut (Mak *et al*, 2017) est un des réseaux actifs lorsque le sujet est au repos et non-engagé dans des activités dirigées vers un but. Il est en lien avec l'introspection. Dans l'addiction, on le considère impliqué dans les pensées de rumination vis-à-vis de la drogue, par exemple (Sutherland *et al*, 2012). Il inclut notamment les cortex préfrontal médian et cingulaire postérieur.

L'activation du réseau du mode par défaut s'accompagne du désengagement du réseau du contrôle exécutif et de déficits des processus attentionnels et cognitifs auxquels ce réseau du contrôle exécutif participe, via le cortex préfrontal latéral, pariétal et temporal médian. La dépendance à la cocaïne est associée à des altérations de connectivité au sein de ce réseau (en particulier les régions du cortex frontal) et à des déficits du contrôle exécutif associés à ce type d'altérations (Goldstein and Volkow, 2002).

Le réseau de la saillance inclut l'insula antérieure et le cortex cingulaire antérieur. Il est notamment activé pendant la présentation de stimuli associés à la cocaïne (Garavan *et al*, 2000). Il est proposé qu'il intervienne dans la détection des événements saillants issus des milieux internes ou externes puis dans l'allocation des ressources attentionnelles et cognitives pour la production d'une réponse comportementale optimale. Il agirait pour cela en organisant un switch d'activité du réseau du mode en défaut au réseau du contrôle exécutif, ou vice-versa, selon les besoins (Menon and Uddin, 2010).

A ces altérations de connectivité fonctionnelle au repos, des altérations de connectivité fonctionnelle dans ces réseaux ont été identifiées, en réponse à des facteurs connus pour promouvoir le *craving* (des stimuli environnementaux associés à la cocaïne) (Ray *et al*, 2015), et lorsque le contrôle cognitif inhibiteur est mobilisé (Lam *et al*, 2013; Volkow *et al*, 2010).

Mais ces études de neuroimagerie chez l'homme, qui commencent à identifier des altérations de connectivité chez des sujets dépendants à la cocaïne, utilisent majoritairement, une approche qui consiste à comparer des sujets contrôles sains à des usagers de cocaïne ou des individus diagnostiqués pour un désordre lié à l'usage de cocaïne. Il est donc difficile de conclure de façon certaine que les altérations observées sont en lien avec l'addiction ou sont des effets d'une prise chronique de cocaïne. Par ailleurs, il est également difficile de savoir si les différences observées pré-existent ou résultent de l'usage chronique de cocaïne.

Néanmoins, chez l'homme, comme récemment chez l'animal, de nouvelles approches expérimentales, intégrant la notion de vulnérabilité, émergent et sont appliquées aux études de neuroimagerie. Des études récentes, qui se focalisent essentiellement sur les mécanismes

de rechute, et qui consistent à utiliser des marqueurs de connectivité comme prédicteurs du risque de rechute (Geng *et al*, 2017; McHugh *et al*, 2017), sont, non seulement essentielles en tant qu'outils diagnostiques, mais informent de façon fiable sur les mécanismes de rechute. Egalement, par la comparaison de fratries, les travaux du Dr K. Ersche à Cambridge permettent de commencer à dissocier les altérations cérébrales qui pré-existent, de celles provoquées par la drogue, chez des sujets à risque pour l'addiction à la cocaïne (Ersche *et al*, 2012).

Données de connectivité chez le rat obtenues au moyen des modèles d'addiction

Chez l'animal, très peu d'études de connectivité cérébrale ou mesurant l'activité cérébrale dans différentes structures simultanément ont été réalisées, que ce soit au moyen de la neuroimagerie ou au moyen d'autres techniques. Et plus particulièrement, sur les modèles animaux évoqués précédemment et qui ont pour vocation de reproduire au plus près les caractéristiques de la pathologie.

Chez le rat, essentiellement une étude majeure de neuroimagerie, s'est intéressée à la mesure de la connectivité fonctionnelle au repos chez des rats abstinents à la cocaïne (Lu *et al*, 2014) après un protocole d'accès étendu associé à une escalade de la prise (Ahmed and Koob, 1998). Lu *et al*. (2014) observent des baisses de connectivité entre le PL et le noyau entopeduncular, ainsi qu'entre le NAcCore et le PFC dorso-médian (dmPFC), chez les rats ayant une expérience d'auto-administration de cocaïne, en comparaison d'animaux naïfs ou d'animaux s'étant auto-administrés du sucrose. De façon notable, seule la connectivité entre le NAcCore et le dmPFC était liée au degré d'escalade de la prise de cocaïne. Par ailleurs, alors que l'auto-administration de cocaïne était associée à une baisse générale de connectivité entre les deux structures, l'indice de connectivité et le degré d'escalade étaient eux positivement corrélés, à savoir que plus l'escalade était importante plus la connectivité était élevée, compromettant l'hypothèse que la baisse de connectivité entre les deux structures soit un marqueur neurobiologique de l'addiction à la cocaïne. Au contraire, la baisse de connectivité provoquée par la cocaïne pourrait contribuer à, et être un marqueur de, résilience à l'addiction.

Cette observation conforte l'idée que la vulnérabilité et l'étude des différences interindividuelles doivent être au cœur des stratégies expérimentales pour identifier des altérations neurobiologiques qui soient spécifiques de l'addiction.

Par ailleurs, après un même protocole d'accès étendu associé à une escalade de la prise et au moyen d'une cartographie Fos à large échelle et haute résolution, (Navailles *et al*, 2015) ont montré que le contrôle inhibiteur sur la recherche de cocaïne est associé au recrutement coordonné de différents circuits cortico-striataux et de différents systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques mésencéphaliques connus pour moduler l'activité de ces circuits.

Après le même type de protocole, suivi d'une période plus ou moins longue de sevrage, (Nicolas et al, 2017) ont étudié l'activité métabolique au moyen de la tomographie par émission de positron couplée au 2-deoxy-2-(18F)fluoro-d-glucose (18FDG-PET). Par rapport à des rats naïfs, les rats *Short* et *Long Access* présentent des changements similaires dans l'activité métabolique cérébrale de base. Comparés au *Short Access*, les rats *Long Access* présentent des changements métaboliques plus intenses et plus durables dans un ensemble de structures : diminution dans le cortex cingulaire antérieur, le cortex insulaire et le striatum dorsal ; augmentation dans le mésencéphale, l'amygdale et l'hippocampe. Il est difficile de conclure que ces différences ont un lien direct avec l'addiction à la cocaïne. En effet, prise seule, l'escalade de la prise de cocaïne modélise une consommation excessive consécutive à un usage prolongé de cocaïne que présente l'ensemble des rats *Long Access*, questionnant la validité de ressemblance avec l'addiction. Par ailleurs, en absence de relation causale, ces différences entre *Short* et *Long Access* pourraient résulter de la différence dans la quantité de cocaïne consommée mais ne pas déterminer les différences comportementales (notamment escalade de la prise) entre les deux groupes. Néanmoins, il est particulièrement intéressant de noter que le patron métabolique des *Long Access* correspond à celui décrit chez l'homme par R. Goldstein et N. Volkow sous le nom d'I-RISA ('Impaired response inhibition and salience attribution').

Au moyen du modèle multi-symptomatique d'addiction à la cocaïne (Deroche-Gamonet et al, 2004), des données en IRM structurelle ont été obtenues grâce à la mesure des volumes de substance grise (VSG) (Cannella et al, 2017) chez des rats *addicts* et *non-addicts* non sevrés de la cocaïne. Il s'agit là de différences structurelles et non fonctionnelles, mais structure et fonction étant liées, elles constituent des données intéressantes. L'étude révèle notamment deux données notables : 1. les scores dans chacun des trois critères d'addiction corréleront avec le VSG de structures cérébrales différentes. En d'autres termes, les trois tests comportementaux semblent bien mesurer des dimensions différentes ; 2. La nature des corrélations (positive, négative ou pas de corrélation) dépend du statut des animaux, *addicts* ou *non-addicts*. La drogue ou des différences pré-existantes façonneraient les structures cérébrales impliquées dans ces différentes réponses comportementales conduisant à des altérations fonctionnelles.

En conclusion, la connectivité fonctionnelle apparaît donc, non seulement comme un marqueur, mais aussi comme un mécanisme physiopathologique de l'addiction à la cocaïne. La neuroimagerie, particulièrement si elle est couplée à des modèles précliniques pertinents, peut être un outil essentiel pour une recherche translationnelle sur la neurobiologie de l'addiction. En effet le raffinement, progressif des techniques de neuroimagerie chez l'animal doit permettre de mesurer, avec la même technique, les mêmes variables, chez l'homme et

chez l'animal, puis d'explorer avec des approches plus invasives, mais plus fines, les circuits chez l'animal.

Néanmoins, la neuroimagerie présente le défaut de ne pas pouvoir être facilement pratiquée chez l'animal vigile (scanner trop bruyant et nécessité d'immobilité), sans compter l'impossibilité d'émettre un comportement. Ainsi, certaines dimensions, comme la réponse comportementale à des stimuli associés à la drogue ou la capacité d'inhibition cognitive, sont difficilement testables dans un scanner chez l'animal. Pour ces deux raisons, il est fondamental de pouvoir explorer et manipuler les circuits de l'addiction en temps réel chez des animaux se comportant. Nous allons voir dans le paragraphe suivant les techniques disponibles pour explorer, dans de telles conditions, la connectivité fonctionnelle chez le rongeur.

COMMENT ETUDIER LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE CHEZ L'ANIMAL

Comment mesurer la connectivité chez l'animal

La caractérisation des circuits neuronaux impliqués dans l'addiction est essentielle pour la compréhension de cette pathologie. Identifier les structures mise en jeu, la nature de leur implication et de leurs interactions, dans les mécanismes des CUDs est décisive pour envisager de trouver un traitement efficace. Dans ce chapitre, nous ferons une présentation non exhaustive, des méthodes les plus utilisées actuellement, chez l'animal, permettant d'identifier et de mesurer les connectivités structurelles (anatomiques) et fonctionnelles. Nous essaierons d'en décrire les avantages et les limites et de justifier le choix des techniques que nous avons utilisées dans ces travaux de thèse.

Etudes des connectivités fonctionnelles et anatomiques

Les méthodes ex vivo :

Les méthodes de traçage ont beaucoup évoluées avec le temps. A leur début, elles utilisaient des substances chimiques, telle que la méthode d'imprégnation développée par Camille Golgi qui, par réaction du nitrate d'argent avec le bichromate de potassium, produit un dépôt noir au niveau des membranes. C'est cette méthode qui a été utilisée par le neuroanatomiste espagnol Santiago Ramón y Cajal, et qui lui a permis de visualiser pour la première fois un neurone dans sa totalité inclus dans une coupe de tissu sous microscope optique (Levine and Marcillo, 2008). Bien que les méthodes physico-chimiques soient encore couramment utilisées, les méthodes de traçage les plus répandues aujourd'hui utilisent des outils issus de la biologie moléculaire. Il existe en effet, toute une panoplie de vecteurs viraux qui, combinée au développement permanent des techniques d'imagerie, participe grandement aux avancées dans ce domaine. Michel Dolivo (Dolivo et al. 1982) a été le premier à les utiliser comme moyen de traçage. Il a en effet montré chez le rat, que des virus avaient la capacité de remonter de la rétine au système nerveux central via le nerf optique.

Ces résultats ont été le point de départ de l'utilisation de virus pour effectuer du traçage neuronal. Les collaborations entre les neurobiologistes et virologues ont permis d'améliorer considérablement les outils disponibles. On peut les classer en deux grandes familles : les vecteurs rétrogrades qui ont la capacité de remonter de la synapse au corps cellulaire et les marqueurs antérogrades qui à l'inverse peuvent remonter l'axone à partir du soma. Les progrès récents dans ce domaine ont permis de créer des constructions capables de se propager simultanément de façon rétrograde et antérograde. Certains d'entre eux, issus des virus rabiques, ont la capacité de passer les synapses (trans-synaptique), d'autres sont monosynaptiques. Ces évolutions augmentent le choix des outils mis à disposition pour répondre au mieux aux études que l'on souhaite réaliser. Une autre avancée a consisté à leur associer une protéine fluorescente pour qu'ils soient visibles directement sans avoir recours à des marquages immunologiques. La dernière amélioration à consister à les rendre spécifiques de populations ou sous-populations neuronales. Grâce à ces outils, il est donc possible de visualiser des interactions potentielles entre neurones et des circuits neuronaux suite à une injection intracérébrale ciblée. L'utilisation de lignées transgéniques de souris ou les injections combinées de plusieurs virus permettent d'améliorer la spécificité et la résolution de ces marquages. Il est désormais possible d'effectuer des reconstitutions 3D du cerveau à partir de coupes. Une technique récemment mise au point vient de révolutionner la recherche dans ce domaine, c'est une technique de transparençation qui consiste à retirer les lipides membranaires en gardant toute l'intégrité du tissu, le rendant optiquement transparent, ce qui permet d'observer sur cerveau entier les neurones marqués par les traceurs viraux et d'établir une cartographie précise de leurs projections (Chung *et al*, 2013). Il est également possible, après transparençation, d'effectuer des marquages immuno-histochimiques pour améliorer la détection et identifier des populations ou structures cellulaires qui n'auraient pu l'être avant. Les limitations actuelles avec cette approche sont liées aux outils optiques qu'il faut adapter à cette nouvelle technique, et notamment des objectifs à immersion dotés d'une meilleure résolution pour imager plus particulièrement les tissus en profondeur. Ces méthodes de traçage bien que donnant une image figée des interactions neuronales ou des réseaux, sont essentielles pour l'étude des interactions potentielles entre les neurones et les circuits neuronaux. Les identifier et les répertorier est primordial pour étudier par la suite leur implication dans les comportements observés chez l'animal. Comme cela est décrit dans cette revue du Dr Andréas Frick (Ginger *et al*, 2013), ces outils, développés initialement pour faire du traçage, sont utilisés désormais en raison de leur capacité de ciblage, de leur activation conditionnelle en réponse à des événements spécifiques, comme outils pour cibler et contrôler les manipulations des neurones ou réseaux, en les combinant avec des méthodes d'activation et d'inactivation que je décris plus en détails dans les paragraphes suivants.

Les méthodes *in vivo* sur animal anesthésié

Les techniques de neuro-imagerie sont nombreuses mais la plus utilisée est l'imagerie par résonance magnétique (Jonckers *et al*, 2015). Elle permet de façon indirecte de mesurer l'activité cérébrale spontanée. Basée sur l'effet BOLD pour (blood oxygen level dependant), elle enregistre les variations de flux sanguin qui interviennent au niveau des zones cérébrales actives. Elle peut être utilisée pour faire des études de connectivités structurales, mais également dans une moindre mesure, des études fonctionnelles en utilisant des marqueurs de l'activité neuronale, tels que des promoteurs c-fos couplés à des ions à fort pouvoir magnétique. Il est ainsi possible de mesurer l'activité neuronale de repos, mais également celle produite en réponse à des stimuli ou des agents chimiques. Dans ce cas, elle permet de déterminer quelles sont les cibles neuro-anatomiques des molécules injectées de façon aiguë ou chronique, en comparant par exemple, un groupe ayant reçu l'agent pharmacologique ou la drogue à un groupe ayant reçu le solvant. Cette technique a une résolution temporelle de l'ordre de la seconde et une très bonne résolution spatiale. Réalisée sur animal vivant, elle reste très informative bien qu'elle implique que les animaux soient anesthésiés ou un minimum sédatisés. C'est sa principale limite, ainsi que le coût du système d'enregistrement, mais elle est non invasive, contrairement à la tomographie par émission de positrons, également utilisée, mais qui nécessite l'injection de traceurs radioactifs.

Il est également possible de réaliser des enregistrements électrophysiologiques sur animal anesthésié (Fenton *et al*, 2014). Là aussi, la limitation est liée aux possibles effets de l'anesthésie, mais cela permet de faire des études de réseaux et de valider l'efficacité d'une approche expérimentale - comme nous avons pu le faire dans le chapitre 2 de ce travail de thèse. Dans un article de méthodes, (Schjetnan and Luczak, 2011) décrivent en détail comment réaliser des enregistrements conjoints (multi-site) dans des régions distantes, permettant d'envisager des études de connectivité sur des grandes populations de neurones, selon le nombre d'électrodes utilisées.

Les méthodes *in vivo* sur animal se comportant

Mesures uniques :

L'expression du gène de réponse précoce c-fos est un marqueur de l'activité cellulaire, couramment employé pour identifier des structures, des réseaux ou des régions pouvant être impliquées dans une réponse comportementale donnée. Après exposition de l'animal à un stimulus aigu et prélèvement du cerveau au pic de réponse de la protéine c-fos (entre 90 et 120 minutes après l'exposition), il est possible d'identifier post-mortem les zones cérébrales qui ont été activées par ce stimulus, en mesurant son expression (Zlebnik *et al*, 2014). Cette méthode a pour avantage d'être facile à mettre en œuvre et d'être très informative. Elle peut être utilisée pour identifier des cibles potentielles pour des études

fonctionnelles, mais elle nécessite dans sa forme la plus classique d'effectuer une étape d'immunohistochimie permettant de visualiser l'expression de c-Fos. De nombreuses approches de traçage ont été développées qui utilisent cette propriété des cellules activées à exprimer c-fos, pour identifier des neurones ou des populations de neurones activés dans un contexte d'apprentissage ou en réponse à des stimuli. C'est le cas des souris FTL (fos-tau-LacZ) ou des rats cfos-LacZ, qui, suite à l'exposition à un stimulus, expriment le gène LacZ, sous la dépendance du promoteur c-fos, au niveau des neurones activés et de leurs projections. Ce système permet de visualiser sur tranches, ou sur cerveau entier, après des traitements histochimiques ou immunohistochimiques, la β -galactosidase produit du gène LacZ au niveau des neurones et circuits neuronaux qui ont été activés en réponse au stimulus (Wilson *et al*, 2002) ; (Butler *et al*, 2015) ; (Funk *et al*, 2016). Pour exemple, (Murphy *et al*, 2007) présentent des coupes coronales de cerveaux de souris où l'on peut identifier les neurones activés en réponse à la présentation d'un stimulus aversif. Dans d'autres cas, le transgène intègre directement une protéine fluorescente, c'est le cas chez les souris et rats c-fos-GFP. Dans ces conditions, la protéine fluorescente (GFP) est sous la dépendance du promoteur c-fos, et elle n'est donc exprimée que lorsque la cellule, dans laquelle elle est intégrée, s'active, ce qui permet d'identifier ces cellules, spécifiquement activées en réponse à un stimulus, au microscope confocal, par exemple. Cette méthode de marquage permet également de visualiser les cellules sur tranches et donc d'étudier spécifiquement leurs propriétés électrophysiologiques au travers de méthode de patch sur cellules entières, par exemple. Cette approche est un très bon outil pour étudier des cellules activées en réponse à un stimulus ou une tâche comportementale donnée et les comparer à des cellules situées à proximité mais qui ne sont pas activées par le même stimulus. Grâce à cette méthode (Cruz *et al*, 2013), les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'efficacité synaptique glutamatergique spécifiquement dans les cellules activées lors d'une réinstallation du comportement de recherche de nourriture provoquée par la yohimbine. Un des inconvénients de ces techniques, c'est qu'elles ne sont pas applicables à des tâches comportementales complexes, mais uniquement en réponse à des stimuli ou des comportements appris. Mais nous verrons, dans le paragraphe suivant, qu'elles peuvent être combinées à d'autres approches pour moduler l'activité neuronale.

Mesurées répétées :

L'imagerie calcique bi-photonique. Plus récemment, une nouvelle technique d'imagerie a vu le jour. Elle consiste à visualiser l'activité électrique de neurones, au travers de l'activité calcique qui lui est associée et qui peut être mesurée suite à l'injection d'un vecteur viral codant pour un marqueur calcique coloré. Lorsqu'elle est combinée à un microscope bi-photonique, il est possible de suivre l'activité neuronale des cellules marquées chez un animal anesthésié ou dont la tête est fixée dans un environnement de réalité virtuelle dans une allée droite (Tian *et al*, 2009) ou sur une sphère. Cette technique a une très bonne

résolution temporelle et spatiale, mais est limitée actuellement à l'étude des couches superficielles du cerveau. Par ailleurs, bien qu'elle soit utilisable chez l'animal contraint et qu'elle soit en cours de développement chez l'animal libre de se mouvoir, elle ne permet pas pour le moment de faire des mesures chez l'animal libre de se comporter.

L'électrophysiologie. Qu'il s'agisse de l'enregistrement des potentiels de champ (qui est la résultante des potentiels d'action post-synaptiques issus des neurones situés à proximité de l'électrode) ou des courants unitaires, l'électrophysiologie est une méthode qui a une très bonne résolution temporelle. En effet, il est possible de mesurer, en temps réel, l'activité neuronale de plusieurs neurones simultanément. Cette approche a aussi l'avantage de pouvoir être utilisée sur l'animal se comportant. Les enregistrements des activités unitaires ou des potentiels de champ peuvent être synchronisés avec les différentes entrées/sorties d'une cage de comportement opérant, par exemple. Il est ainsi possible d'identifier, les effets de la présentation d'indices, ou même de l'exécution d'une tâche comportementale, sur l'activité des neurones enregistrés. De plus, l'utilisation d'enregistrements multi-sites permet de faire des études de connectivité fonctionnelle, entre des zones ou des structures différentes, pouvant être très éloignées (Harris *et al*, 2017; Karalis *et al*, 2016). Il est alors possible d'identifier les populations neuronales impliquées dans une réponse comportementale donnée, ainsi que les interactions qui peuvent exister entre les structures ciblées. C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi d'utiliser cette méthode pour les études présentées dans le premier chapitre de ce travail de thèse. Néanmoins, comme toute technique, celle-ci n'est pas sans inconvénient. Une de ses qualités majeures, sa très bonne résolution spatiale, peut aussi constituer une limite. En effet, le champ de détection est limité à quelques micromètres autour de l'électrode et les électrodes ne couvrent pas de grandes surfaces. L'activité neuronale détectée est donc limitée à celle que l'on peut enregistrer. Par ailleurs, pour l'instant, une telle approche électrophysiologique multi-site a surtout été couplée à des réponses comportementales relativement simples, de type immobilisation de peur, ou comportement d'approche, en réponse à un stimulus conditionné (Burgos-Robles *et al*, 2017). Le couplage à un comportement opérant complexe est encore rare.

Comment manipuler la connectivité fonctionnelle chez l'animal

Manipulations irréversibles ou durables

Une des grandes difficultés et un objectif majeur des neurosciences est de mettre en évidence une relation de causalité entre l'activité des neurones d'une part et une réponse physiologique (ou comportementale) d'autre part, en d'autres termes d'identifier les circuits neuronaux qui sont à l'origine de l'émission d'un comportement donné. Ces réponses, en fonction de leur complexité, peuvent être la résultante de l'activité simultanée de multiples structures cérébrales, chaque structure étant elle-même composée d'un ensemble de

cellules neuronales différentes, de par leurs tailles, leurs formes, leurs fonctions. Il est indispensable de développer et d'utiliser des approches toujours plus sélectives, et le moins invasives possibles, pour manipuler ces voies après les avoir identifiées et ciblées.

Les lésions

Qu'elles soient neurotoxiques ou électrolytiques, les lésions ont pour principal inconvénient leur irréversibilité. Si elles peuvent être effectuées avec une bonne résolution spatiale dans le cas des lésions électrolytiques, c'est moins le cas lorsqu'il s'agit de lésions chimiques ou toxiques, même s'il est possible de travailler avec de très faibles volumes. Avant d'envisager l'utilisation de méthodes plus complexes et coûteuses, ces approches, bien que peu spécifiques, peuvent être une première étape intéressante pour connaître l'implication d'une ou de plusieurs structures dans un comportement donné (Schenk *et al*, 1991) puisqu'elles sont assez faciles à mettre en œuvre. Ainsi, (Schenk *et al*, 1991) ont étudié les effets, d'une lésion du mPFC à la 6-hydroxydopamine, sur l'acquisition et le maintien de l'auto-administration intraveineuse de cocaïne chez le rat. Ils observent chez les animaux lésés une très forte augmentation de la sensibilisation aux effets renforçant de la cocaïne.

Les inactivations

Comparées aux lésions, les inactivations chimiques ont l'avantage d'être réversibles. Malgré tout, à terme, elles peuvent induire des lésions. La réversibilité est en effet limitée à 2 ou 3 injections, avec une durée d'inactivation qui est différente en fonction des produits utilisés (Brandon *et al*, 2014a). Ces approches, même si elles ont les mêmes inconvénients que les lésions chimiques, c'est à dire leur faible spécificité et résolution spatiale, ont le gros avantage d'être réversibles ce qui permet d'envisager l'étude des réseaux ou structures ciblées dans différentes conditions expérimentales. Grâce à cette approche, les auteurs ont évalué l'impact d'une inactivation du septum médian, par une injection intra-structure de muscimol, sur la mise en place de nouvelles représentations spatiales lorsque les animaux sont placés dans un nouvel environnement. Cette inactivation est utilisée pour supprimer les oscillations thêta et l'activité des cellules de grille. Les auteurs ont montré que malgré cette inactivation, les rats étaient encore capables de coder un nouvel espace. Grâce à cette approche, ils ont pu montrer que les oscillations thêta et les cellules de grille n'étaient pas nécessaires à la mise en place de nouvelles représentations spatiales.

Les inactivations et activations

La chémogénétique

Les DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Ce sont des outils de chémogénétique de plus en plus utilisés en neuroscience pour manipuler l'activité neuronale. Cette méthode consiste à injecter des vecteurs viraux dans des zones ciblées. Ces vecteurs sont capables d'exprimer spécifiquement au niveau des cellules infectées, des récepteurs (dérivés de récepteurs muscariniques humain hM3Dq ou hM4Di) mutés qui sont,

selon leur construction, activables ou inactivables par un métabolite inerte non endogène de la clozapine, le CNO (Roth, 2016). Cette approche a plusieurs avantages par rapport aux inactivations décrites dans le paragraphe précédent. D'une part, il est possible de faire des inactivations mais également des activations. Les progrès récents dans ce domaine ont permis de concevoir des constructions virales capables d'exprimer sur les neurones infectés des récepteurs pouvant inhiber ou activer les populations neuronales en fonction de la drogue injectée. D'autre part, les progrès de la génétique ont permis de créer des vecteurs viraux possédant des promoteurs spécifiques de populations neuronales données. Bien que la résolution temporelle soit assez faible et comparable à celle des inactivations classiques, avec un effet qui intervient dans l'ordre d'une trentaine de minutes et qui dure plusieurs heures, les progrès dans ce domaine sont permanents et il existe désormais des récepteurs couplés à des promoteurs de type c-fos. Dans ce cas, suite à l'injection de CNO, les récepteurs ne sont actifs que lorsque les cellules, sur lesquelles ils sont exprimés, s'activent.

Autres outils de chémogénétique. Ils combinent une composante génétique et une composante chimique comme les DREAADs. Le plus souvent développés chez la souris au travers de lignées transgéniques, c'est le cas des systèmes de contrôle d'expression de gènes, Tet-ON/Tet-OFF, qui permettent d'activer ou d'inactiver des populations de neurones selon que le transactivateur, la doxycycline, un dérivé de la tétracycline, est présent ou pas. Chez les lignées de souris transgéniques c-fos-tTA, le transgène contient un promoteur c-fos qui régule la transcription de la séquence qui code pour l'activateur transcriptionnel tet-off (tTA). En présence de doxycycline, l'activité transcriptionnelle du tTA est inhibée. Ce système est intéressant puisqu'il ajoute une composante conditionnelle. Pour cela il est nécessaire d'introduire un deuxième transgène possédant un opérateur de transcription Tet associé à la protéine que l'on souhaite voir exprimer (GFP, opsine). Dans ce cas, lorsque l'on retire la doxycycline de l'eau de boisson ; le tTA peut se fixer sur l'opérateur de transcription et induire l'expression de la protéine combinée. Ainsi, dans ce système Tet-ON/Tet-OFF, la protéine, associée à ce promoteur, n'est exprimée que lorsque les cellules sont actives et uniquement en absence de doxycycline (retirée de l'eau de boisson, par exemple). Il est donc possible de choisir à quel moment la construction doit être active et de l'inactiver de nouveau en réintroduisant le transactivateur (Trouche *et al*, 2016). Je propose de décrire plus en détail l'article de (Trouche *et al*, 2016), car il regroupe une grande palette de techniques pour visualiser, cibler et manipuler la connectivité neuronale. Il donne une bonne idée du potentiel et de l'apport considérable de ces approches pour la compréhension de la fonctionnalité des circuits neuronaux, dans un contexte normal ou pathologique. Les auteurs étudient le rôle de l'HPc dans l'encodage du contexte et des expériences passées, associé à la consommation d'une drogue. Leur objectif est d'inhiber spécifiquement les populations neuronales hippocampiques impliquées dans cet encodage. Pour répondre à cette problématique, les auteurs avaient besoin d'identifier, puis d'inhiber, spécifiquement les

populations de neurones impliquées dans l'encodage associatif drogue/contexte. Pour identifier et manipuler ces cellules, les auteurs ont utilisé des souris transgéniques c-fos-tTA auxquelles ils ont injecté bilatéralement, au niveau de la zone CA1 dorsal de l'HPc, un vecteur viral TRE3G-ArchT-GFP. Ce transgène code pour l'archéorodopsine et pour une protéine fluorescente, sous la dépendance du promoteur TRE3G (Elément de réponse à la tétracycline ou opérateur transcriptionnel). Dans ces conditions, en absence de doxycycline, seules les cellules activées lors de l'encodage contextuel expriment l'archéorhodopsine. Il est alors possible, grâce à une stimulation lumineuse, d'inactiver spécifiquement ces cellules responsables de l'encodage hippocampique du contexte. Au moyen d'enregistrements de l'activité unitaire de neurones hippocampiques du CA1, (Trouche et al. 2016) ont montré que l'inhibition de ces neurones peut induire le recrutement de nouveaux neurones, capables de produire un encodage alternatif de ce même contexte. Les données de la littérature s'accordent à dire que les drogues, au travers de leur association à des indices ou des éléments du contexte, produisent de puissants souvenirs qui sont à l'origine des rechutes dans l'addiction. C'est pour cette raison que les auteurs, après avoir validé leur approche expérimentale, ont cherché à reprogrammer les réseaux hippocampiques impliqués dans l'encodage d'un environnement associé à la cocaïne. Dans un test de préférence de place, des souris, auxquelles on a retiré la doxycycline et qui ont été placées sous cocaïne dans un environnement donné, expriment l'archéorhodopsine dans les cellules hippocampiques qui codent cet environnement 'cocaïne'. Pour tenter d'induire un nouvel encodage du contexte 'cocaïne', par d'autres neurones, les souris ont été replacées dans ce contexte 'cocaïne', sans drogue, et sous stimulation optique (inhibition des cellules hippocampiques codant pour le contexte 'cocaïne'). A la suite de cette procédure, le choix est donné aux souris entre le contexte 'cocaïne' et le contexte contrôle. Les souris stimulées passent moins de temps dans le contexte cocaïne que des souris qui n'ont pas subi la procédure de stimulation optique. L'activation d'un encodage alternatif pendant les stimulations lumineuses a permis de neutraliser la mémoire qui associait le compartiment à la cocaïne, en désengageant des cellules initialement programmées pour coder une association drogue/environnement. Cet article est exemplaire car il combine plusieurs des méthodes qui sont évoquées dans ce chapitre sur la connectivité. De plus, il montre le potentiel de chacune de ces méthodes et le grand nombre de possibilités que peut apporter leur utilisation commune pour l'identification, la manipulation ainsi que le potentiel thérapeutique de ces approches.

Une autre méthode, utilisant le promoteur fos, a été développée pour une application chez le rat : fos-LacZ. Comme je l'ai présenté précédemment, la présence du promoteur fos confère l'avantage de pouvoir cibler exclusivement les neurones activés en réponse à un stimulus donné, sans affecter les neurones voisins qui ne répondent pas à ce stimulus. Pour rentrer plus dans le détail, les rats transgéniques concernés possèdent un transgène c-fos-

LacZ contenant le promoteur c-fos qui régule une séquence codant pour LacZ. Grâce à cette construction, une exposition à un stimulus provoque, dans les neurones concernés, l'expression de fos qui va activer son promoteur, induisant l'expression de l'ARNm lac-Z et secondairement la protéine β -galactosidase pour laquelle il code. Celle-ci sera donc exprimée uniquement au niveau des neurones spécifiquement activés en réponse à un stimulus donné. Dans ces conditions, la pro-drogue (substance inactive avant d'être métabolisée) Daun02, injectée au préalable dans la région d'intérêt, va être catalysée, par la β -galactosidase, en un produit actif, la Daunorubicin, qui va induire une apoptose et une mort cellulaire des neurones exprimant la β -galactosidase (Cruz *et al*, 2013). Les auteurs décrivent dans cet article, l'importance du choix des approches expérimentales en fonction des questions posées. Ils évoquent les limites, décrites plus haut, des méthodes d'inactivation classique et reprochent aux autres, telles que les DREADDs ou l'optogénétique, de ne pas être suffisamment sélectives sur le plan fonctionnel, car elles ciblent des populations ou des sous-populations de neurones, sans tenir compte de leur implication potentielle dans le comportement mesuré. Grâce à cette méthode, (Cruz *et al*, 2013) ont identifié une population de neurones (contexte spécifiques), très localisés au niveau du NAc, impliquée dans la sensibilisation locomotrice qui est exprimée lors d'une réexposition à un contexte préalablement associé à des injections répétées de cocaïne.

L'optogénétique

L'optogénétique a été développée, au début des années 2000, suite à la découverte de protéines microbiennes, les opsines. Elle associe la génétique à l'optique. L'optogénétique utilise les caractéristiques de ces protéines, qui sont des canaux ioniques sensibles à la lumière, pour activer ou inhiber, au moyen d'une stimulation lumineuse, les cellules nerveuses qui les expriment. Optimisées depuis leur découverte, tout d'abord pour être exprimées de manière hétérologue (dans un organisme hôte qui ne possède pas naturellement cette protéine) puis combinées à des séquences d'adressage pour les rendre plus spécifiques de populations ou sous-populations neuronales, il en existe aujourd'hui une grande variété. La diversité de ces outils, associée au développement en parallèle des techniques d'optique et de photonique, permet d'envisager une meilleure définition spatiale, temporelle et fonctionnelle dans l'étude des fonctions et dysfonctions cérébrales (Yizhar *et al*, 2011). Là encore les progrès de la génétique ont permis de développer des outils toujours plus spécifiques de populations ou sous-populations neuronales, pour répondre à des problématiques différentes. En effet, le choix des vecteurs viraux utilisés et le positionnement des fibres optiques permettent de stimuler et d'étudier les réseaux de différentes façons, au niveau des corps cellulaires, au niveau des projections, dans une même structure ou dans des régions différentes. Grâce à sa très bonne résolution temporelle, l'optogénétique est un outil de choix pour manipuler des populations neuronales. (Boyden *et al*, 2005) décrivent la Channelrhodopsine-2 (principale opsine

utilisée pour l'inhibition en optogénétique) et ses caractéristiques. Il s'agit d'un canal cationique sensible à la lumière avec un temps de réactivité, à une stimulation lumineuse, de l'ordre de grandeur de la fréquence de décharge des neurones ; la ms. Un autre avantage qui justifie son utilisation, c'est qu'elle peut être appliquée à l'animal se comportant. Elle permet ainsi d'étudier en temps réel, les effets sur le comportement, de la stimulation des cellules exprimant l'opsine ; activation ou inhibition de l'activité neuronale selon le type d'opsine.

L'optogénétique peut également être couplée à l'électrophysiologie. Cette combinaison semble être particulièrement adaptée pour l'étude de pathologies complexes qui font appel à plusieurs fonctions cognitives. La combinaison de ces deux techniques, avec de très bonnes résolutions temporelle et spatiale, permet d'étudier en temps réel, chez l'animal se comportant, l'activité électrique de neurones dans différentes régions, tout en manipulant grâce à l'optogénétique, ces mêmes régions ou d'autres structures d'intérêts, de façon ciblée. La composante temporelle est primordiale, si on veut synchroniser l'analyse en temps réel des activités électriques avec les éléments du contexte et les réponses comportementales associées. Toutes ces approches peuvent être, ou sont sur le point d'être, couplées aux outils chimogénétiques présentées ci-dessus. Ces systèmes sont de plus en plus nombreux et précis pour nous aider à mieux comprendre les implications et les interactions des neurones au sein d'un réseau, et entre les réseaux, dans le cas d'un fonctionnement normal ou pathologique.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont eu pour objectif :

1. L'étude de marqueurs de connectivité fonctionnelle chez des rats *addicts* et des rats *non-addicts* à la cocaïne. Notre modèle d'addiction à la cocaïne permet d'identifier 15 à 20 % de rats qui, après une période prolongée d'auto-administration intraveineuse de cocaïne, et bien qu'ils aient consommé la même quantité de cocaïne que les autres, montrent une très forte motivation pour la substance, une difficulté à limiter la recherche de drogue, et maintiennent la prise de cocaïne malgré ses conséquences néfastes.

L'électrophysiologie *in vivo*, multi-site, au moyen d'enregistrements unitaires ou de potentiels de champ locaux est un outil de choix pour l'exploration de la connectivité fonctionnelle chez le rongeur. Un défi technique a été de l'adapter pour la coupler à notre modèle d'addiction à la cocaïne chez le rat. Nous avons montré des différences significatives de connectivité fonctionnelle entre rats *addicts* et *non-addicts*, suggérant un défaut de fonctionnalité du cortex préfrontal médian (PFM) chez les *addicts*.

2. L'étude du rôle du cortex prélimbique (PL) dans le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Des données récentes de la littérature remettent en cause le dogme selon lequel le PL exerce exclusivement un rôle facilitateur sur les propriétés motivationnelles de la cocaïne. Nous avons cherché à clarifier le rôle du PL dans le comportement d'auto-administration de cocaïne avant que ne se développe une addiction : comprendre son rôle dans l'usage précoce de cocaïne pour, à terme, étudier l'évolution de son implication selon que l'individu développe ou non une addiction. Nous avons montré que l'inactivation du PL peut s'accompagner, chez le même individu, d'une diminution ou d'une exacerbation du comportement de recherche de cocaïne selon les contingences expérimentales. Les neurones du PL émettent des projections vers plusieurs structures. Pour étudier leur rôle dans les effets comportementaux observés, nous avons travaillé à la mise au point d'outils optogénétiques pour la manipulation de l'activité de voies neuronales spécifiques, chez le rat, pour lequel ils sont encore très peu développés.

Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES GENERAUX

L'ensemble des procédures expérimentales (comportementales et chirurgicales) a été réalisé en accord avec la directive européenne n°2010/63/UE transposée en droit français depuis le 1 février 2013 (décret n°2013-118).

Le projet intitulé « **Etude des bases neurobiologiques impliquées dans la transition à l'addiction à la cocaïne chez le rat** » a été validé par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale et le ministère de l'agriculture sous le N° 50120152-A.

Animaux/conditions d'élevage

Pour l'ensemble des expériences, nous avons utilisé des rats mâles OFA (Souche d'origine Sprague- Dawley, Charles River, Lyon) pesant entre 250 et 300g lors de leur arrivée au laboratoire. Les animaux ont été placés en cages individuelles transparentes [PLEXX (taille : 475 x 257 x 210 cm)] dans des animaleries thermo- et hydro-régulées ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60 \pm 5\%$). Les animaux sont soumis à un cycle inversé (lumière/obscurité : 12h/12h), avec une phase nocturne de 7h00 à 19h00. Les animaux sont tous testés pendant leur période d'activité et au minimum 2 heures après l'extinction de la lumière. Ils disposent tous d'un accès *ad libitum* à la boisson et à la nourriture. Le change de la litière est effectué une fois par semaine. Un enrichissement à base de fibre de peuplier est ajouté à cette occasion (ANIBED).

SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES

La cocaïne hydrochloride (COOPER, France) était dissoute dans du sérum physiologique stérile (NaCl 0,9%) et conservée à 4°C en dehors des périodes d'utilisation.

CHIRURGIES

La Cathétérisation

Le cathéter à implanter (Figure 7) est constitué d'une partie souple en silicone dont le diamètre interne est 0,31 mm, le diamètre externe 0,64 mm et le volume mort 12 μl . Le tube est relié à une partie solide connectable constitué d'un guide canule (C313G-5UP, 22 GA, Plastic One), d'une toile de nylon (500 μM , Fisher Scientific, France) assemblé avec du ciment dentaire (Thomsen and Caine, 2005).

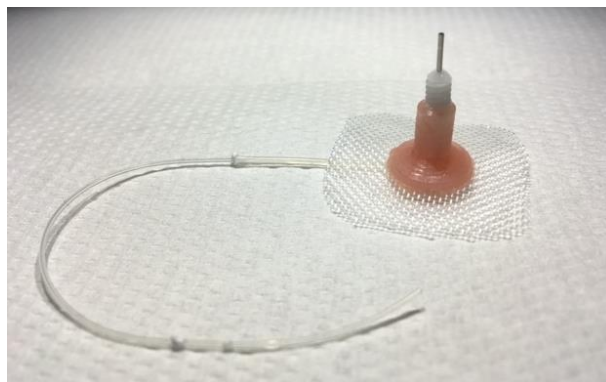


Figure 7 : Photo d'un cathéter de rat.

Il est composé d'un tube de silicone de 12 cm de long, relié à un guide canule métallique connectable au système d'auto-administration.

Hormis les cathétérisations de la première expérience décrites au chapitre 1, où les chirurgies ont été réalisées sous anesthésie obtenue grâce à un mélange de kétamine (Virbac, France) et de xylazine (Rompun, Bayer, France) (100mg/kg – 1mg/kg, 1ml/kg), toutes les autres ont été effectuées, comme les chirurgies stéréotaxiques, sous isoflurane (Vetflurane, Virbac, France). Les rats ont reçu le gaz anesthésique au travers d'un masque de paille pour toute la durée de la chirurgie (0,4l/min, 1,2 % d'isoflurane). Les animaux sont rasés sur deux zones : une zone ventrale, sur le côté droit, au niveau du cou, au-dessus de la veine jugulaire et une zone dorso-latérale sur le flanc droit, jusque vers la zone interscapulaire. La peau est incisée sur 12 mm sur la face ventrale et sur 20 mm sur le flanc droit. Pour terminer, une très petite incision (2 mm de diamètre) est pratiquée au niveau de la zone interscapulaire, permettant la sortie de l'extrémité externe (connectable) du cathéter. L'extrémité proximale est passée sous la peau, en partant de l'incision dorsolatérale, pour ressortir dans la zone ventrale (au niveau du cou). La veine jugulaire droite est isolée, la partie proximale du cathéter est placée dans l'atrium droit puis solidarisée à la veine. Pour terminer, la partie distale est positionnée sous la peau et fixée au niveau de la région inter-scapulaire.

La stéréotaxie

Toutes les chirurgies stéréotaxiques ont été réalisées sous isoflurane (Setup d'anesthésie miniHUB de marque TemSega ; Evaporateur Tec7, Pessac, France). Après une phase d'induction à 3 %, les rats ont été fixés sur un cadre stéréotaxique (M942, KOPF) et maintenus sous anesthésie au masque à un débit de 0,4 l/min (1,2% d'isoflurane). Pour minimiser le dessèchement oculaire, une crème ophtalmique (Lacrigel, Euroпта, France) est appliquée dès le début de l'intervention. Avant de commencer la chirurgie, les animaux reçoivent 0,06 ml (i.p.) de Meloxicam (Metacam™, Boehringer, Canada), à la concentration de 5mg/ml, ainsi qu'une injection d'un anesthésique local (Lurocaïne™, Vetoquinol, France) à la dose de 5 mg/kg (s.c.), au niveau de la zone où est pratiquée l'incision. Après avoir

effectué une désinfection [alcool (70 %) puis Bétadine], le rat est rasé au niveau du crâne et la peau est incisée sur 2 cm. La peau est écartée et maintenue par des clamps (FST) qui dégagent l'os. Les dernières adhérences présentes sont retirées avec une rugine. Un orifice est pratiqué dans le crâne au niveau de chaque site d'implantation, selon l'atlas (Paxinos and Watson, 2005). L'ensemble des incisions ont été refermées avec du fils de soie tressé ciré (Peters surgical, France). Pour lutter contre l'hypothermie et faciliter la récupération, le rat est placé pendant toute la durée de l'intervention sur une couverture chauffante thermorégulée (TemSega, France). A l'issue de la chirurgie, les rats reçoivent un traitement antibiotique (Gentaline, 1mg/kg i.p., 1ml/kg), puis sont placés dans une chambre post-opératoire dont la température est maintenue à 27°C, jusqu'à leur réveil.

Les vérifications histologiques

A la fin de chaque expérience ; les rats ont reçu une dose létale (i.p.) de Pentobarbital (200mg/kg, 4ml/kg). Suite à une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (4 %), les cerveaux ont été prélevés et postfixés dans la même solution pendant un minimum de 48h. Après cette étape, des coupes coronales de 80 µm ont été effectuées par un microtome à lame vibrante (VT1000S, Leica, France) et collectées dans un milieu tampon (PB, pH : 7,4) avant d'être montées sur lames dans du Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, Angleterre) pour réaliser des contrôles de l'expression virale et des sites d'implantations des électrodes ou des fibres optiques. Les images ont été obtenues au microscope inversé [grossissement x4 (Eclipse Ti-U, Nikon, France)].

COMPORTEMENT

L'Auto-administration intraveineuse

Matériel :

Le dispositif est composé de cages polymodales de conditionnement opérant (Imétronic, Pessac, France) (Figure 8). Elles sont constituées de Plexiglas et de métal (40 cm x 30 cm x 52 cm). Chaque cage est intégrée dans une enceinte opaque équipée d'un ventilateur permettant le renouvellement de l'air et la couverture du bruit ambiant. Les animaux sont placés quotidiennement (5jours/semaine) dans la cage où leur cathéter est relié par un tube (tygon, Cole Parmer, Fisher Scientific, France) à une seringue via un joint tournant. Ce dispositif laisse l'animal libre de ses mouvements. La seringue est placée dans un pousse-seringue équipé d'un moteur pas à pas. Celui-ci permet de délivrer le contenu de la seringue à une vitesse de 20 µl/sec. Deux trous placés de chaque côté de la cage à 5 cm du sol sont utilisés comme dispositifs pour mesurer le comportement opérant. Quatre leds positionnées au niveau du plafond de la cage permettent une illumination complète de la cage. Les cages sont équipées de 3 autres leds, une bleu située à 32 cm du sol, au niveau du panneau

gauche, une blanche positionnée 5 cm au-dessus du trou de droite et une verte située à 10 cm de la lumière blanche. Elles sont également équipées dans leur partie supérieure d'un générateur de son qui peut produire trois sons distincts (avec des fréquences allant de 1 à 10 Hz par palier de 1 Hz) et un bruit blanc (volume compris entre 50 et 80 dB). L'ensemble de ces éléments (leds et sons) sont utilisés comme stimuli conditionnés ou discriminatifs pour le contrôle du comportement opérant. Des cellules photoélectriques placées à 1,5 cm du sol permettent de mesurer l'activité motrice horizontale de l'animal. Toutes les cages sont reliées à une même interface qui assure la mise en forme des signaux issus des capteurs infra-rouges et permet, au moyen d'un logiciel (POLY, Imétron, Pessac, France) de contrôler les contingences expérimentales d'une part et d'enregistrer tous les événements comportementaux, d'autre part.



Figure 8 : Le système d'auto-administration.

Il est composé de 48 enceintes isolantes qui possèdent toutes un pousse seringue situé à l'extérieur et d'une cage de Plexiglas dans laquelle le rat est placé pendant toute la durée de la session, après avoir été connecté au système d'injection. Elle est munie d'un trou sur les parois gauche et droite. Un passage du museau de l'animal au niveau de celui de droite dit trou actif permet de déclencher le système d'injection.

Le modèle multi-symptomatique d'addiction à la cocaïne

Protocole général :

Une expérience classique du modèle multi-symptomatique d'addiction débute par une phase d'acquisition de la tâche comportementale (Figure 9). Pendant les premiers jours, le ratio (nombre de demandes nécessaire dans le trou actif pour obtenir une injection de cocaïne) est de 3 (ratio fixe 3 ou *Fixed Ratio* en anglais - FR3). Lorsque le critère de stabilité des injections est atteint (moins de 10% de variation sur 3 jours successifs), le ratio est augmenté jusqu'à 5 (FR5) pour tout le reste de l'expérience. Ce protocole nous permet de nous assurer d'une bonne acquisition du ratio par les animaux et de consolider leur comportement de prise de drogue. Après une longue période d'exposition à la cocaïne, la sévérité de l'usage est évaluée au travers de trois tests comportementaux qui correspondent à une opérationnalisation chez le rat des critères cliniques majeurs de l'addiction 1. Un protocole de ratio progressif qui évalue la motivation pour la drogue, 2. Un protocole de punition, au moyen de chocs électriques dans les pattes, qui teste le maintien de la prise malgré ses conséquences néfastes, 3. Un troisième critère est pris en compte. Il s'agit de la difficulté à contrôler la recherche de drogue. Elle est mesurée quotidiennement au cours des sessions de base au travers des réponses pendant les périodes de non-droque (ND).

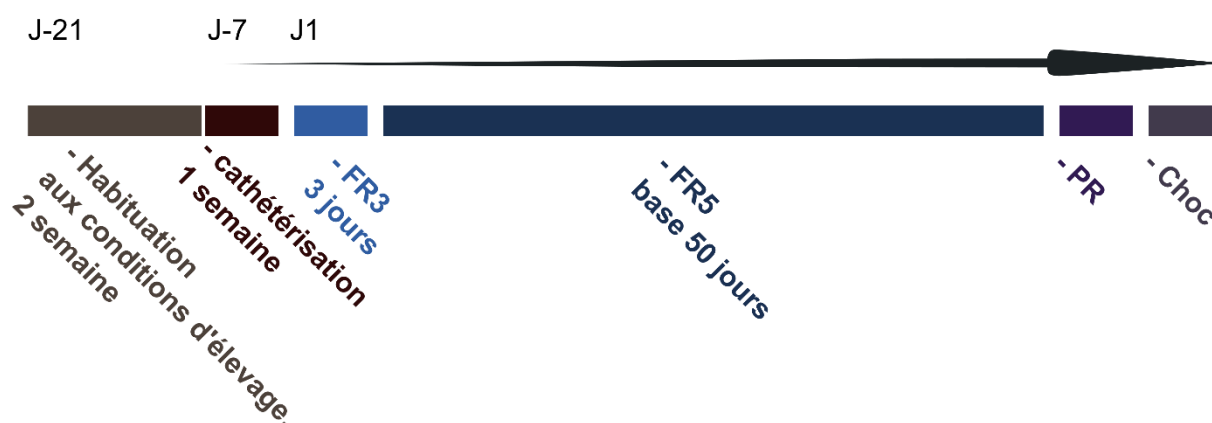


Figure 9 : Organisation générale d'une expérience d'auto-administration classique du modèle multi-symptomatique d'addiction.

Elle débute par une phase d'acquisition de la tâche comportementale avec une augmentation du FR amené progressivement à 5 (utilisé par la suite pour l'ensemble des sessions de base). Après une longue période d'exposition à la cocaïne ; la sévérité de l'usage de cocaïne est évaluée au travers de trois tests comportementaux qui correspondent à une opérationnalisation chez le rat des critères cliniques majeurs de l'addiction 1. Un protocole de ratio progressif qui évalue la motivation pour la drogue, 2. Un protocole de punition, au moyen de chocs électriques dans les pattes, qui teste le maintien de la prise malgré ses conséquences néfastes. Un troisième critère est pris en compte, la difficulté à contrôler la recherche de drogue qui est mesurée quotidiennement au cours des sessions de base au travers des réponses pendant les périodes de non-droque (ND).

Protocole de base du modèle multi-symptomatique d'addiction :

Le protocole de base est composé de 3 périodes d'accessibilité à la drogue (périodes de drogue – D) séparées par deux périodes de 15 min pendant lesquelles la drogue n'est pas disponible (périodes de non-drogue – ND). La période de drogue peut durer entre 40 min et 1 heure en fonction des expériences pour une durée totale de session comprise entre 2h45 et 3h30 (Figure 10). Un discriminatif lumineux bleu signale à l'animal que la drogue est accessible (D), alors que son extinction, associée à l'illumination complète de la cage via les leds blanches du plafonnier, signale le passage à une période durant laquelle la drogue n'est plus disponible (ND). Lorsque la drogue est accessible, l'introduction du museau du rat dans le trou dit actif provoque une coupure du faisceau infrarouge présent dans l'orifice et déclenche, pour une durée de 4 secondes, l'illumination de la led blanche située au-dessus du trou. Une seconde après l'allumage du signal lumineux, la pompe d'injection délivre, via le cathéter intraveineux, 45 µl de la solution de cocaïne (0,8 mg/kg/injection). La visite de l'autre trou dit inactif est sans conséquence programmée. Chaque injection est suivie d'une période d'inhibition (time out : TO) de 40 secondes pendant lesquelles les demandes au niveau du trou actif sont sans conséquence (led bleue éteinte).

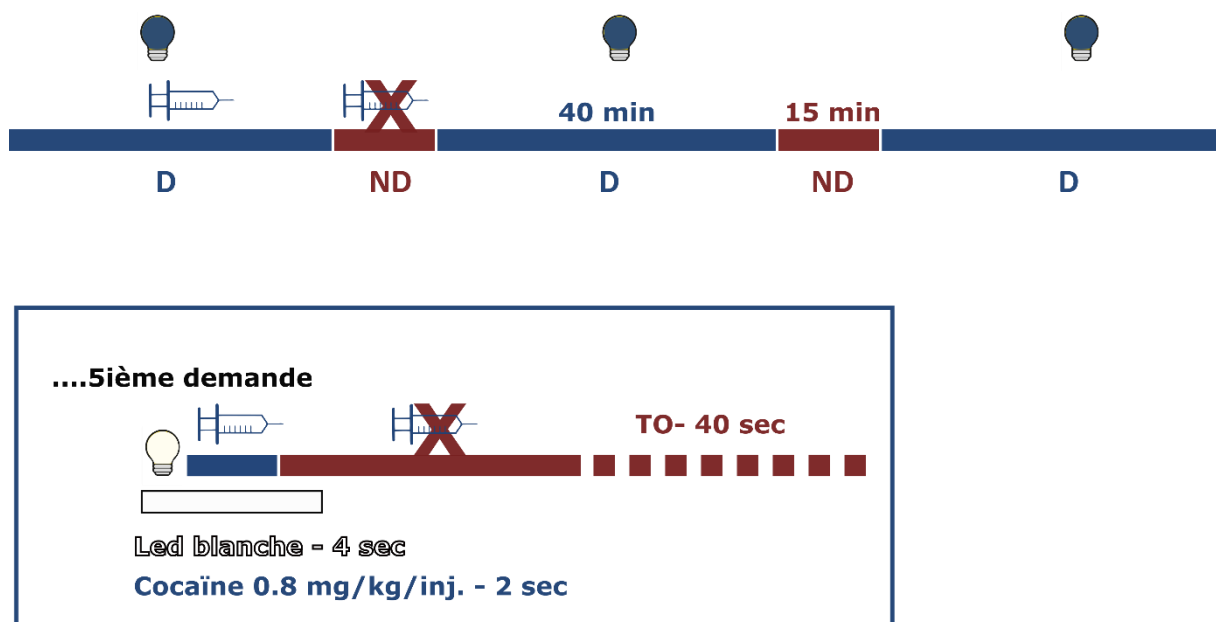


Figure 10 : Session de base composée de 3 périodes d'accès à la drogue (D) séparées par des périodes de non-drogue (ND), pendant lesquelles la drogue n'est pas disponible.

La séquence des différents événements qui amènent à l'obtention d'une injection au cours de la période de drogue (D) est décrite dans le cadre bleu.

Les trois tests opérationnalisant les critères d'addiction dans le modèle multi-symptomatique d'addiction

Les demandes en ND (difficulté à contrôler la recherche de drogue)

Au cours des périodes de ND, pendant lesquelles la drogue est signalée comme indisponible, nous considérons le nombre moyen des demandes au trou actif.

Le ratio progressif (motivation)

Il permet d'évaluer l'intensité des propriétés renforçantes (Richardson and Roberts, 1996) de la drogue. Au cours de cette session particulière (Figure 11), le contexte dans la cage est identique à une session de base. La lumière bleue indique à l'animal que la drogue est accessible, le stimulus associé à l'injection est présenté mais le nombre de demandes nécessaire pour obtenir une injection augmente après injection, selon la progression suivante : 10, 30, 45, 65, 85, 115, 145, 185, 225, 275, 325, 385, 445, 515, 585, 665, 745, 835, 925, 1025, 1125, 1235, 1345, 1465, 1585 pour obtenir la 26ième injection. La session dure au maximum 5 heures, mais elle peut être stoppée plus tôt si le rat met plus d'une heure à obtenir deux injections successives. Le dernier ratio complété (nombre de demandes ayant donné accès à la dernière injection) est dénommé point de rupture (breakpoint - BP - en anglais). Cette valeur est considérée comme un indice de la motivation de l'animal pour la drogue.

Dévaluation ou punition (maintien de la demande et de l'usage malgré leurs conséquences néfastes)

Lors de cette session particulière (Figure 11), les rats sont placés 40 minutes dans la cage d'auto-administration. Le stimulus discriminatif (led bleue) indique que la drogue est disponible. La séquence est la suivante : lors de la première demande au niveau du trou actif une lumière verte (jamais présenté auparavant) indique le début de la séquence de choc. Elle s'éteint au bout d'une minute si l'animal ne fait pas d'autre demande et la séquence est alors réinitialisée. Si pendant cette minute, le rat passe son museau au niveau du trou actif 3 fois de plus (FR4), il reçoit un choc électrique au niveau des pattes (0,2 mA pendant une seconde). S'il fait une demande de plus (FR5), dans la minute, il reçoit un choc électrique et une injection de drogue suivie d'un TO de 40 sec comme lors des sessions de base. La séquence est alors réinitialisée, comme après une période d'inactivité de plus d'une minute. Une quantification des injections lors de cette session, en pourcentage du nombre d'injections moyen au cours des premières périodes de drogue des 3 sessions de base précédant la session de test, permet d'évaluer la résistance à la punition.

a



Session de PR (arrêt si aucune injection pendant 1 heure)

...10 ième demande (inj. 1) → +20 demandes (inj. 2) → +30 demandes (Inj. 3) ...



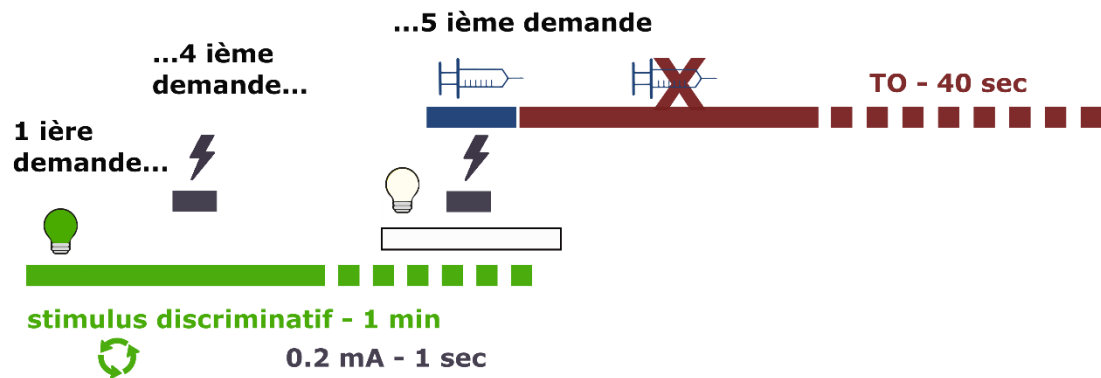
Led blanche - 4 sec

Cocaïne 0.8 mg/kg/inj. - 2 sec

b



Session de Choc



stimulus discriminatif - 1 min



0.2 mA - 1 sec

Led blanche - 4 sec

Cocaïne 0.8 mg/kg/inj. - 2 sec

Figure 11 : Représentation des sessions de tests permettant d'évaluer deux des critères d'addiction.

a. Le ratio progressif et b. la session de dévaluation. Le 3^{ème} critère, difficulté à limiter la recherche de drogue, est évalué quotidiennement pendant les périodes ND du protocole de base. Pour l'évaluation de l'addiction, on ne considère que les 3 sessions de base qui précèdent la session de PR.

Réinstallation du comportement d'auto-administration

Comme cela a été mentionné dans l'introduction, ce protocole est utilisé comme modèle de rechute. Nous l'utilisons pour évaluer les propriétés motivationnelles de la cocaïne. Il s'agit d'une session composée de deux phases : 1. une phase d'extinction (de 50 à 90 min. en fonction des expériences) pendant laquelle la drogue est signalée comme accessible bien que les demandes au trou actif soient sans conséquence programmée, 2. une période de 2 heures au cours de laquelle, 4 doses de cocaïne de concentrations croissantes (0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1,6 mg/kg) sont administrées à l'animal, de façon non-contingente, via son cathéter. Trente min séparent les injections les unes des autres (Figure 12).

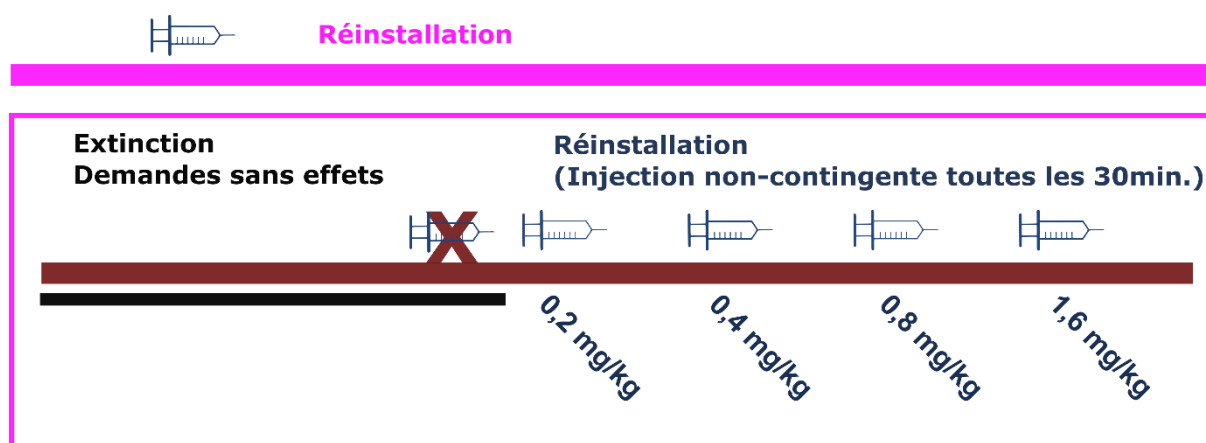


Figure 12 : Représentation de la session de réinstallation ou rechute provoquée par la cocaïne.

Après une période d'extinction de 50 minutes, des injections non-contingentes de cocaïne, de concentrations croissantes sont délivrées toutes les 30 min.

ELECTROPHYSIOLOGIE : ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE NEURONALE

Matériels

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués dans des cages de configuration identique à celles utilisées pour l'étude du comportement d'auto-administration. Elles sont couplées à un collecteur tournant (Figure 13, Imétron, Pessac, France), équipé d'un assistant électronique qui permet d'effectuer des enregistrements de l'activité électrique neuronale combinés au comportement d'auto-administration intraveineuse. Au cours des enregistrements, les électrodes sont reliées à un « headstage » (Plexon, Texas, USA) contenant un amplificateur (gain 16x). L'ensemble est relié au commutateur électrique composé de 64 voies indépendantes (il est donc possible d'enregistrer simultanément les signaux provenant des 64 électrodes implantées) et d'un assistant électrique qui compense les rotations et les redressements de l'animal, malgré la connexion combinée aux câbles pour l'électrophysiologie et à la voie liquide pour l'auto-administration. En sortie, les câbles sont connectés à un pré-amplificateur (PBX, Plexon, gain 100x) associé au système d'acquisition (OmniPlex D, Neural data acquisition system, Plexon) qui permet d'enregistrer

le signal et de le synchroniser avec les données comportementales. L'activité électrique générée par les neurones produit un signal analogique qui va être digitalisé par le système d'acquisition avec une fréquence d'échantillonnage de 40kHz, la bande passante étant filtrée entre 150 Hz et 9 kHz pour les activités unitaires et entre 0,7 Hz et 170 Hz pour les potentiels de champ.

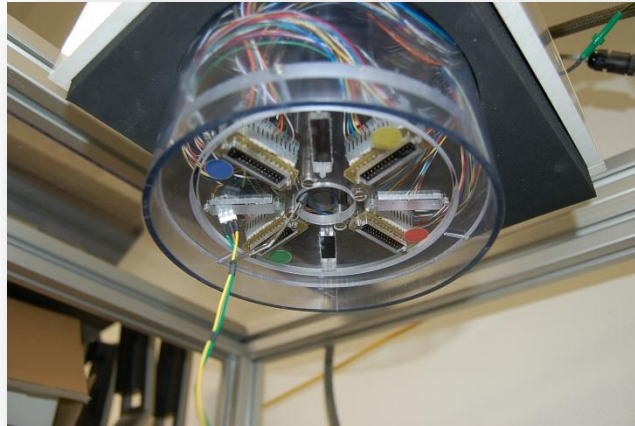


Figure 13 : Collecteur tournant électrique

Il est composé de 64 voies indépendantes utilisé pour enregistrer les activités électrophysiologiques chez le rat.

STIMULATION OPTOGENETIQUE

Matériels

L'installation est composée d'un collecteur tournant 2 voies liquides (Imétronic, Pessac, France) associé à un commutateur optique (PlexBright Compatible Commutators, Plexon, Texas, USA). Le collecteur est équipé d'un assistant électronique de rotation et de redressement. Il permet à l'animal de se déplacer librement sans ressentir de gêne due au poids ou à la rigidité des fibres optiques et de la voie liquide, utilisée pour l'auto-administration. Le commutateur optogénétique (Figure 14) se compose de deux Leds indépendantes (PlexBright compact led Module, Plexon, USA - 465 nm, 40,2 mW à 300 mA) reliées à un boîtier de contrôle permettant de gérer l'intensité lumineuse émise. Ce système peut recevoir un signal TTL (Transistor Transistor Logic) en provenance des cages d'auto-administration, sur lesquelles il est adaptable. Il est donc possible lorsque les rats sont en session, de le piloter via le logiciel de gestion des cages polymodales (POLY, Imétronic, Pessac, France) et ainsi de synchroniser l'émission de lumière avec les processus comportementaux mesurés dans la cage.

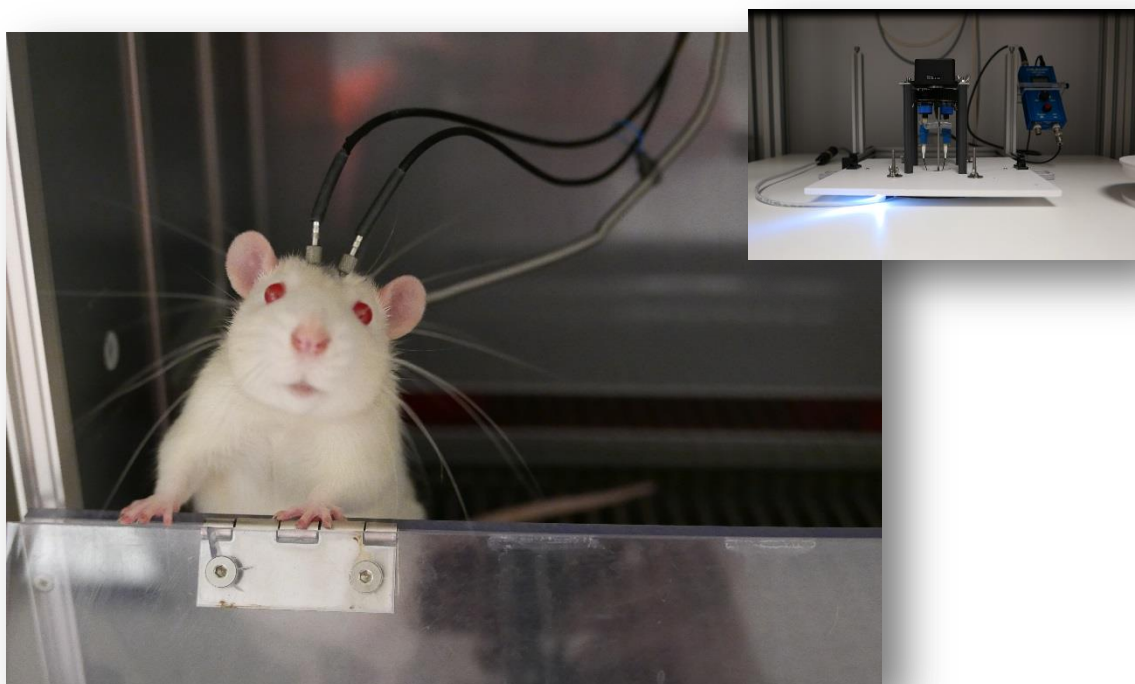


Figure 14 : Rat doublement connecté.

Optiquement, dans chaque hémisphère au niveau du NACore et pharmacologiquement par une voie liquide au niveau du dos. L'encart est une photo qui représente le commutateur optogénétique positionné sur une cage d'auto-administration.

Variables d'intérêt et Analyses

VARIABLES COMPORTEMENTALES

Le diagnostic d'addiction

Le diagnostic qualitatif: calcul du nombre de critères positifs

Pour chaque critère, nous avons procédé à un tri des animaux par ordre croissant du score au test comportemental correspondant. Comme décrit en détails dans (Deroche-Gamonet and Piazza, 2014), nous avons coupé la population en deux effectifs: l'effectif 1 correspondant aux individus compris dans les 33 ou 40% de la population présentant les scores les plus forts, et l'effectif 0 correspondant au reste de la population. Les individus de l'effectif 1 d'un test donné remplissent le critère correspondant. Nous avons réalisé cette sélection de l'effectif 1 pour chacun des trois critères. A l'issue de cette étape, nous avons obtenus 3 effectifs 1, un pour chaque critère. Nous avons alors réalisé l'intersection de ces trois effectifs 1. Dans la mesure où la composition des effectifs était hétérogène, cette opération a mis en évidence 3 groupes d'animaux distincts : les rats 1crit n'appartenant qu'à un seul des effectifs, les rats 2crit appartenant à deux des effectifs, et les rats 3crit

appartenant aux 3 effectifs et par conséquent remplissant les 3 critères d'addiction. Les individus issus de l'intersection des 3 effectifs « 0 » (rats 0crit) ne remplissent aucun des 3 critères d'addiction. La limite de sélection aux 33 ou 40% supérieurs de la population pour chaque critère est basée sur l'existence d'une distribution bimodale dans le critère de maintien de la recherche de drogue malgré les conséquences néfastes (choc électrique). La sous-population extrême de cette distribution est constituée de 33% de la population. Par ailleurs, le pourcentage d'animaux présentant les 3 critères (15-20%) ne dépend pas de cette limite de sélection dans la mesure où les tris basés sur la fourchette 25%-40% n'entraînent pas de différences significatives de la distribution des animaux dans les différents groupes (de 14% à 19% respectivement pour les animaux 3crit).

Le diagnostic quantitatif d'addiction : le score d'addiction

Nous réalisons également un diagnostic quantitatif au travers d'un score d'addiction que l'on pourrait comparer au score calculé chez l'homme au moyen de « l'Addiction Severity Index » (McLellan *et al*, 1980). Le score calculé correspond plus précisément à une évaluation de la sévérité de l'usage de cocaïne puisqu'il est effectué tant chez les *addicts* que les *non-addicts*. Il correspond à la somme algébrique, après leur normalisation, des scores à chacun des trois critères d'addiction. Un score normalisé est obtenu après soustraction de la moyenne du groupe à ce critère et division par la déviation standard du groupe à ce même critère. Pour l'ensemble du groupe, le score normalisé pour un critère présente ainsi une moyenne de 0 et une déviation standard de 1. Les scores d'addiction se distribuent donc ainsi sur une échelle de -3 à +3. Il est important de noter que le score d'addiction est relié de façon linéaire avec le nombre de critères d'addiction. Les rats 0crit sont les seuls avec un score négatif, alors que les 3crit sont les seuls avec un score au-dessus de la déviation standard à la moyenne. Les deux autres groupes (1crit et 2crit) montrent un score intermédiaire entre 0crit et 3crit. Ces données confortent l'hypothèse que l'addiction représente un continuum pathologique d'une prise contrôlée à addictive atteinte par un nombre limité d'utilisateurs (Belin *et al*, 2009). Ce score, unique, présente l'avantage de pouvoir servir dans les études corrélatives visant à établir des liens entre sévérité de l'usage de cocaïne et l'expression d'une variable biologique.

VARIABLES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Analyse des activités unitaires

Chaque électrode peut enregistrer simultanément des signaux électriques générés par la décharge de plusieurs cellules adjacentes. La différenciation des potentiels d'action (PA) émis par les différentes cellules s'effectue à l'aide d'un programme de 'spike sorting' (Offlinesorter Plexon, USA), par analyse en composantes principales. Il consiste à trier les potentiels d'action en fonction de leur forme, chaque cellule ayant une forme de potentiel

d'action qui lui est propre et très reproductible au cours du temps. Après avoir identifié l'ensemble des neurones nous avons effectué les analyses avec les logiciels d'analyses Neuroexplorer (Nex technologies, Madison, USA) et Matlab (MatWorks).

L'index de co-décharge

C'est un index de synchronisation entre deux neurones. Il quantifie la co-occurrence des potentiels d'action entre ces neurones. Pour l'évaluer, nous avons appliqué un script MatLab (Cyril Dejean) qui consiste à comparer les trains de potentiel émis pour un neurone A par rapport à ceux d'un neurone B, par tranche de 50 ms. Pour chacune des tranches, le rapport (exprimé en pourcentage), entre le nombre de PA du neurone qui en a le moins et le nombre de PA du neurone qui en a le plus, a été évalué sur la totalité de l'enregistrement. La moyenne de cette valeur pour l'ensemble des tranches correspond à l'index de co-décharge. Cette méthode a été appliquée à l'ensemble des paires de neurones possibles par animal, au sein d'une même structure et entre les structures. C'est cet index de co-décharge que nous avons comparé entre les paires de neurones chez les individus *addicts* et *non-addicts*.

Histogramme de co-décharge par rapport à un neurone de référence

Il permet d'attribuer un index de co-décharge entre 3 neurones (Paz *et al*, 2006), il s'agit cette fois-ci de comparer, non pas des paires de neurones mais, des triplets de neurones. En d'autres termes, si on considère 3 neurones (A, B et C), cela consiste à représenter, sous la forme d'une matrice en 3 dimensions, l'occurrence des potentiels d'action émis par les neurones B et C par rapport au potentiel de référence provenant du neurone A.

A partir de cette matrice, on applique une méthode d'analyse de quantification dite de Surprise pour identifier les tranches significatives. Pour cette analyse la valeur de Surprise a été fixée à 5, ce qui correspond à une significativité de 1 %. Un triplet est significatif, s'il possède au moins quatre tranches significatives contigües.

Co-décharge par rapport à un évènement de référence

L'analyse a consisté à comparer l'activité de paires de neurones en référence à des évènements, ici les sons 1 et 2, respectivement associés au FR1 et au FR5) et l'injection de cocaïne. Nous avons comparé les individus *addicts* et *non-addicts* pour le pourcentage de paires de neurones qui co-déchargent significativement par rapport à l'évènement de référence.

Analyse des potentiels de champ

Les potentiels de champ sont la somme de tous les courants électriques présents à proximité de l'électrode d'enregistrement.

La bande thêta et le rapport signal sur bruit

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la bande thêta comprise entre 4 et 9Hz. Nous avons calculé le pourcentage de signal dans la bande compris entre 6 et 9 Hz (pic de la bande thêta que l'on observe sur les histogrammes de densité spectrale de puissance) par rapport à l'ensemble du spectre considéré, ici entre 2 et 10 Hz.

La cohérence.

C'est un coefficient de corrélation entre deux signaux, pour une fréquence donnée. Dans notre cas, nous avons comparé deux signaux provenant de deux structures différentes dans la même bande de fréquence. Une cohérence égale à 1 correspond à une synchronisation parfaite et une cohérence égale à 0 signifie que les deux signaux ne sont pas synchronisés.

ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats correspondent à la moyenne des variables étudiées plus ou moins l'écart standard à la moyenne (ESM). Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; à l'exception de l'analyse de Surprise où il a été placé à $p < 0.01$.

La majorité des analyses a été réalisée au moyen d'une analyse de variance paramétrique (ANOVA), suivie d'un test post-hoc Newman-Keuls, pour identifier les groupes dont les moyennes ont contribué à l'effet quand l'ANOVA révélait une différence significative.

Une partie des analyses (données électrophysiologiques, notamment) a consisté en la comparaison des moyennes au moyen d'un t-test non apparié.

L'ensemble des analyses a été réalisé avec le logiciel Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, Etats-Unis).

Chapitre 1 : MARQUEURS DE CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DE L'ADDICTION A LA COCAÏNE CHEZ LE RAT

A. INTRODUCTION

Avec l'électrophysiologie *in vivo*, multi-site, au moyen d'enregistrements unitaires ou de potentiels de champ locaux, nous avons recherché des corrélats de l'addiction à la cocaïne, dans la connectivité fonctionnelle au sein de, et entre, quatre structures d'intérêt (mPFC, NAc, BLA et HPc).

Nous avons comparé des rats caractérisés *addicts* et *non-addicts* à la cocaïne. Notre modèle permet d'identifier 15 à 20 % de rats qui, après une période prolongée d'auto-administration intraveineuse de cocaïne, et bien qu'ils aient consommé la même quantité de cocaïne que les autres, montrent une très forte motivation pour la substance, une difficulté à limiter la recherche de drogue, et maintiennent la prise de cocaïne malgré ses conséquences néfastes. Nous avons réalisé cette étude de connectivité alors que les animaux s'auto-administraient la cocaïne, comme dans les conditions habituelles d'auto-administration de base.

B. EXPERIENCES

1. MARQUEURS DE CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DE L'ADDICTION A LA COCAÏNE CHEZ LE RAT

Nous nous sommes intéressés à l'étude de marqueurs de connectivité fonctionnelle chez des rats *addicts* et *non-addicts*. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'addiction développé au laboratoire permettant d'évaluer, après 2 mois d'exposition à la drogue, la sévérité de l'usage de cocaïne. C'est à partir du moment où ils ont été caractérisés que nous leur avons implantés les électrodes d'enregistrements au niveau des structures ciblées : le cortex Pré-limbique, le noyau accumbens, l'amygdale baso-latérale et l'hippocampe.

1.1 MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES

Les électrodes

Isolées individuellement, les électrodes sont assemblées en « fagots » constituées de fils de nichrome (13 μm de diamètre interne ; impédance de 30-100 K Ω , Kanthal) dans une canule d'acier inoxydable de 26 gauges. Chaque fils est relié à un connecteur (Omnetics) de 36 broches (Figure 15).

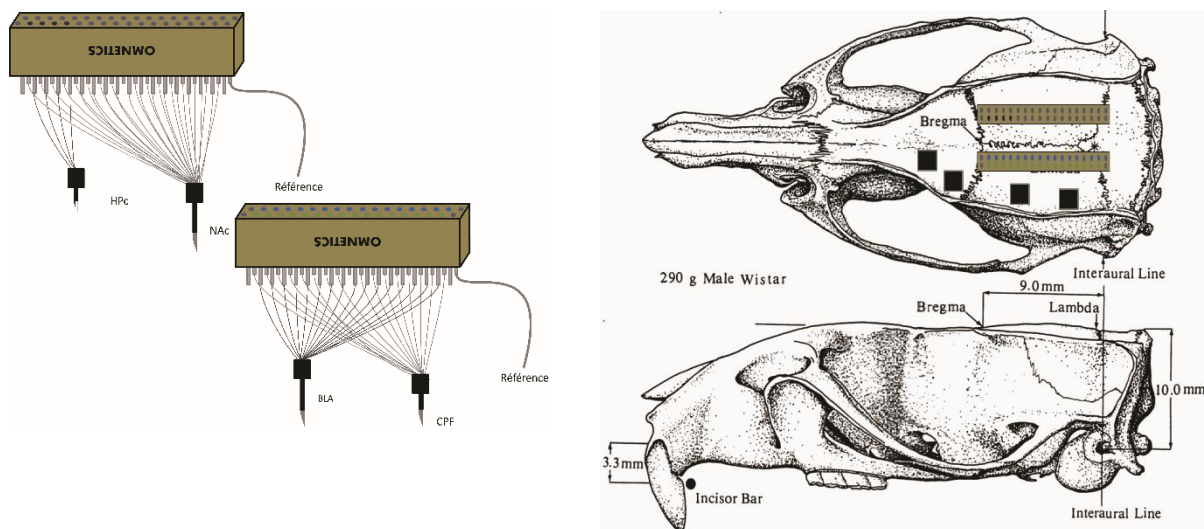


Figure 15 : Représentation des deux connecteurs 32 canaux implantés sur les rats enregistrés et schématisation de leur disposition à la surface du crâne.

Connecteur 1 : 4 électrodes dans l'hippocampe + 28 canaux dans le noyau accumbens. Connecteur 2 : 16 canaux dans l'amygdale + 16 canaux dans le cortex préfrontal.

Implantation des électrodes

Les procédures chirurgicales et suivi post-opératoire utilisés pour cette expérience sont ceux qui ont été décrits dans les matériels et méthodes généraux. Seuls les aspects spécifiques à l'implantation des électrodes sont détaillés ici. Après avoir réalisé la craniotomie et retiré la dure-mère au niveau des zones d'intérêt, le paquet d'électrodes est mis en place en premier dans le cortex préfrontal médian (**CPF**) aux coordonnées suivantes : AP= +3,2 mm ; L= 0,5mm ; DV= -4,7 mm (par rapport à la surface du cerveau), et fixé par du Super-Bond (C&B, Pymep, France). Dans un deuxième temps, ce sont les électrodes du NAc qui sont implantées et scellées, puis la BLA et pour finir l'HPC. Les coordonnées utilisées sont pour le **NAc** : AP= 1,6 mm, L= 4 mm, DV=-7,6 mm ; pour la **BLA** : AP= -3,14 m, L= 5 mm, DV= - 7,8 mm ; pour l'**HPC** : AP=-4,52, L=3,2, DV=- 2,2. Les deux électrodes de référence ont été positionnées en dernier au niveau du cervelet et réunies avec tous les autres implants et les connecteurs par du ciment dentaire et de la colle. L'ensemble formé a été inclus dans une feuille de cuivre servant de cage de Faraday. Pour consolider la miniature et s'assurer de la solidité de l'ensemble, quatre vis ont été fixées sur le crâne et incluses dans une matrice de Super-Bond.

1.2 PROTOCOLE

48 rats ont été cathétérisés puis testés quotidiennement (5 jours/semaine) pour l'auto-administration de cocaïne pendant des sessions de 2h45.

Après 3 jours de récupération post-opératoire l'auto-administration débute par une période d'acquisition composée de 3 jours à FR3, 5 jours à FR5, puis le son 2 associé à l'injection [65 dB, 2 Hz (10x)] est introduit pendant 2 jours avant d'ajouter le son 1 [65 dB, 10 Hz (10x)] qui

est synchronisé avec le début de la séquence (FR1). C'est ce protocole qui est appliqué pour toutes les sessions de base qui suivent la période d'acquisition.

La sévérité de l'usage est évaluée après 50 sessions d'auto-administration de base ; un protocole de ratio progressif et une session de punition de la recherche et de la prise de cocaïne sont réalisés. Après avoir été caractérisés, tous les rats *addicts* et les rats *non-addicts* représentatifs sont soumis à une chirurgie pour l'implantation d'électrodes. Les enregistrements électrophysiologiques commencent après un repos post-opératoire (3 jours) et une récupération du comportement d'auto-administration de base (il est vérifié que les *addicts* et les *non-addicts* conservent leur différence pour le critère de réponses en ND) ainsi qu'une habitude à la cage d'électrophysiologie et à la connexion du « headstage » (Figure 16).

Les enregistrements sont effectués pendant des sessions d'auto-administration *dont le protocole, à l'exception de la durée (20 min) et de l'absence des périodes ND, est identique* à une session de base, c'est-à-dire présence des stimuli conditionnés, de la lumière bleue indiquant la présence de la drogue, de la lumière blanche associée à l'injection, ainsi que des stimuli sonores associés pour le CS1 au FR1 et pour le CS2 à l'injection. Les rats qui ne sont pas testés en électrophysiologie sont testés en session de base d'auto-administration dans les cages non couplées à l'électrophysiologie.

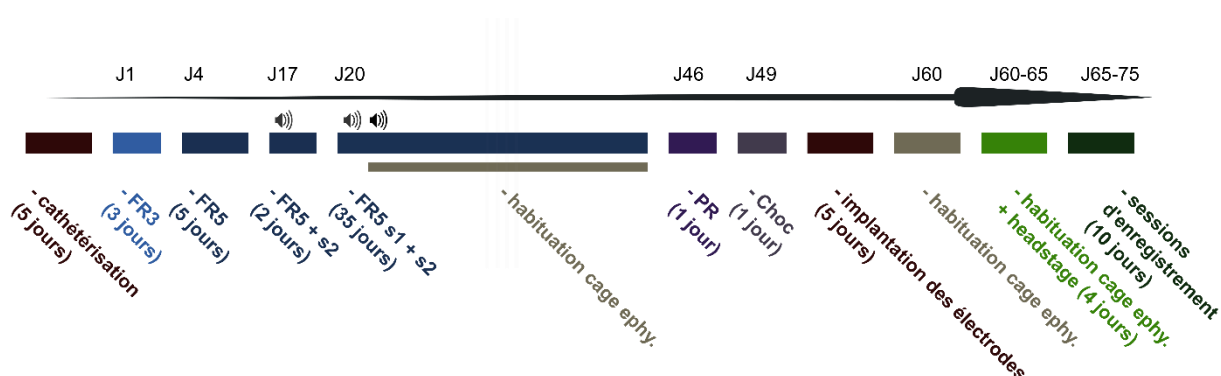


Figure 16 : Schéma du protocole expérimental de l'expérience couplant modèle multi-symptomatique d'addiction et électrophysiologie *in vivo*.

1.3 RESULTATS

Sur les 48 rats du départ, 19 d'entre eux ont été caractérisés, 7 ont été identifiés comme ne répondant à aucun des critères (rats *non-addicts*) et 6 d'entre eux étaient positifs pour les trois critères (rats *addicts*). Ces 13 rats ont été implantés d'électrodes et repris le comportement d'auto-administration pour couplage avec l'électrophysiologie. Sur les 13 rats choisis, cinq d'entre eux ont été implantés mais n'ont pas repris un comportement d'auto-administration stable, ils ont donc été exclus de l'expérience.

Caractérisation comportementale

Les 48 rats testés en auto-administration ont acquis et stabilisé le comportement. Après des expériences préliminaires (données non montrées), les conditions ont été trouvées (introduction progressive) pour que les contraintes particulières du protocole expérimental – la présence de sons dans la séquence comportemental donnant accès à la cocaïne (voir matériels et méthodes), ne compromettent pas le développement d'une prise stable de cocaïne chez tous les animaux. Néanmoins, il est important de noter que sur les 48 rats de départ, seuls 19 ont été caractérisés pour la sévérité de leur usage de cocaïne (39,5%). Sur les 19 rats testés, 7 ont été identifiés comme ne répondant à aucun des critères (rats *non-addicts*) (37%), 4 d'entre eux étaient positifs pour les trois critères (rats *addicts*) (21%). Deux rats classés positifs pour 2 critères ont également été sélectionnés. Ces 13 rats ont été implantés d'électrodes et repris le comportement d'auto-administration pour couplage avec l'électrophysiologie. Sur ces 13 rats, cinq ont été implantés mais n'ont pas repris un comportement d'auto-administration stable, ils ont donc été exclus de l'expérience. La Figure 17 (a-c) représente les scores moyens dans les 3 critères d'addiction des rats caractérisés *addicts* et *non-addicts*. Les deux groupes diffèrent significativement par le nombre moyen de réponses pendant les périodes ND (a) [Groupes, $F(1,11) = 7,43$, $p < 0,05$], le point de rupture dans le test de ratio progressif (b) [Groupes, $F(1,11) = 6,27$, $p < 0,05$], le % d'injections obtenues lorsque les réponses à FR4 et FR5 sont punies par un choc électrique [Groupes, $F(1,11) = 9,15$, $p < 0,05$] et le score d'addiction regroupant les scores normés dans les trois critères [Groupes, $F(1,11) = 6,36$, $p < 0,05$] (Figure 17d).

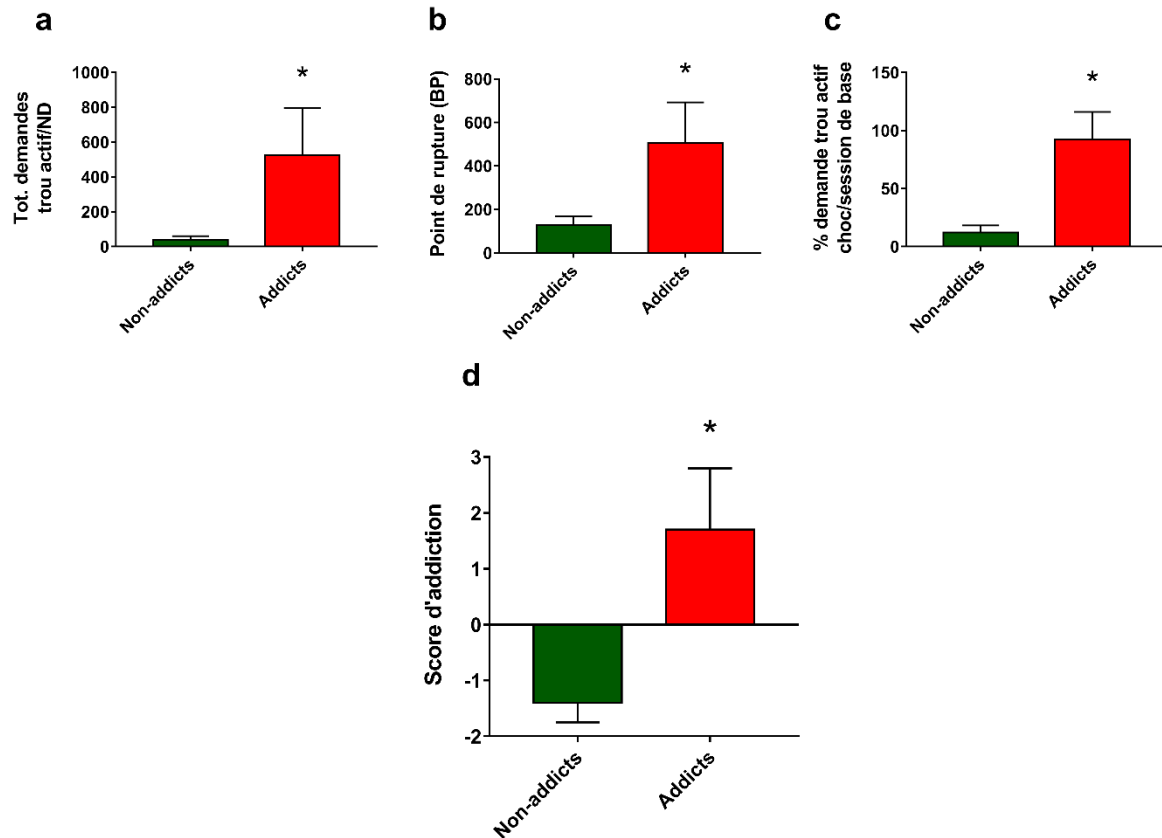


Figure 17 : Mesures de la sévérité de l'usage de cocaïne. a-c. Scores dans les 3 critères d'addiction des rats caractérisés *addicts* et *non-addicts*.

a. Nombre moyen de demandes dans le trou actif en ND (difficulté à contrôler la recherche de drogue), b. Point de rupture dans le protocole de ratio progressif (motivation), c. Nombre d'injections de cocaïne (en % des injections de base) obtenu quand la recherche (FR4) et la prise de cocaïne (FR5) sont punies par un choc électrique (maintien de la demande et de l'usage malgré ses conséquences néfastes). d. Score d'addiction. * $p < 0,05$.

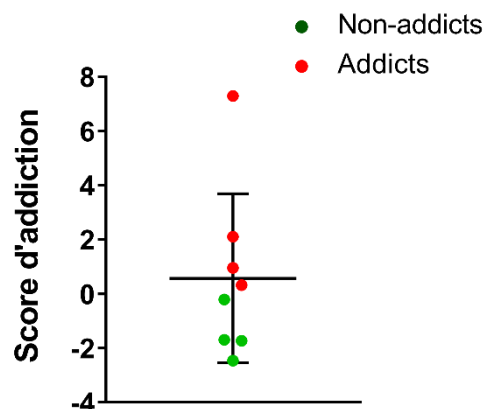


Figure 18 : Scores d'addiction individuels des rats *addicts* et *non-addicts* testés pour les marqueurs de connectivité fonctionnelle au moyen de l'électrophysiologie multi-sites.

Les 8 rats sur lesquels a été réalisée l'étude électrophysiologique (4 *addicts* et 4 *non-addicts*) sont représentatifs des deux groupes *addicts* et *non-addicts*. Ils diffèrent significativement pour le score d'addiction [Groupes, $F(1,6) = 6,44$, $p < 0,05$]. Les scores individuels sont représentés sur la Figure 18.

Suite à l'implantation des électrodes, les rats *non-addicts* mettent un peu plus de temps que les *addicts* à retrouver un nombre total d'injections similaire à leur score avant chirurgie. Ils tendent à différer sur les 6 sessions post-opératoires [Groupes, $F(1,6) = 4,24$, $p = 0,09$]. A partir de la 3^{ème} session d'auto-administration post-opératoire, rats *addicts* et *non-addicts* ne diffèrent plus pour le nombre d'injections par session et sont similaires sur les sessions 3 à 6 post-opératoires [Groupes, $F(1,6) = 0,64$, $p = 0,45$]. A ce stade, nous les avons d'abord réexposés à l'une des deux cages d'auto-administration pouvant accueillir l'électrophysiologie, puis habitués à la connexion au commutateur, via des câbles, des connecteurs situés sur leur tête. Dès lors que les rats ne présentaient plus de perturbation de leurs demandes dans la cage d'électrophysiologie, et avec un total d'injections comparables entre *addicts* et *non-addicts*, nous avons commencé les enregistrements.

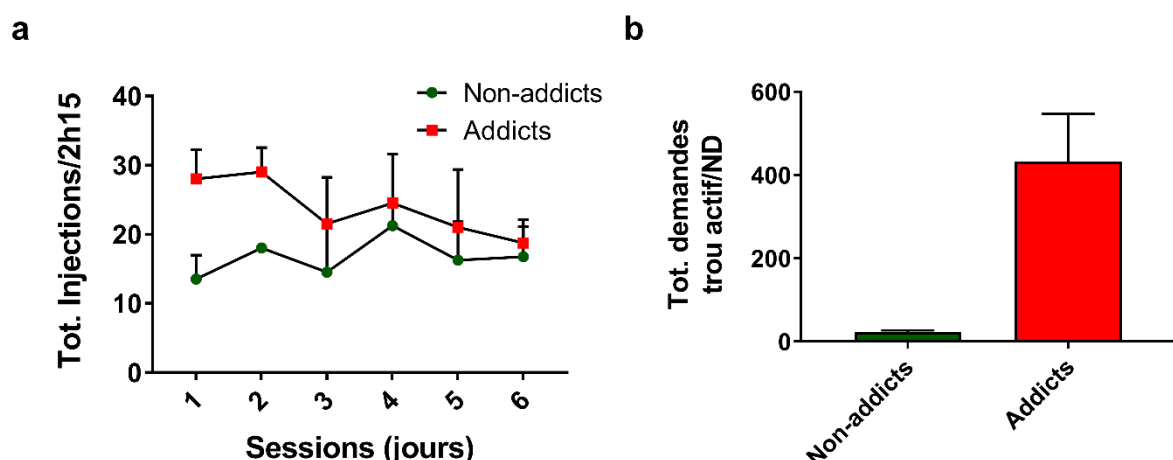


Figure 19 : Comportement d'auto-administration post-chirurgie cérébrale.

a. Total des injections par session chez les rats *non-addicts* et *addicts* au cours des 6 sessions qui ont suivi l'implantation des électrodes intracérébrales. b. Nombre moyen des réponses au trou actif en ND au cours des sessions 3-6.

Données électrophysiologiques

Caractérisation des neurones enregistrés

Au cours des sessions d'enregistrement, sur les 8 rats testés, nous avons identifié au total 268 neurones, 37 % se trouvant dans le mPFC, 17 % dans l'amygdale et 46 % dans le NAc.

Parmi ces 268 neurones analysés, 114 ont été enregistrés chez les rats *non-addicts* et 154 chez les rats *addicts*, avec des proportions différentes en fonction des structures. 48 % des neurones chez les *addicts* et 22 % chez les *non-addicts* ont été enregistrés dans le mPFC. Les neurones enregistrés au niveau de la BLA représentent 34 % des neurones chez les *non-addicts* et seulement 4 % des neurones chez les *addicts*. Le pourcentage de neurones présents dans le NAc était équivalent dans les deux groupes, aux alentours de 45%. Le très faible nombre d'électrodes implantées au niveau de l'HPc (4) explique que l'on n'ait pas pu isoler de neurones dans cette structure. Le nombre d'électrodes étant limité, nous avons privilégié les trois autres structures et focalisé notre attention sur les potentiels de champ dans l'HPc, en raison de son rôle dans la genèse des oscillations thêta (Buzsáki, 2002).

Les électrodes d'enregistrement que nous fabriquons au laboratoire, leur position par rapport aux neurones et dans la structure, ne peuvent pas nous garantir d'enregistrer un pourcentage fixe de neurones par électrode. C'est ce qui explique ces différences entre groupe en fonction des structures.

Par ailleurs, une autre condition indispensable aux analyses présentées ci-dessous était que chaque neurone présente un minimum de 2000 événements (PA). Dans le cas contraire, ils n'ont pas été pris en compte.

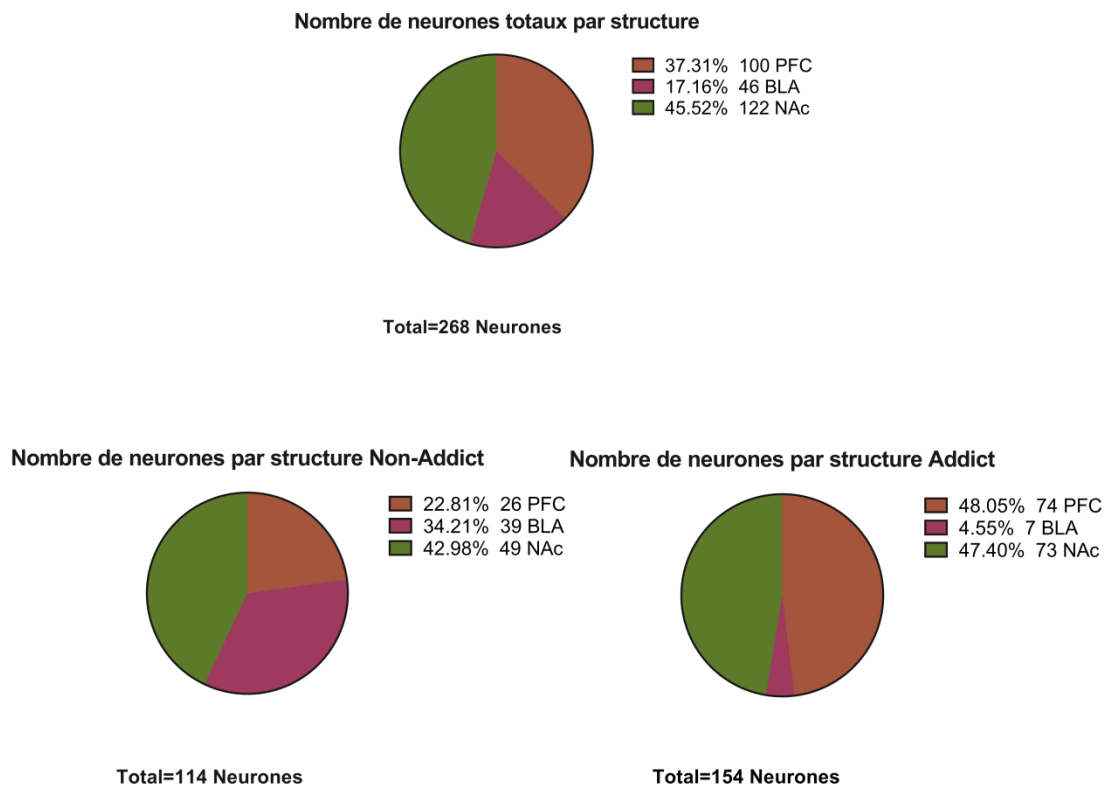


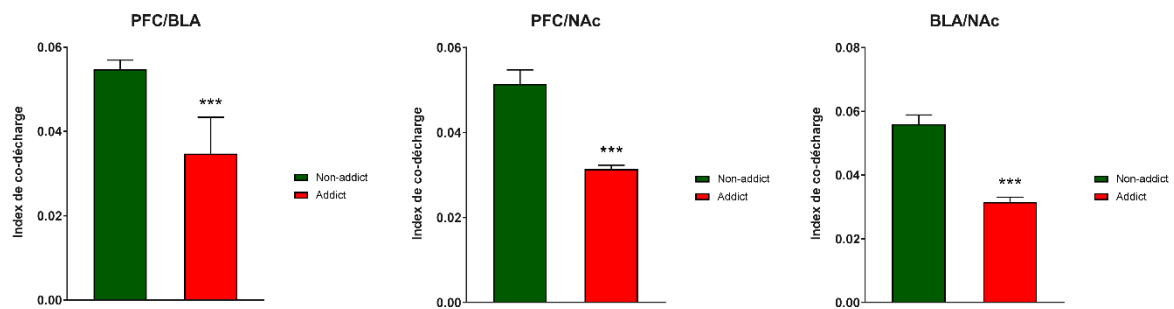
Figure 20 : Représentations du nombre de neurones enregistrés et de leur répartition par structure chez les rats *non-addicts* et *addicts*.

Etude de Connectivité fonctionnelle

L'index de co-décharge est un index de synchronisation entre deux neurones. Il quantifie la co-occurrence des PA entre ces neurones. C'est le premier marqueur de connectivité que nous avons évalué chez les rats *addicts* et *non-addicts*. Si l'on se focalise sur cet index pour des paires de neurones, entre structures, on constate une baisse significative de la synchronisation entre neurones chez les rats *addicts* par rapports aux *non-addicts*, quelles que soient, les paires de neurones mPFC/BLA, mPFC/NAc ou BLA/NAc ($p < 0,05$) (Figure 21a).

Cette différence est également présente au sein d'une même structure dans le cas du mPFC et de la BLA ($p < 0,05$) : la synchronisation des neurones du mPFC et du BLA est significativement inférieure chez les rats *addicts* par rapport au rats *non-addicts*. A l'inverse, on observe une augmentation significative de la synchronisation des neurones du NAc chez les rats *addicts* par rapport au *non-addicts* ($p < 0,05$) (Figure 21b). Cette différence pourrait s'expliquer en partie, par la baisse significative de synchronisation que l'on observe entre les neurones du PFC et du NAc, qui pourrait être à l'origine d'une levée de l'inhibition exercée par le mPFC sur le NAc, induisant une augmentation de la synchronisation et ou de l'activité des neurones du NAc, chez les rats *addicts*.

a



b

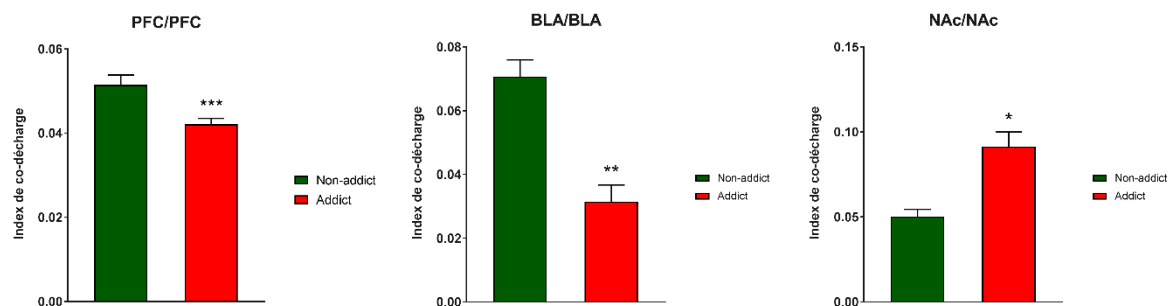


Figure 21 : Index de co-décharge par paires de neurones enregistrés.

a. entre structure ou au sein d'une même structure b. dans le cortex préfrontal médian (PFC/PFC), l'amygdale basolatérale (BLA/BLA) et le noyau accumbens (NAc/NAc).

Après avoir étudié, l'index de co-décharge entre deux neurones, entre et au sein d'une même structure, nous nous sommes intéressés à la synchronisation de deux neurones par rapport à un neurone de référence. Les analyses que nous avons faites, utilisent toujours un neurone du BLA comme référence. Ceci pour 2 raisons, la première c'est que nous avons tracé l'ensemble des combinaisons de triplets de neurones possibles et au vue des histogrammes en trois dimensions obtenus, nous nous sommes rendu compte que dans la majorité des cas, le neurone du BLA déchargeait en premier. Il nous a donc semblé intéressant de le prendre comme neurone référence. La deuxième raison, qui nous a confortée dans ce choix, est une raison purement anatomique puisque l'amygdale projette à la fois sur le mPFC et sur le NAc.

Cette analyse met en évidence, une baisse significative de la synchronisation chez les rats *addicts* par rapport au rats *non-addicts* [Groupes, $F(1,6) = 6,15$ $p < 0,05$] (Figure 22). Au vu de ces résultats, et de ceux que nous avons observés au travers de l'index de co-décharge, nous nous sommes intéressés à l'étude des potentiels de champ et plus précisément aux oscillations thêta. En effet, ces oscillations comprises entre 4 et 9 Hz, sont décrites comme

participant à la synchronisation de neurones de structures différentes dans la réalisation d'une fonction commune.

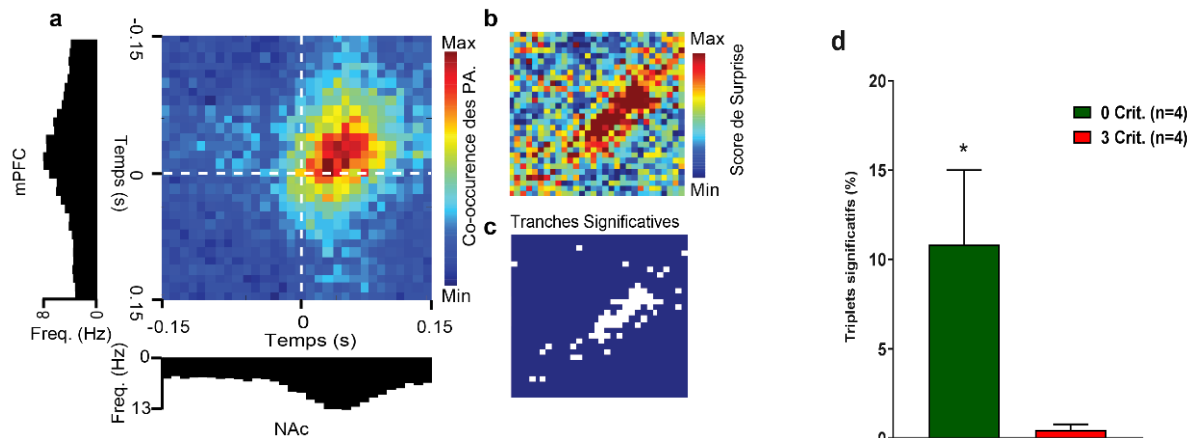


Figure 22 : Analyse de l'activité de triplet de neurones.

a. Représentation d'un histogramme de décharge autour d'un évènement de référence en fonction du temps. Il représente l'activité de deux neurones enregistrés pour l'un dans le cortex préfrontal médian (mPFC) pour l'autre dans le noyau accumbens (NAc) par rapport à l'activité d'un neurone de référence enregistré dans l'amygdale basolatérale (BLA). b. exemple de matrice obtenue après avoir appliqué l'analyse de surprise c. Représentation des triplets significatifs identifiés à partir de la matrice b. d. Pourcentage de triplets significatifs chez les rats addicts et non-addicts.

Les représentations des densités spectrales de puissance normalisée nous ont permis d'analyser les potentiels de champ et d'identifier un pic dans la bande thêta présent entre 6 et 9 Hz. Nous avons analysé le pourcentage que représente ce pic par rapport à l'ensemble du spectre ; c'est le ratio signal sur bruit. Les résultats ont montré que ce rapport est plus faible chez les *addicts* que chez les *non-addicts* au niveau de l'HPC. Alors que ce n'est qu'une tendance au niveau de cette structure [Groupes, $F(1,7) = 3,68$ $p = 0,09$], la différence est significative au niveau du mPFC [Groupes, $F(1,7) = 0,50$ $p < 0,05$], de la BLA [Groupes, $F(1,7) = 8,58$ $p < 0,05$] et du NAc [Groupes, $F(1,7) = 27,51$ $p < 0,005$] (Figure 23). Ces résultats combinés aux résultats obtenus avec les enregistrements d'activité unitaire suggèrent une baisse significative de la connectivité chez les individus *addicts* par rapport au *non-addicts*.

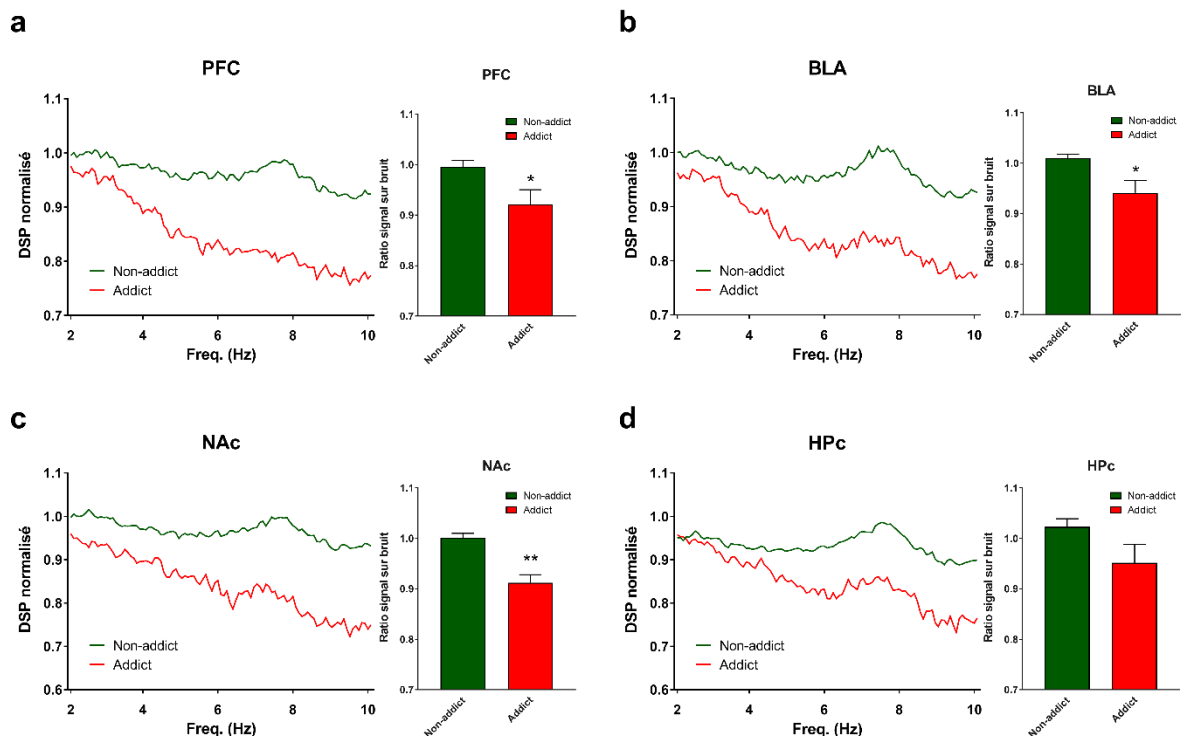


Figure 23 : Courbes représentant la densité spectrale de puissance des potentiels de champ enregistrés chez les addicts et non-addicts.

a. dans le cortex préfrontal médian (mPFC) b. dans l'amygdale basolatérale (BLA) c. le noyau accumbens (NAc) et d. l'hippocampe A droite de chaque courbe, l'histogramme représente le rapport signal sur bruit de la bande 6-9 Hz par rapport à l'ensemble du spectre (2-10 Hz).

Pour finir nous souhaitons évaluer si cette baisse de connectivité observée chez les rats *addicts* était aussi associée à des événements. En d'autres termes nous voulions savoir si elle pouvait être aussi transitoire et s'exprimer en réponse à des stimuli associés à la drogue. Pour cela nous avons analysé la co-décharge des neurones d'une même structure ou entre structures par rapport à un événement de référence. Nous nous sommes intéressés au son 1 associé au FR1, qui marque le début de la séquence nécessaire à l'obtention de la drogue, au son 2 associé au FR5 qui est la dernière demande au niveau du trou actif, permettant d'obtenir la cocaïne et pour finir nous avons pris comme référence le moment de l'injection. Ces données sont préliminaires car le nombre d'événements par session est relativement faible.

Dans le cas où le son 1 est pris comme référence (Figure 24a), on observe une baisse significative du nombre de paires de neurones qui co-déchargent au sein du mPFC et entre le mPFC et la BLA. Une tendance similaire est observée entre le mPFC et le NAc.

Lorsqu'on considère le son 2 (qui annonce l'injection) comme référence (Figure 24b), on observe une tendance similaire de moindre co-décharge chez les rats *addicts*, en particulier entre structures et au sein du NAc.

Différemment, la connectivité entre structures en réponse à l'injection de cocaïne ne paraît pas impactée par le phénotype d'addiction (Figure 24c). L'importante variabilité au sein de chaque groupe expérimental pour les données intra-structures compromet toute tentative d'interprétation.

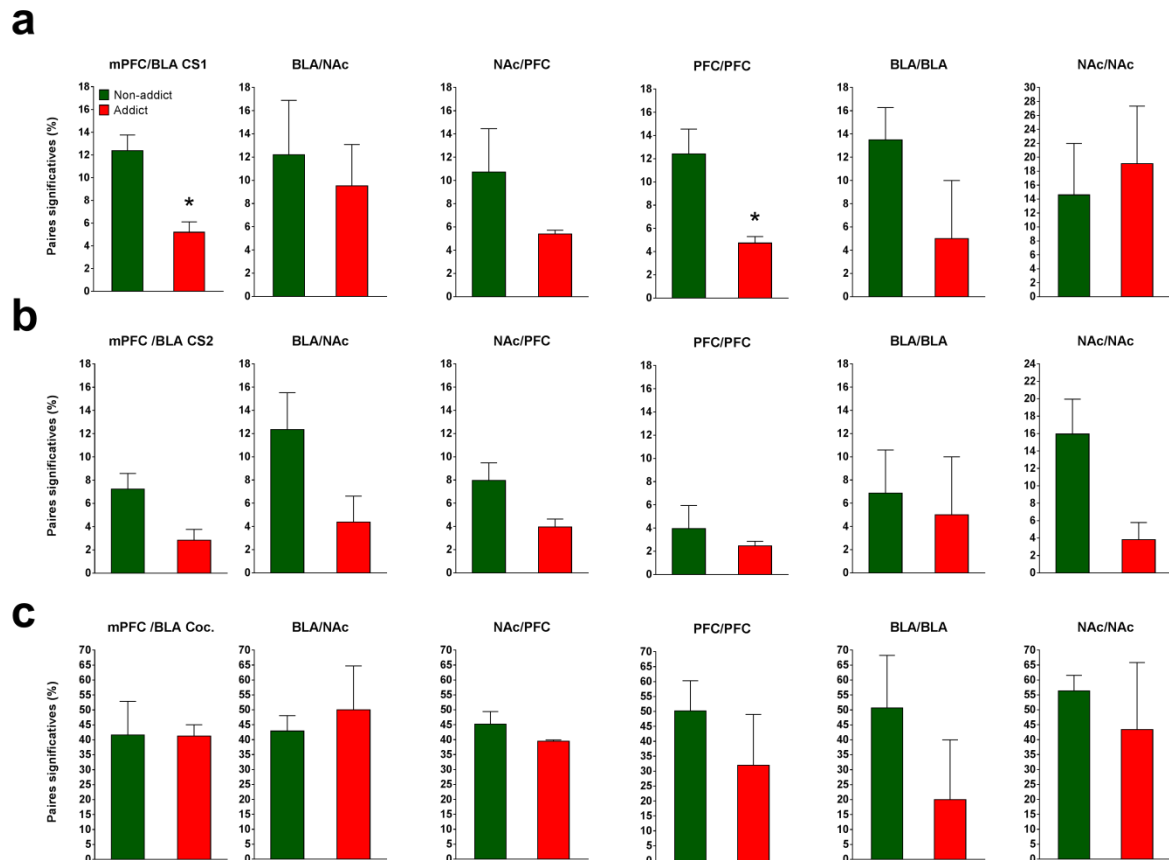


Figure 24 : Paires de neurones significativement corrélées enregistrées par rapport à un évènement de référence.

Dans le cortex préfrontal médian (PFC/PFC), l'amygdale basolatérale (BLA/BLA) et le noyau accumbens (NAc/NAc) ou entre structures (mPFC/BLA, mPFC/NAc, BLA/NAc) lors de la présentation du son 1 (CS1, a.) du son 2 (CS2, b.) ou de l'injection de cocaïne (Coc, c.).

Données histologiques

Lors du sacrifice des rats, suite à une injection de Pentobarbital, et avant la perfusion intracardiaque, nous avons stimulé les électrodes d'enregistrements à 20 μ A pendant 10 secondes grâce à un générateur de courant (Stimulus Isolator, WPI). Le but était d'effectuer une lésion électrolytique pour visualiser les sites d'implantation des électrodes. Cette étape nous a permis de constater que les électrodes étaient situées dans les régions ciblées (mPFC, NAc, BLA et HPc). Il est important de noter que le mPFC est une structure hétérogène et que la distribution des implantations s'étale du centre du PL à la partie haute du cortex infralimbique (IL). La distribution peut paraître un peu déséquilibrée entre *addicts* et *non-*

addicts avec plus de rats *addicts* avec des électrodes centrées sur le PL (Figure 25). Néanmoins, 16 électrodes ont été implantées dans cette structure et elles se distribuent sur une zone dorso-ventrale qui couvre plus que le point indiqué sur le schéma. Cette donnée est néanmoins à considérer pour expliquer une possible hétérogénéité des réponses neuronales observées.

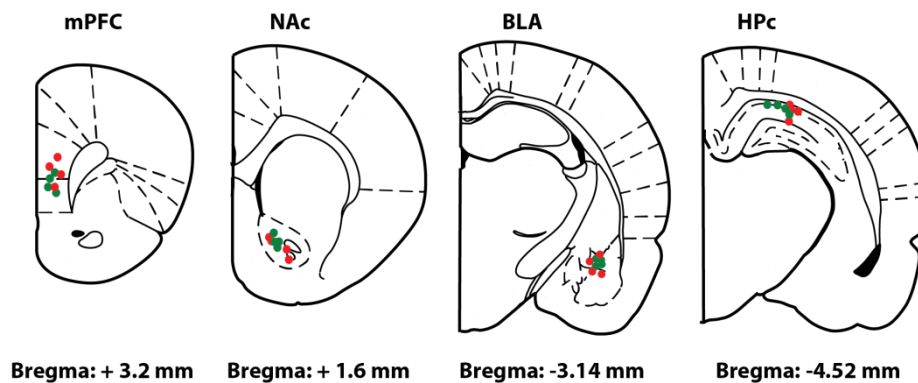


Figure 25 : Représentation des sites d'implantations des électrodes au niveau des structures enregistrées. Le cortex préfrontal médian (mPFC), le noyau accumbens (NAc), l'amygdale basolatérale (BLA) et l'hippocampe (HPc). Les points verts représentent les rats *non-addicts* et les rouges les rats *addicts*.

1.4 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons étudié des marqueurs de connectivité fonctionnelle chez des rats, en fonction de la sévérité de leur usage de cocaïne après soixante-cinq jours d'auto-administration.

L'utilisation du modèle d'addiction, développé au laboratoire, nous a permis d'étudier ces marqueurs chez des rats *addicts* et *non-addicts*. L'ensemble des données suggère qu'il existe une baisse significative de la connectivité chez les rats *addicts*, par rapport au *non-addicts*.

En effet, quelles que soient les paires de neurones analysées, entre ou au sein d'une même structure, on observe une différence significative de l'index de co-décharge entre *addicts* et *non-addicts*, dans le NAc, le mPFC ou la BLA. Il s'agit d'une moindre co-occurrence des potentiels d'action chez les *addicts* dans le mPFC et la BLA, et d'une plus forte co-occurrence dans le NAc. Cette différence de connectivité entre *addicts* et *non-addicts* se confirme lorsque l'on étudie les triplets de neurones. Là aussi, on observe une synchronisation moindre chez les rats *addicts*.

Ces données suggèrent une perturbation de la connectivité fonctionnelle chez les rats *addicts*, qui n'est pas structure dépendante mais générale, ou au moins commune à toutes les structures que nous avons étudiées. L'étude des oscillations thêta soutient cette hypothèse. Nous observons chez les rats *addicts* une diminution significative des oscillations

thêta au niveau du NAc, du mPFC et de la BLA, et une tendance similaire au niveau de l'HPc. Or ces oscillations sont proposées comme fondamentales pour la connectivité fonctionnelle par leur rôle dans la synchronisation neuronale (Chan *et al*, 2017). Par ailleurs, il a été montré que, par le recrutement et la synchronisation de populations neuronales, les oscillations participent de façon effective à l'élaboration de réponses comportementales adaptées (Dejean *et al*, 2016; Karalis *et al*, 2016; Lisman and Buzsáki, 2008).

Malgré leur caractère préliminaire, les analyses, concernant les co-décharges produites en réponse aux stimuli en lien avec les contingences expérimentales, vont dans le même sens. En réponse au stimulus sonore, associé à la première réponse comportementale (ratio fixe 1) de la séquence conduisant à l'obtention de la drogue, moins de paires de neurones co-déchargent chez les rats *addicts*, au sein du mPFC et entre le mPFC et la BLA. En réponse au stimulus sonore, associé à la dernière réponse comportementale (ratio fixe 5) conduisant à l'obtention de la drogue, on observe la même tendance au sein du NAc, entre mPFC et BLA, BLA et NAc, et NAc et mPFC. En revanche, *addicts* et *non-addicts* ne diffèrent pas dans le nombre de co-décharges en réponse à l'injection de cocaïne.

Ces résultats mettent en évidence des modifications de la connectivité fonctionnelle au niveau du mPFC, du NAc, de la BLA, qui sont des structures clés des circuits impliqués dans l'addiction à la cocaïne (Cooper *et al*, 2017).

Une perturbation de la connectivité au sein du mPFC pourrait être à l'origine d'une diminution du contrôle qu'il exerce sur le comportement de recherche de drogue chez les *addicts*, notamment, au travers de ses projections glutamatergiques sur le NAc (Kalivas *et al*, 2005). La diminution de connectivité observée au sein du mPFC pourrait être à l'origine de l'augmentation des co-décharges que l'on a pu enregistrer au niveau du NAc chez les *addicts*, et justifier la recherche et la prise de drogue 'compulsive' que l'on observe chez ces individus.

Il a également été montré, chez la souris, qu'une stimulation optogénétique de la voie BLA-NAc renforce la réponse comportementale pour obtenir d'autres stimulations optiques (Stuber *et al*, 2011). L'amygdale est décrite comme nécessaire pour les apprentissages associatifs (Ambroggi *et al*, 2008), en particulier cocaïne/stimuli, au travers de ses interactions avec le NAc. Une perturbation de la connectivité, au sein et entre ces structures, qui gèrent la valeur motivationnelle attribuée à la drogue, comme nous avons pu l'observer chez les rats *addicts*, pourrait être à l'origine d'un usage excessif et non contrôlé de cocaïne chez ces animaux. Les résultats, obtenus par Ambroggi et al. 2008, suggèrent que les afférences glutaminergiques en provenance de l'amygdale sur le NAc sont nécessaires pour l'activer et promouvoir ainsi la recherche de récompense. La diminution de connectivité observée au niveau de la BLA, et surtout l'augmentation de co-occurrence des neurones au niveau du NAc, pourrait être impliquée dans la forte motivation pour la drogue des rats

addicts. De nombreuses études mettent en évidence une implication du circuit mPFC-BLA dans les processus d'acquisition et d'extinction de la peur (Vouimba and Maroun, 2011), une autre met en avant le recrutement de neurones du NAc par l'amygdale, via le mPFC, qui serait impliqué dans les réponses comportementales conditionnées aux indices (McGinty and Grace, 2008). Les modifications neuronales observées au niveau de ces structures chez les rats *addicts*, qu'il s'agisse des index de co-décharge ou de l'analyse des triplets de neurones, pourraient être responsables d'une dégradation de la perception et d'une mauvaise interprétation de ces indices, les conduisant à produire des réponses comportementales inadaptées. Ces données sont confirmées lorsque l'on étudie les paires de neurones qui co-déchargent en réponse aux stimuli sonores au FR1 et au FR5, par exemple. Ainsi, les rats *addicts* présentent moins de co-décharges dans le mPFC, et entre le mPFC et le BLA, en réponse à ces indices.

Néanmoins, il nous faut rester prudent sur nos conclusions car, dans notre étude, les neurones n'ont pas été caractérisés. Nous ne savons pas de quels types de neurones il s'agit. Bien que l'on ait ciblé des régions identiques, les populations neuronales enregistrées ne sont pas nécessairement les mêmes, d'un rat à l'autre. De plus, que ce soit au niveau qualitatif ou quantitatif, les paires de neurones, par animal et par structure, ne sont probablement pas toujours équivalentes. En effet, même si les zones ciblées sont les mêmes d'un rat à l'autre, les électrodes ne peuvent enregistrer que des neurones situés à une dizaine de μm . Les enregistrements électrophysiologiques sont donc limités à une zone restreinte à l'échelle de la structure. On ne peut donc avoir qu'une vue partielle des différentes populations neuronales qui peuvent la composer. Et pour conclure, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, les analyses de co-décharges, en fonction des indices associés aux contingences expérimentales, ont été réalisées avec un faible nombre d'évènements, car la session d'enregistrement était limitée à 20 minutes.

2. MANIPULATION D'UN MARQUEUR DE CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DE L'ADDICTION A LA COCAÏNE CHEZ LE RAT : LES OSCILLATIONS THETA

L'étude de connectivité fonctionnelle chez les rats *addicts* et *non-addicts*, au moyen des enregistrements électrophysiologiques, a permis d'identifier les oscillations thêta comme un marqueur de l'addiction à la cocaïne. Nous avons observé, chez les rats *addicts*, une baisse significative de ces oscillations au niveau du mPFC, de la BLA et du NAc, et dans une moindre mesure une tendance similaire dans l'Hpc.

Notre objectif dans cette expérience était de tester l'effet d'une inhibition de ce marqueur, sur le comportement d'auto-administration à plus court terme. Après 30 jours d'auto-administration de cocaïne, nous avons testé l'effet d'une injection de muscimol, un agoniste des récepteurs GABA, au niveau du septum médian. Cette structure est considérée comme

génératrice de ces oscillations (Buzsáki, 2002). Le but de cette expérience est de manipuler les ondes thêta sans créer de dommage direct dans les structures d'intérêt que sont le mPFC, le NAc et l'HPc. Pour cela, nous avons implanté des rats avec des électrodes au niveau du PL, de l'HPc et du NAcCore (pour l'enregistrement des oscillations thêta) ainsi que d'un guide canule permettant d'effectuer des injections au niveau du septum médian.

2.1 MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES

Substances pharmacologiques

Le muscimol (M1523-5MG, Sigma-Aldrich, France) utilisé a été dilué dans du liquide cérébro-spinal (CSF) artificiel (0,5 µg muscimol/µl).

Les électrodes

Elles ont été fabriquées avec du fil d'argent (diamètre interne : 127 µm, 178 µm avec la gaine, Phymep, référence n°78600) placé dans des canules de 0,4 mm de diamètre et de longueur différente pour le NAcCore (10 mm) et pour le PL et l'HPc (5 mm) et des connecteurs Ometics à 8 canaux.

Chirurgies

Les procédures chirurgicales et le suivi post-opératoire utilisés sont ceux qui ont été décrits dans les matériels et méthodes généraux. Les aspects spécifiques à cette expérience sont détaillés dans le paragraphe suivant.

Après avoir réalisé la craniotomie et retiré la dure-mère au niveau des zones d'intérêt, c'est le guide canule qui a été mis en place en premier (Plastic One, Bilaney, C315G, 26 Gauges, piédestal de 7mm), au niveau du **Septum médian**, aux coordonnées suivantes : AP = +0,7 mm, L = -1,6 mm, DV = -5,2 mm (par rapport à la surface du cerveau), avec un angle de 15° (López-Vázquez *et al*, 2014) et fixé par du Super-Bond (C&B). Pour éviter tout contact avec l'extérieur, les guides ont été bouchés avec un injecteur factice lorsqu'ils n'étaient pas utilisés (Plastic One, Bilaney, C315 DC, 32 Gauges, longueur 7,5 mm). Dans un deuxième temps, les électrodes ont été successivement implantées puis scellées aux coordonnées suivantes **PL** : AP=3,2mm, L=0,5mm, DV=-3mm **NacCore**: AP=1,6m, L=1,4mm, DV=-6,5mm **HPc** : AP=-4,52, L=3,2, DV=- 2,2. La référence a été positionnée en dernier au niveau du cervelet et réunie avec tous les autres implants par du ciment dentaire. Les rats ont été cathétérisés une semaine après cette intervention.

Injection intracérébrale (IC) de muscimol/véhicule

Elles ont été réalisées 25 min avant le début habituel des sessions de base, une latence démontrée suffisante pour observer une diminution significative des oscillations thêta (Brandon *et al*, 2014). 0,5 µl de muscimol ont été injectés au niveau du septum médian à

raison de 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pour cela, nous avons utilisé un injecteur (Plastic One, Bilaney, C315I, 33 Gauges, 8mm au total, dont 7 mm correspondent à la longueur du guide + 1 mm de projection) couplé à des seringues de 5 μl (Hamilton, 85RN, 26 Gauges) et un pousse-seringue (Harvard Apparatus, Model 22). Nous avons utilisé ce système pour délivrer des volumes ultra-précis à un débit régulier. Lorsque la totalité du volume a été délivré, les injecteurs ont été laissés en place pendant 2 min pour permettre au liquide de diffuser.

Protocole d'auto-administration

Les animaux ont été soumis à un protocole classique, comme décrit dans le matériel et méthode général, avec des sessions de bases composées de 3 périodes de D de 40 minutes séparées par des périodes de ND de 15 minutes.

2.2 PROTOCOLE

Après 3 jours de récupération post-opératoire (cathéter + canule + électrode), 20 rats ont débuté l'auto-administration par une période d'acquisition composée de 3 jours à ratio fixe 3 (FR3). Le reste de l'expérience s'est déroulé à FR5. L'injection de muscimol, et de son contrôle (CSF), ont eu lieu au 31^{ème} et 33^{ème} jours d'auto-administration respectivement, 25 min avant le début de la session, comme cela a été décrit dans le matériel et méthodes.

Immédiatement après l'injection, les rats sont placés dans une cage d'auto-administration couplée à un système d'enregistrement électrophysiologique, décrit dans le matériel et méthode général. Pour éviter que les rats éteignent leur comportement d'auto-administration pendant ces 20 min d'enregistrement électrophysiologique qui précèdent la session d'auto-administration, les deux trous actifs et inactifs ont été remplacés par une plaque et la texture du sol a été changée. Dès la fin de l'enregistrement, les animaux sont placés dans leur cage quotidienne d'auto-administration pour évaluer l'effet des injections i.c. sur la prise de cocaïne au cours d'une session de base.

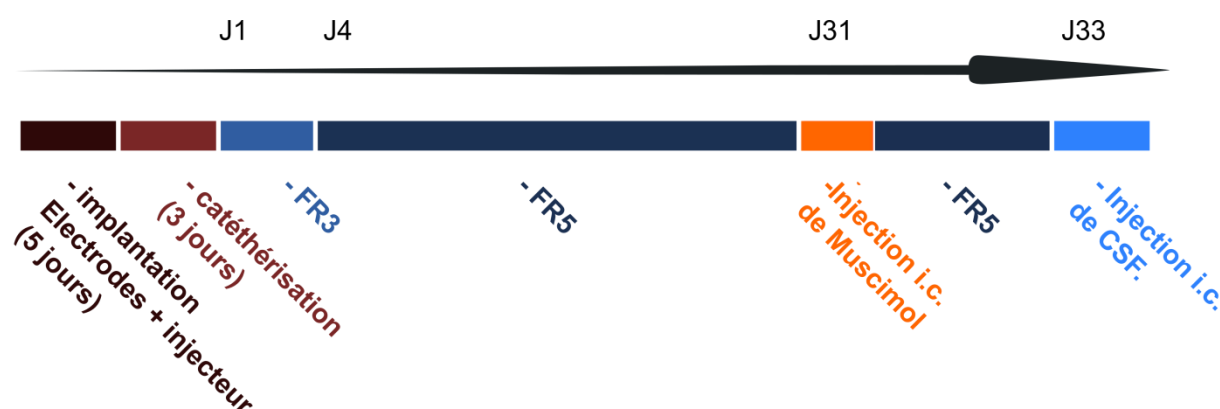


Figure 26 : Protocole expérimental de l'expérience visant à tester l'influence des oscillations thêta sur le comportement d'auto-administration.

2.3 RESULTATS

Deux des 20 rats testés n'ont pas développé un comportement d'auto-administration. Ils ont été exclus avant les premières injections intracérébrales.

Données comportementales et électrophysiologiques

Acquisition du comportement d'auto-administration de cocaïne

Les rats acquièrent le comportement d'auto-administration de cocaïne (Figure 27). Ils discriminent rapidement entre le trou actif et le trou inactif. [Effet Trous, $F(1,11) = 55,49$, $p < 0,000005$]. Cette différence entre demandes dans le trou actif et le trou inactif augmente rapidement [Trou x Temps, $F(27,297) = 6,86$, $p < 0,000005$]. En parallèle, le nombre d'injections total par session augmente lui aussi [Temps, $F(27,270) = 9,43$, $p < 0,000005$] pour se stabiliser autour de 27 à partir de la session 23.

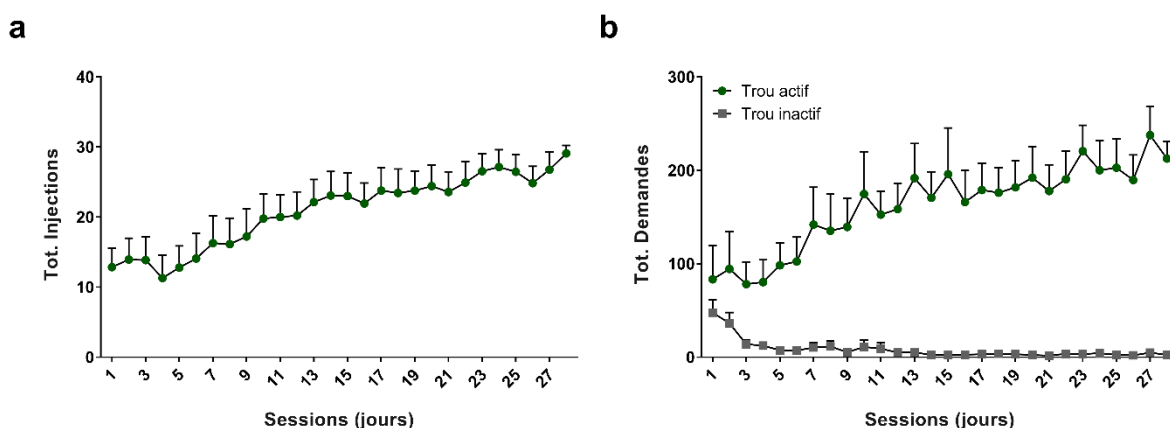


Figure 27 : Acquisition du comportement d'auto-administration de cocaïne des sessions 1 à 28.

a. Nombre moyen d'injections obtenues par session. b. Nombre total moyen de demandes au niveau des trous actif et inactif pendant les 3 périodes de D.

Effet d'une administration intra-septum médian de muscimol sur l'activité theta dans l'hippocampe, le noyau accumbens et le PL

Nous avons évalué, l'activité électrique du PL, du NAc et de l'HPC immédiatement après injection de muscimol dans le septum médian et évalué l'effet du traitement sur les oscillations thêta. Pour cela nous avons, comme cela a été décrit dans le matériel et méthode ci-dessus, enregistré les potentiels de champ au niveau de ces 3 structures, pendant les 20 minutes suivant l'injection de muscimol. Et nous avons analysé le pourcentage que représentait la bande thêta par rapport au reste du spectre. Nous avons également étudié l'impact de l'injection de muscimol sur l'activité motrice des rats pendant l'enregistrement.

Dans l'hippocampe [Effet Traitement, $F(1,6)=22,73$, $p < 0,005$], le PL [Effet Traitement, $F(1,7)=9,08$, $p < 0,05$] et le NAc [Effet Traitement, $F(1,7)=24,68$, $p < 0,005$], l'expression des

oscillations thêta est moindre après administration de muscimol intra-septum médian, qu'après administration de CSF (Figure 28).

L'effet est néanmoins dépendant du temps pour les trois structures [Traitement x Temps : HPC - $F(119,714)=1,99$, $p<0,0001$; PL - $F(119,833)=3$, $p<0,00001$; NAc - $F(119,833)=$, $p<0,0001$]. En effet, le % de thêta est stable après administration de CSF, alors qu'il décroît après traitement au muscimol pour se stabiliser autour de 20%, 10 à 11 min après l'injection (Figure 28).

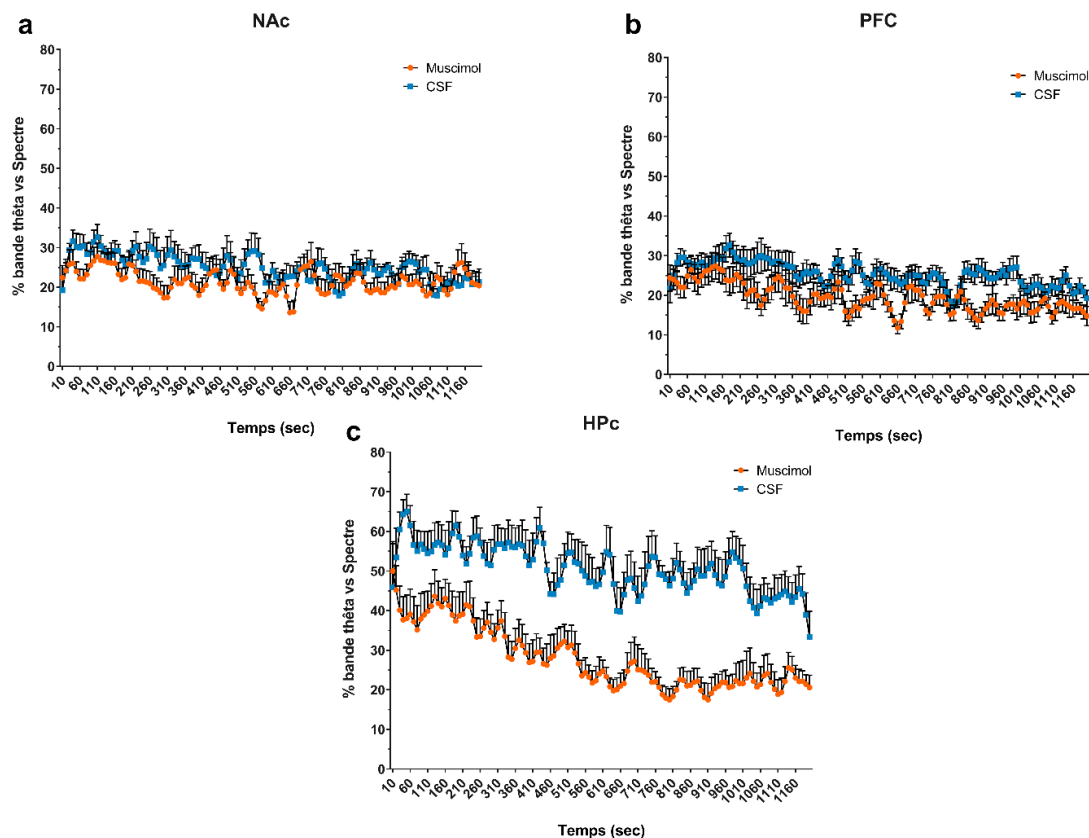


Figure 28 : Effet d'une injection de muscimol sur le taux d'oscillations thêta au niveau du PL (a), du NAc (b) et de l'HPC (c).

L'activité thêta est estimée au travers du ratio signal (d'intérêt) sur bruit, mesuré par le % de signaux dans la bande thêta (6-9 Hz) sur l'ensemble des signaux du spectre (0-10Hz).

Parallèlement, l'activité motrice diminue au cours des 20 min d'enregistrement [Effet temps, $F(119,833)=7,46$, $p<0,00001$] et de façon similaire après muscimol et CSF [Traitement x Temps, $F(119,833)=1,09$, $p=0,23$]. Néanmoins, globalement l'activité motrice est moindre après muscimol qu'après CSF [Effet traitement, $F(1,7)=52,5$, $p<0,001$].

Pendant les deux dernières minutes d'enregistrement, l'activité motrice est similaire dans les deux conditions muscimol et CSF [Traitement, $F(1,7)=2,25$, $p=0,18$]. Pendant cette même période, la proportion des oscillations thêta n'est pas significativement affectée par le muscimol au niveau du NAc [Effet Traitement, $F(1,7)=1,84$, $p>0,2$]. En revanche, et en accord

avec les données de la littérature (Brandon *et al*, 2014), la diminution des oscillations thêta au niveau de l'HPC est toujours significative [Effet Traitement, $F(1,6)=20,1$, $p<0,005$]. C'est également le cas au niveau du PL [Effet Traitement, $F(1,7)=9,5$, $p<0,05$]. Il semble donc qu'on puisse dissocier l'effet sur les oscillations d'un éventuel effet hypomoteur, pour le PL et l'HPC.

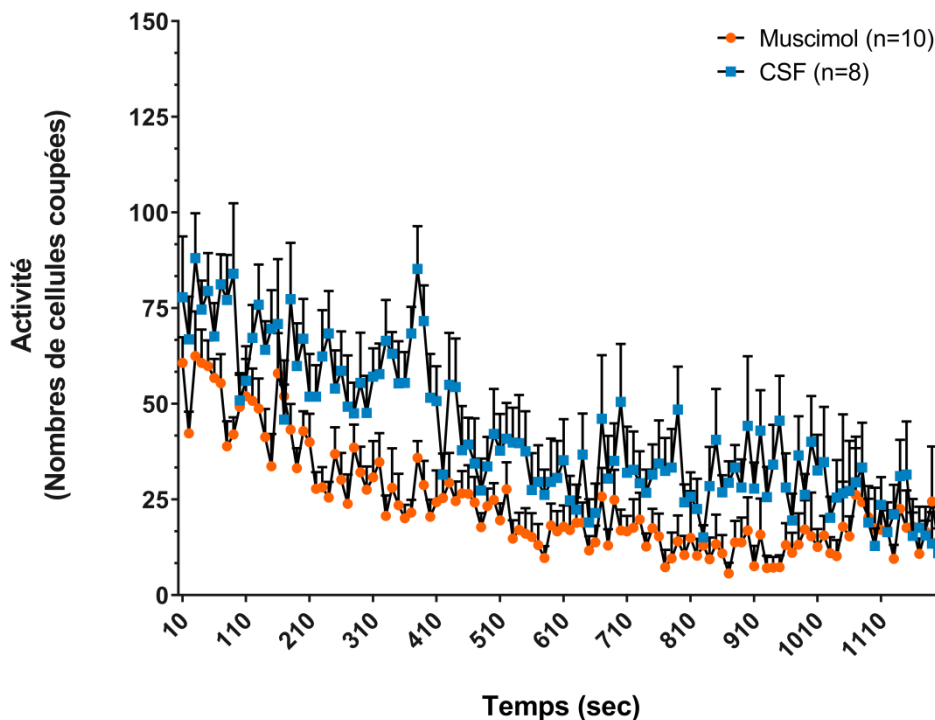


Figure 29 : Activité locomotrice en réponse à une injection i.c. de muscimol.

L'activité est enregistrée pendant 20 min après injection et représentée par tranche de 1 sec pour un parallèle avec les enregistrements électrophysiologiques. Après injection de muscimol en bleu et du contrôle CSF en orange.

Pour affiner l'analyse, nous avons également évalué la synchronisation de l'activité thêta entre les structures. Nous avons réalisé une analyse de cohérence entre les signaux des différentes structures enregistrées, sur les deux dernières minutes de l'enregistrement durant lesquelles les rats ne présentent pas de différence de leur activité motrice. Ces analyses mettent en évidence une baisse de cohérence des activités thêta entre le PL et l'HPC en réponse au muscimol [Effet Traitement, $F(1,6)=16,76$, $p<0,01$]. En revanche, le muscimol intra-septum médian n'affecte pas la cohérence entre le NAc et l'HPC [Effet Traitement, $F(1,6)=2,92$, $p>0,1$], ni entre le PL et le NAc [Effet Traitement, $F(1,6)=3,32$, $p>0,1$] (Figure 30).

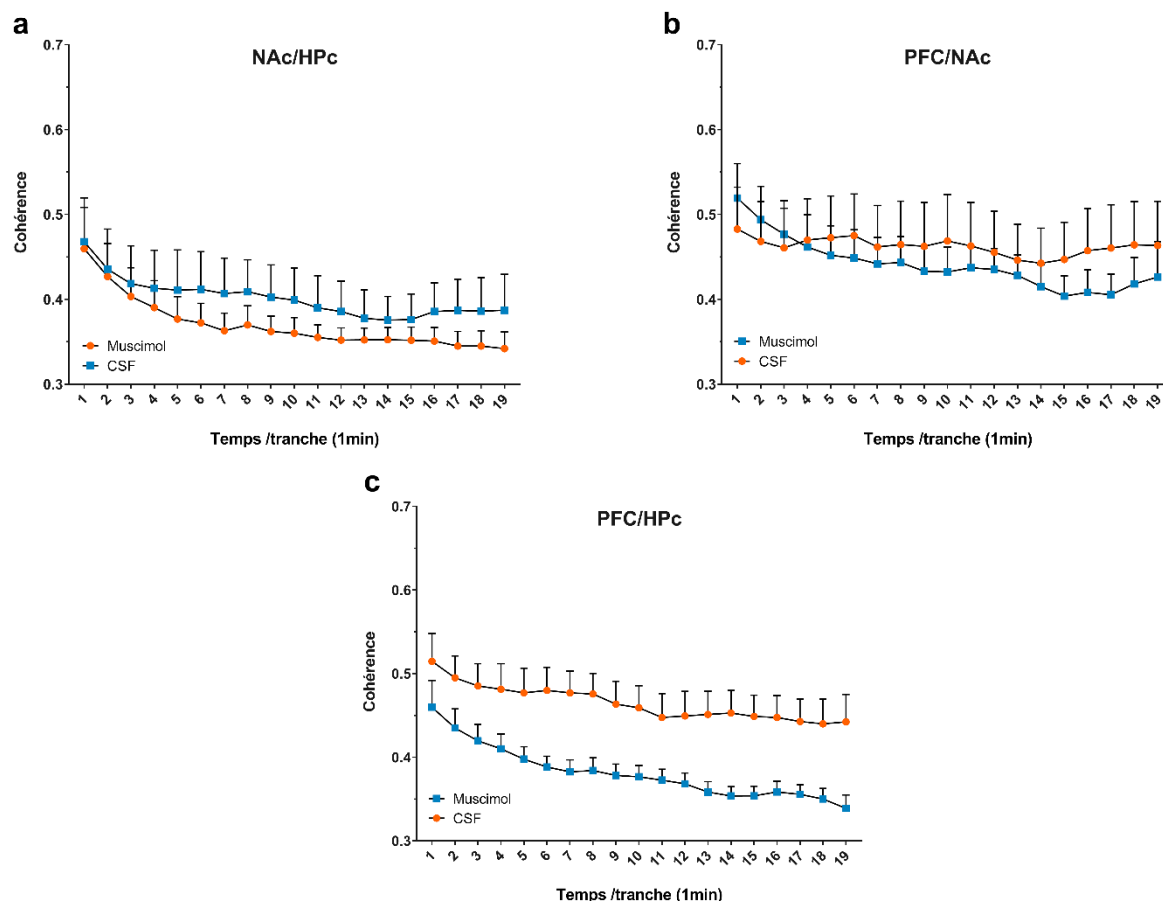


Figure 30 : Effet de l'injection intra-septum médian de muscimol sur la cohérence de l'activité thêta entre les structures enregistrées. Nac/HPc (a), mPFC/NAc (b), mPFC/HPc (c).

- Effet d'une administration intra-septum médian de muscimol sur le comportement d'auto-administration de cocaïne

Suite aux enregistrements électrophysiologiques des potentiels de champ, les rats ont été placés dans leurs cages d'auto-administration pour une session d'auto-administration de cocaïne. L'administration de muscimol a provoqué une baisse significative du nombre d'injections. Nous avons comparé la prise de cocaïne en condition de base à celle en réponse aux injections de muscimol et de CSF [Effet Traitement, $F(2,16)=6,62$, $p<0,01$] (Figure 31). L'analyse pot-hoc montre que c'est l'injection de muscimol qui contribue à cette différence. En effet le nombre d'injections de cocaïne obtenues suite à l'injection de l'agoniste GABA est significativement moindre qu'en condition de base ($p<0,01$) ou qu'après injection de CSF ($p<0,05$). Par contre, l'injection de CSF n'a pas d'effet sur le nombre total d'injections obtenues par rapport à la condition de base ($p>0,3$). L'activité locomotrice dans la cage d'auto-administration, quant à elle, est comparable entre les sessions de base et les sessions où les rats ont reçu une injection de muscimol ou de CSF [Effet Traitement, $F(2,16)=0,06$, $p>0,5$].

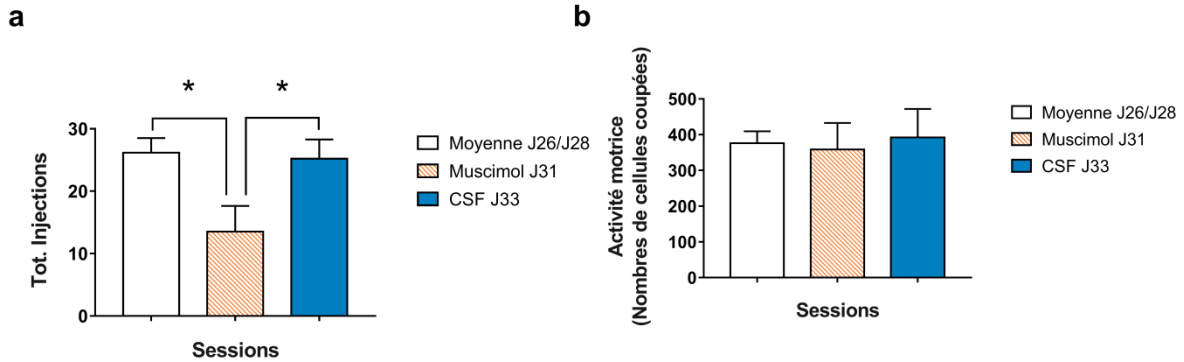


Figure 31: Effet d'une injection intra-septum médian de muscimol sur le comportement d'auto-administration de cocaïne.

a. Nombre total moyen d'injections obtenues sur 3 sessions de base qui ont précédé l'injection de muscimol (Moyenne J26/J28), et au cours de la session test pour le muscimol (J31) ou son contrôle CSF (J33). b. Activité motrice totale dans la cage d'auto-administration au cours de ces mêmes sessions.

La diminution du nombre d'injections, suite à l'injection de muscimol, suggère que les oscillations thêta et leur capacité à synchroniser les structures, pourraient participer au comportement d'auto-administration. Pour exclure une explication purement motrice ou liée à une perte des repaires spatiaux qui pourrait résulter d'une baisse de synchronisation induite par le Muscimol, nous nous sommes intéressés aux latences de la première demande au trou actif et de la première injection de cocaïne. La latence de la première demande au niveau du trou actif tend à différer selon les conditions (base vs muscimol vs CSF) [Effet Traitement, $F(2,16)=3,36$, $p=0,06$] (Figure 32c). Il est important de noter que cette tendance est portée autant par la condition muscimol que par la condition CSF. La latence y est similaire, un peu supérieur à 2 min, contre moins d'une minute pour la condition de base. Pour les séances tests (muscimol et CSF), les rats sont placés préalablement, pendant 20 min pour l'enregistrement électrophysiologique, dans une cage très similaire à la cage d'auto-administration. Bien que la configuration soit différente (comme nous l'avons décrit dans le matériel et méthodes), l'augmentation de la latence entre le début de la session d'auto-administration et la première demande pourrait être liée au délai nécessaire à certains rats pour ré-explore et identifier qu'ils sont dans la cage qui leur permet d'obtenir la drogue.

Le protocole est un ratio fixe 5 (FR5). La latence à la première injection peut donc différer de la latence à la première demande. Pour cette latence à la première injection, on observe une différence significative entre les trois conditions (base vs muscimol vs CSF) [Effet Traitement, $F(2,12)=4,5$, $p<0,05$]. Cet effet ne suit pas le même schéma que la tendance pour les latences à la première demande. Les conditions CSF et de base ne diffèrent pas. L'effet est dû à une latence à la première injection de cocaïne après injection de muscimol. (Figure 32b). La moyenne de la latence à la première injection après muscimol suggère une forte variabilité (Figure 32b) que confirment les données individuelles (Figure 32a). La latence à la première demande n'étant pas affectée par le muscimol plus que par le CSF, cette augmentation de la

latence à la première injection après muscimol pourrait traduire une baisse des effets renforçants de la cocaïne.

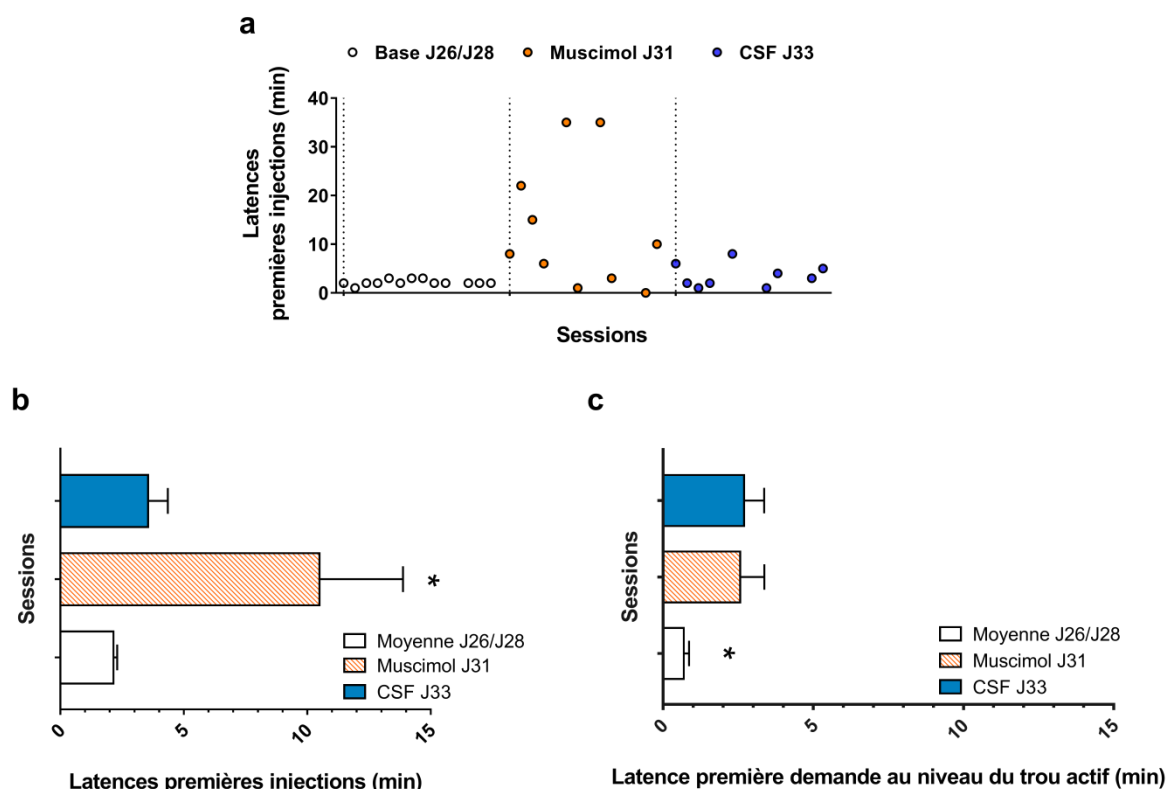


Figure 32 : Effet de l'injection intra-septum médian sur les latences d'initiation des demandes et de la prise de cocaïne.

a. Distribution des latences individuelles d'obtention de la première injection. b. Latence moyenne d'obtention de la première injection des sessions de bases (J26-J28) et des sessions tests (muscimol et CSF). c. Latence moyenne de la première demande au trou actif des sessions de bases (J26-J28) et des sessions tests (muscimol et CSF).

Données histologiques : sites d'enregistrement

A la fin de l'expérience, nous avons vérifié que les guides canules et les électrodes avaient été bien implantés. Comme pour l'expérience d'électrophysiologie couplée au modèle d'addiction, au moment du sacrifice sous anesthésie profonde au pentobarbital, nous avons réalisé une lésion électrolytique, pour visualiser les sites d'implantation des électrodes. L'ensemble des électrodes étaient correctement situées dans les régions ciblées. Nous avons également vérifié l'emplacement des guides au niveau du septum médian et constaté que les injecteurs étaient situés aux coordonnées souhaitées (Figure 1Figure 33).

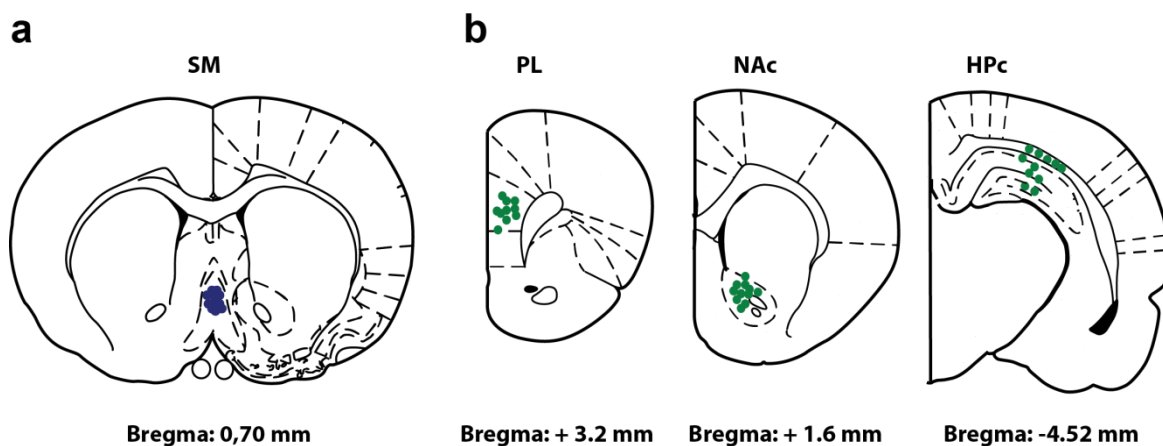


Figure 33 : Représentation des sites d'implantation.

a. de l'injecteur au niveau du septum médian (SM) et b. des électrodes au niveau des structures enregistrées, le cortex pré-limbique (PL), le noyau accumbens (NAc), et l'hippocampe (HPc).

2.4 DISCUSSION

Il est décrit que les oscillations thêta participent à la synchronisation de populations neuronales de structures distantes, pour la planification et la réalisation d'une tâche comportementale adaptée (Dejean *et al*, 2016; Karalis *et al*, 2016). Ayant observé une diminution significative des oscillations thêta, au niveau du mPFC, de la BLA et du NAc, chez les rats *addicts*, nous avons cherché à reproduire cette diminution et à en mesurer les conséquences sur le comportement d'auto-administration.

Dans une condition, provoquant une diminution significative des oscillations thêta au niveau du PL et de l'HPc, et de la synchronisation de l'activité entre deux structures, attestée par la baisse de cohérence, on constate une baisse de la prise de cocaïne. À première vue, cet effet est en contradiction avec ce que nous observons chez les rats *addicts* qui montrent à la fois une diminution des oscillations thêta et une recherche accrue de la drogue.

Il est important de noter que, la baisse des oscillations thêta, tout autant que la diminution du comportement d'auto-administration observée, ne paraissent pas la conséquence d'une perturbation motrice aspécifique. Mais plusieurs aspects, sont toutefois à prendre en compte ; qui pourraient expliquer cette contradiction.

D'une part, nous avons fait le choix de cibler le septum médian pour l'injection de muscimol. Les données de la littérature montrent que cela produit une diminution des oscillations thêta, notamment au niveau de l'HPc décrit comme le chef d'orchestre de ces oscillations, capable de synchroniser les générateurs locaux de ce type d'oscillations, sans créer de dommage direct dans les structures d'intérêt. Dans ces conditions, nous observons des similitudes mais aussi des différences entre les rats de cette expérience et les rats *addicts*. Si on observe une diminution des oscillations au niveau du PL dans les deux cas, dans cette

expérience, et contrairement aux rats *addicts*, il n'y a pas de baisse dans le NAc et une diminution significative au niveau de l'HPc. Ces profils d'inactivation différents pourraient contribuer à l'effet apparemment opposé sur le comportement d'auto-administration.

D'autre part, les deux conditions varient par la durée d'exposition à la cocaïne. Or, à ce stade précoce, les modifications produites par la cocaïne, et impliquées dans l'expression de l'addiction, ne sont probablement pas encore en place (Kasanetz *et al*, 2010, 2013). Par exemple, à un stade précoce d'auto-administration (18 sessions), tous les individus, vulnérables ou résistants à l'addiction, perdent la capacité de produire une forme de plasticité synaptique dans le NAcCore (la dépression à long terme dépendante des récepteurs NMDA). A long terme, cette capacité est restaurée chez les rats résistants, mais pas chez les rats vulnérables, qui sont devenus *addicts* (Kasanetz *et al*, 2010). En revanche, au stade tardif, les *addicts*, et seulement eux, perdent la capacité de produire une autre forme de plasticité dans le PL (la dépression à long terme dépendante des récepteurs mGluR2/3). Il a été proposé que la perte durable de plasticité au niveau du NAc, chez les futurs *addicts*, puisse être responsable de leur perte tardive de plasticité dans le PL (Kasanetz *et al*, 2013).

Les réorganisations des circuits neuronaux à court terme ne sont donc pas les mêmes qu'après une plus longue période d'exposition à la cocaïne, et pas les mêmes selon que l'individu devient *addict* ou pas. Ainsi, certaines altérations observées à long terme chez les *addicts* peuvent ne pas être suffisantes à court terme pour voir s'exprimer une addiction, ou intervenir différemment dans le comportement.

Une diminution des oscillations thêta au niveau de l'HPc et du PL, suite à l'injection de muscimol et la perte de synchronisation entre ces deux structures (Hayen *et al*, 2014), est associée à une diminution très significative de la consommation de cocaïne, à court terme. Ainsi, précocement, les oscillations thêta, et plus précisément les interactions entre l'HPc et le PL, interviendraient dans la facilitation du comportement de recherche de cocaïne. Nous ne mesurons ici que la prise de cocaïne : des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes psychopharmacologiques précis qui sont concernés par ce contrôle par les oscillations thêta. Néanmoins, l'ensemble des données suggère que l'usage chronique de cocaïne, et spécifiquement chez les rats *addicts*, modifie la nature de ce contrôle.

C. CHAPITRE 1 : CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Enjeux techniques

Un enjeu majeur de ce premier chapitre et de ce travail de thèse était technique : mettre en œuvre les outils, et d'établir les conditions, tant techniques qu'analytiques, pour le couplage de l'auto-administration de cocaïne, et plus précisément de notre modèle d'addiction à la cocaïne, avec l'électrophysiologie multi-site.

Les principales difficultés techniques ont été surmontées et la faisabilité a été montrée. Néanmoins, dans un tel couplage, les étapes à risque sont nombreuses et elles se cumulent : le pourcentage limité d'individus qui développent le comportement d'addiction (15 – 20%), la période longue d'auto-administration de cocaïne (plus elle est longue, plus la probabilité de voir des cathéters s'obstruer augmente), la nécessité d'utiliser des stimuli sonores comme discriminatifs, la chirurgie cérébrale opérée après un usage long de cocaïne, les conséquences de cette chirurgie sur le comportement d'auto-administration, la perturbation du comportement par la connexion au système d'enregistrement, l'activité des animaux connectés sous cocaïne, le nombre variable d'enregistrements unitaires par session, par structure et par animal... sont autant de facteurs qui limitent le nombre de données collectées à l'issue de telles expériences. Les facteurs, liés à l'auto-administration *per se*, sont maîtrisés, en raison de notre longue expérience dans le domaine. Des études préliminaires avaient été réalisées pour déterminer les conditions optimales du couplage technique entre l'auto-administration et l'électrophysiologie. Nous avons ainsi adopté une introduction progressive des stimuli sonores qui peuvent se révéler stressants. Nous avons déterminé les conditions d'habituation à la cage d'électrophysiologie pour que le comportement s'y exprime de façon optimale. Il est ainsi nécessaire de procéder progressivement avec des séances sans connexion, puis avec « headstage » mais sans connexion, puis avec connexion.

Malgré l'investissement que représente de telles expériences, l'approche et les données obtenues sont uniques. Il est ainsi possible de questionner, en temps réel, alors que l'animal exécute le comportement d'intérêt, l'activité neuronale au sein de plusieurs structures cérébrales, mais surtout d'évaluer les interactions fonctionnelles entre ces structures. On doit ainsi s'approcher d'une vision plus intégrée, car l'activité cérébrale est, au moins, observée à l'échelle d'un circuit et qu'elle l'est sur un individu entier se comportant.

Par ailleurs, nous appliquons ce type d'approche à un modèle d'addiction à la cocaïne qui permet théoriquement d'identifier des altérations neurobiologiques spécifiques d'un usage mal adapté de cocaïne, maintenu malgré ses conséquences néfastes. En effet, les rats *addicts* et *non addicts*, dont l'activité neuronale a été enregistrée, diffèrent par la sévérité de leur usage de cocaïne, mesurée au travers des trois tests comportementaux utilisés pour

opérationnaliser les critères majeurs de l'addiction, mais ni par la durée de leur expérience de l'auto-administration de cocaïne, ni par la quantité de cocaïne préalablement consommée.

Enjeux conceptuels

En comparant rats *addicts* et *non addicts* au moyen de l'électrophysiologie multi-site, l'objectif conceptuel de ce premier chapitre était d'identifier des marqueurs neurobiologiques de l'addiction à la cocaïne, en lien notamment avec la connectivité fonctionnelle. Au moyen d'enregistrements unitaires, nous avons identifié des différences dans les interactions fonctionnelles entre trois structures cérébrales majeures (PL, NAcCore et BLA) en lien, et indépendamment d'évènements liés aux contingences expérimentales, alors que les rats s'auto-administrent la cocaïne. Ces données suggèrent une baisse de connectivité fonctionnelle, entre et au sein des structures, chez les rats *addicts*, sauf pour ce qui concerne le NAcCore où une augmentation est observée.

Le mécanisme de cette perturbation pourrait trouver son origine dans un défaut de synchronisation des activités oscillatoires de ces structures. Au moyen de l'enregistrement des potentiels de champ, nous avons en effet identifié chez les rats *addicts* des déficits d'oscillations des neurones dans la fréquence thêta au niveau du NAcCore, du mPFC et de la BLA, avec une tendance similaire au niveau de l'HPc. Or ces oscillations sont proposées comme fondamentales, pour la connectivité fonctionnelle, par leur rôle dans la synchronisation neuronale (Chan *et al*, 2017).

Un autre enjeu a consisté à manipuler une des caractéristiques électrophysiologiques des rats *addicts* que nous avons mis en évidence ; pour en étudier l'influence sur le comportement d'auto-administration de cocaïne. Nous avons choisi les oscillations thêta en raison du rôle, évoqué ci-dessus, possiblement causal dans les défauts de connectivité observés chez les rats *addicts*. La baisse significative de ces oscillations, notamment dans le PL et l'HPc, après injection de muscimol dans le septum médian, est associée à une baisse significative du comportement d'auto-administration. Cet effet est observé en dehors de perturbations apparentes de la motricité et des capacités d'auto-administration. Les latences, pour effectuer la première demande et obtenir la première injection de drogue, ne sont pas significativement affectées. L'effet observé suggère que ces oscillations jouent un rôle important dans la synchronisation des activités neuronales entre le PL et l'HPc et que cette connectivité intervient dans le contrôle du comportement d'auto-administration. Ce que nous avons manipulé à court terme, en injectant du muscimol dans le septum médian, est-il représentatif des altérations que nous avons observées chez les rats *addicts* ? Si oui, comment ce contrôle facilitateur à court terme évolue vers un possible contrôle inhibiteur à long terme chez les rats *addicts* ?

Limites et Perspectives

Nous avons montré la faisabilité du couplage entre notre modèle d'addiction et l'électrophysiologie multi-site sur l'animal produisant du comportement d'auto-administration. Nous avons développé des outils spécifiques pour l'analyse de données issues de telles séances complexes d'auto-administration. Néanmoins, conceptuellement de nombreuses questions restent soulevées. Notamment, quelle est la nature des neurones enregistrés ? Est-elle similaire chez les *addicts* et les *non-addicts* ?

Sur un plan de la connectivité fonctionnelle, l'approche reste globale, même si une analyse préliminaire, de la connectivité en réponse aux événements contrôlant la réponse comportementale (stimuli discriminatifs sonores) et l'injection de cocaïne, est proposée. Une autre étape importante pour la compréhension des mécanismes de l'addiction consistera à réaliser des enregistrements alors que les rats sont engagés dans un des comportements testant un des trois critères d'addiction utilisés pour caractériser la sévérité de leur usage. Une étude, préliminaire là encore, a été réalisée, avec des enregistrements unitaires pendant les périodes de non accès à la drogue (ND). Les données suggèrent, notamment au niveau du PL, un patron de réponses antagonistes aux réponses comportementales.

Par ailleurs, concernant le rôle des oscillations thêta dans la connectivité PL-HPc et le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne à court terme doit être approfondi. La nature des mécanismes psychopharmacologiques touchés doit être évaluée. Y a-t-il un changement de la sensibilité aux effets renforçant de la cocaïne, de la motivation pour la drogue, de ses propriétés incitatrices ?

Chapitre 2 : ÉTUDE DU RÔLE DU CORTEX PRELIMBIQUE (PL) DANS LE CONTRÔLE DU COMPORTEMENT D'AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE CHEZ LE RAT.

A. INTRODUCTION

Nous présentons ici, succinctement, le contexte des travaux du chapitre 2. En effet, un article a été publié à partir d'une partie des travaux de ce chapitre, et il est produit dans son intégralité dans les pages suivantes (Martín-García *et al*, 2014).

Le cortex préfrontal (PFC) se compose d'un ensemble de régions impliquées dans la régulation des processus cognitifs, émotionnels et motivationnels. Parmi ces fonctions, celles liées au contrôle comportemental (attention, inhibition des réponses, planification, prise de décision) (Euston *et al*, 2012) sont au cœur du processus addictif et du concept d'*I-RISA*, selon lequel l'addiction associe des processus motivationnels pathologiques à une difficulté à inhiber la recherche et la consommation de drogue.

Longtemps, dans le contexte de la neurobiologie du comportement d'auto-administration de drogue, et de cocaïne en particulier, il a été considéré que le mPFC, et en particulier sa partie ventrale, composée des cortex prélimbique (PL) et infralimbique (IL) jouait un rôle dichotomique, *Go vs Stop*, dans le contrôle du comportement de recherche de cocaïne.

Ainsi, au sein d'un circuit incluant l'IL, la BLA, et le NAc, il a été montré que l'activité du PL favorise la recherche de cocaïne, notamment dans des procédures modélisant la rechute après extinction (Di Ciano and Everitt, 2004; Kalivas and McFarland, 2003; LaLumiere *et al*, 2012; Peters *et al*, 2008a; Stefanik *et al*, 2013a). Cet effet pourrait impliquer spécifiquement la voie PL-NAcCore, puisqu'à elle seule, l'inhibition optogénétique de cette voie bloque la réinstallation par l'administration non contingente de cocaïne du comportement d'auto-administration éteint (Stefanik *et al*, 2013).

Mais un nombre croissant de données, impliquant au contraire le PL dans l'inhibition de la recherche de drogue, questionnait ce dogme. Chez l'homme, le cortex préfrontal latéral, considéré comme l'homologue primate du PL chez le rat (Vertes, 2006), peut être recruté pour inhiber le *craving* chez des sujets dépendants (Goldstein and Volkow, 2011). Chez le rat, le PL contribue à la suppression du comportement d'auto-administration de cocaïne par un choc électrique (Chen *et al*, 2013). Dans le même sens, la capacité d'un rat à inhiber sa recherche de cocaïne, en présence d'un stimulus discriminatif signalant l'indisponibilité de la drogue, dépend de l'activation du PL (Mihindou *et al*, 2013).

L'ensemble de ces données nous a amenés à envisager que dans le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne, le PL joue un rôle plus complexe qu'initialement envisagé, qui pourrait varier selon les contingences expérimentales, à l'image du rôle qu'on lui attribue dans le contrôle du comportement opérant pour des renforçateurs naturels.

Comme nous l'avons rappelé ici et dans l'introduction générale, le mPFC, et le PL en particulier, constitue une structure d'un intérêt majeur dans l'addiction à la cocaïne. Grâce à notre modèle multi-symptomatique d'addiction à la cocaïne, il a été montré que les rats *addicts*, en plus d'un défaut précoce et durable de plasticité synaptique dans le NAcCore (Kasanetz *et al*, 2010), présentent un défaut tardif de plasticité synaptique dans le PL (quand le comportement d'addiction s'exprime) (Kasanetz *et al*, 2013).

Par ailleurs, précocement, bien avant que s'exprime leur comportement 'd'addiction', les futurs rats *addicts* (ou 3crit) diffèrent des rats qui vont 'conserver un contrôle' sur l'auto-administration de cocaïne (*non-addicts* ou 0crit) par les deux caractéristiques suivantes, qu'ils maintiendront à long terme. Après 15-20 sessions d'auto-administration, ils s'auto-administrent la cocaïne à fréquence plus élevée (par bursts). Il est également important de noter que les effets motivationnels de la cocaïne, mesurés dans un test de réinstallation du comportement par l'administration non contingente de la drogue, sont aussi déjà plus élevés chez eux (Belin *et al*, 2009). La prise en *binge* et la sensibilisation motivationnelle (*craving* provoqué par la cocaïne) sont deux caractéristiques de l'addiction à la cocaïne. Le fait que, chez l'animal, elles précèdent le développement d'un comportement de type addiction, suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans le processus addictif. Compte tenu de son implication démontrée dans les propriétés motivationnelles de la cocaïne, le PL est là aussi une possible structure cible.

Le PL est une structure clé ; dont nous souhaitons à terme comprendre le rôle dans la transition à, et l'expression de, l'addiction à la cocaïne, dans notre modèle.

Mais pour comprendre comment son rôle évolue d'un usage précoce à un usage tardif de cocaïne et selon que l'individu développe ou non un comportement d'addiction, il est d'abord fondamental de mieux comprendre ses fonctions dans le contrôle du comportement d'auto-administration à la cocaïne à court terme.

Dans cet objectif, et parallèlement à la recherche de corrélats de l'addiction à la cocaïne au moyen de l'électrophysiologie multi-site (chapitre 1), nous nous sommes intéressés au rôle du PL dans la régulation du comportement d'auto-administration de cocaïne. Nous avons également considéré la fréquence de prise de cocaïne comme un facteur pouvant moduler son rôle. Pour cela, nous avons établi une procédure permettant de mimer et d'imposer une fréquence d'auto-administration proche de celle des rats *addicts* ou de celles des rats *non-addicts*.

Nous avons étudié, chez les mêmes animaux, respectivement après 35 et 39 sessions d'auto-administration de cocaïne, l'implication du PL dans les effets motivationnels de la cocaïne et dans le comportement d'auto-administration de la drogue. Pour cela, nous avons testé, chez tous les individus, l'effet d'une inactivation du PL à la fois sur la réinstallation (en absence de

drogue) du comportement d'auto-administration provoquée par l'administration non contingente de cocaïne ainsi que sur le comportement de base d'auto-administration. Deux groupes de rats ont été constitués et comparés, les uns s'auto-administrant à fréquence 'rapide', les autres à fréquence plus 'lente'. Pour mener à bien cette étude, j'ai développé, pour notre groupe de recherche, les approches d'optogénétique chez le rat et leur couplage au comportement d'auto-administration. L'article, décrivant cette étude et ses données complémentaires, est présenté dans la première partie de ce chapitre 2.

Cette étude a permis d'identifier un rôle dual du PL, facilitant la recherche de cocaïne dans un test de réinstallation, mais inhibant les demandes pendant l'auto-administration, et en particulier celles, inappropriées, émises dans les périodes de *time-out* (périodes post-injection) pendant lesquelles la drogue est inaccessible.

Comme nous l'avons rappelé précédemment, le PL est une structure connectée à un ensemble de structures qui jouent un rôle dans le comportement d'auto-administration de cocaïne et son équivalent chez l'homme est recruté chez le sujet dépendant à la cocaïne, notamment lors de l'inhibition du craving (Goldstein and Volkow, 2011). Après cette première étude identifiant un rôle dual du PL, nous avons cherché à identifier si une seule et même voie, et laquelle, rendait compte de ces effets du PL.

Dans cet objectif, nous avons ciblé la voie PL-NAcCore, précédemment impliquée dans l'effet facilitateur du PL. Pour cela, j'ai eu à adapter, au rat, les techniques d'optogénétique permettant de cibler une voie spécifique.

B. EXPERIENCES

1. IMPLICATION DU PL DANS LE COMPORTEMENT D'AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE EN FONCTION DE LA FREQUENCE DE PRISE DE LA DROGUE : ÉTUDE PAR MANIPULATION OPTOGENETIQUE DU PL

Les matériels, méthodes et protocoles, appliqués spécifiquement pour cette étude, ainsi que les résultats obtenus, sont décrits dans l'article et ses compléments, présentés ci-dessous.

Frequency of Cocaine Self-Administration Influences Drug Seeking in the Rat: Optogenetic Evidence for a Role of the Prelimbic Cortex

Elena Martín-García^{1,2,3}, Julien Courtin^{2,4}, Prisca Renault^{1,2,8}, Jean- François Fiancette^{1,2,8}, Hélène Wurtz^{2,4}, Amélie Simonnet^{2,4}, Florian Levet^{5,6,7}, Cyril Herry^{2,4,9} and Véronique Deroche-Gamonet^{*,1,2,9}

¹INSERM U862, Pathophysiology of Addiction, NeuroCentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, Cedex, France; ²University of Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, Bordeaux, Cedex, France; ³Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, PRBB, CI Dr Aiguader 88, Barcelona, Spain; ⁴INSERM U862, Neuronal Circuits of Associative Learning, NeuroCentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, Cedex, France; ⁵University of Bordeaux, Bordeaux Imaging Center, Bordeaux, France; ⁶CNRS, Bordeaux Imaging Center, Bordeaux, France; ⁷INSERM, Bordeaux Imaging Center, Bordeaux, France

High-frequency intake and high drug-induced seeking are associated with cocaine addiction in both human and animals. However, their relationships and neurobiological underpinnings remain hypothetical. The medial prefrontal cortex (mPFC), basolateral amygdala (BLA), and nucleus accumbens (NAc) have been shown to have a role in cocaine seeking. However, their involvement in regulating high-frequency intake and high cocaine-induced seeking is unclear. We manipulated frequency of cocaine self-administration and investigated whether it influenced cocaine seeking. The contribution of the aforementioned structures was evaluated using changes in expression of the immediate early gene *c-Fos* and targeted optogenetic manipulations. Rats that self-administered at *High frequency* (short inter-infusion intervals allowed by short time-out) showed higher cocaine-induced seeking than low frequency rats (long inter-infusions intervals imposed by long time-out), as measured with cocaine-induced reinstatement. *c-Fos* was enhanced in *High frequency* rats in the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) areas of the mPFC, the BLA, and the NAc core and shell. Correlational analysis of *c-Fos* revealed that the PL was a critical node strongly correlated with both the IL and NAc core in *High frequency* rats. Targeted optogenetic inactivation of the PL decreased cocaine-induced reinstatement, but increased cocaine self-administration, in *High frequency* rats. In contrast, optogenetic activation of the PL had no effect on *Low frequency* rats. Thus, high-frequency intake promotes a PL-dependent control of cocaine seeking, with the PL exerting a facilitatory or inhibitory effect, depending on operant contingencies. Individual differences in cocaine-induced PL activation might be a source of vulnerability for poorly controlled cocaine-induced seeking and/or cocaine intake.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 16 April 2014; doi:10.1038/npp.2014.66

INTRODUCTION

Cocaine addiction is typically associated with the emergence of frequent (bingeing) use (Dackis and O'Brien, 2001; Gawin and Kleber, 1988; Gawin, 1991) and high cocaine-induced seeking behavior (Gawin and Khalsa-Denison, 1996; Jaffe *et al*, 1989). Using a multi-symptomatic model of cocaine addiction in the rat (Deroche-Gamonet and Piazza, 2014; Deroche-Gamonet *et al*, 2004), we revealed that high-frequency self-administration (short Inter-Infusion Intervals) and high cocaine-induced seeking, as measured in a

reinstatement test, are concomitant with the expression of an addiction-like behavior. Also, they precede and predict its development, suggesting a possible role in the addiction process (Belin *et al*, 2009). However, the relationship between high-frequency intake and increased sensitivity to the incentive effects of cocaine, and their possible role in compulsive drug use, as well as the neuronal structures mediating these behavioral effects, remain unknown.

In the present context, the medial prefrontal cortex, in particular the prelimbic area (PL), is a target of interest. The PL is involved in regulating emotional and cognitive aspects of goal-directed behaviors (Vertes, 2006). Evidence implicates it in promoting drug seeking. Indeed, as a part of a network including the infralimbic cortex (IL), the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) and the nucleus accumbens core and shell (NAc core, NAc shell), the prelimbic cortex (PL) has been shown to have a key role in promoting drug seeking in reinstatement procedures (Di Ciano and Everitt, 2004; Kalivas and McFarland, 2003; LaLumière *et al*, 2012; Peters *et al*, 2008; Stefanik *et al*, 2013). For instance, PL, but

*Correspondence: Dr V Deroche-Gamonet, CRI U862, Team Pathophysiology of Addiction—Group Psychobiology of Addiction, Neurocentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, Cedex 33077, France, Tel: +33 5 57 57 36 80, Fax: +33 5 57 57 36 69, E-mail: veronique.deroche@inserm.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

⁹These authors contributed equally to this work.

Received 6 December 2013; revised 9 March 2014; accepted 9 March 2014; accepted article preview online 17 March 2014

not IL, inactivation reduces drug-, stress-, CS- and context-induced reinstatement of cocaine seeking (Ball and Slane, 2012; Bossert *et al*, 2013; Capriles *et al*, 2003; McLaughlin and See, 2003). Moreover, this effect seems to be pathway specific, because the optical inhibition of PL neurons projecting to the NAC core blocked cocaine-induced reinstatement (Stefanik *et al*, 2013).

However, the contribution of the PL could be more complex than solely promoting drug seeking after extinction. Paradoxically, data in both rat models and humans also implicate the PL in inhibition of drug seeking. After extinction, pharmacological inactivation of the PL, did not reduce but, increased nose poking for alcohol, when behavior was reinforced by the drug (Willcocks and McNally, 2013). PL would also contribute to foot-shock-induced suppression of cocaine self-administration in rats. Indeed, optical activation of the PL inhibited responses in rats showing resistance to punishment (Chen *et al*, 2013). Inversely, optical inactivation of the PL promoted cocaine seeking in rats responsive to punishment by foot-shocks. Also, rat's ability to inhibit cocaine-induced reinstatement of drug seeking, when presented with a discriminative cue signaling drug unavailability, depends on neuronal activation within the PL (Mihindou *et al*, 2013). In the same line, neuroimaging studies revealed that drug addicts can suppress drug craving by recruiting the lateral prefrontal cortex (for review (Goldstein and Volkow, 2011)), considered as the primate homolog of the rat PL (Vertes, 2006).

Altogether these observations question the nature of the control of cocaine seeking by the PL. Therefore, it is also unclear whether and how the PL is involved in the regulation of high cocaine-induced reinstatement of drug seeking associated with high-frequency cocaine intake.

In the present work, we first manipulated frequency of cocaine self-administration in rats and investigated whether it altered cocaine-induced reinstatement of drug seeking. Next, using c-Fos expression as a marker of neuronal activity, we tested the impact of *High vs Low frequency* cocaine self-administration on neuronal activity in the PL and aforementioned network including IL, Nac core, Nac shell and BLA. Finally, applying targeted optogenetic manipulations, we aimed at disentangling the role of the PL in cocaine seeking, in both cocaine-induced reinstatement and in a regular self-administration session, as a function of frequency of cocaine intake.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Sprague–Dawley rats ($n=25$ for Experiment 1 and $n=33$ for Experiment 2) weighing 280–300 g at the beginning of the experiments were single housed under a 12 h reverse dark/light cycle (on 2000 hours, off 0800 hours). Details are provided in the Supplementary Information.

Adeno-Associated Viral Vectors

Concentrated Adeno-Associated Viral vectors (AAV) encoding channelrhodopsin-2 (AAV-CamKIIa-hChR2(H134R)-EYFP, serotype 5, Vector Core, University of North Carolina)

(ChR2 group), archaeorhodopsin (AAV-CamKII-ArchT-EYFP, serotype 5, Vector Core, University of North Carolina) (ArchT group), or enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) (AAV-CamKIIa-EYFP, serotype 5, Vector Core, University of North Carolina) (Control, EYFP group), under the control of the calcium calmodulin kinase II (CamKII) promoter were used. Under optical stimulation, excitatory projection neurons expressing ArchT and ChR2 were inhibited and activated, respectively. The EYFP group was used as a control for psychopharmacological consequences of AAV injection and optical stimulation. Following the completion of the self-administration experiment, brain immunohistochemistry was performed on all rats to localize virus expression, through EYFP expression, and to control for optic fiber placement.

Drugs

Cocaine hydrochloride was obtained from COOPER (Bordeaux, France) and dissolved in sterile 0.9% physiological saline. Ketamine hydrochloride (80 mg/kg) (Imalgène 1000; Rhône Mérieux, Lyon, France) and xylazine hydrochloride (16 mg/kg) (Rompun; Rhône Mérieux, Lyon, France) were mixed with saline and administered intraperitoneally in a volume of 20 ml/kg of body weight.

Surgeries (Detailed in the SI)

Surgery for self-administering rats (Experiment 1). A silastic catheter was implanted in the right jugular vein, as previously described (Belin *et al*, 2009).

Surgeries for brain optogenetic manipulations in self-administering rats (Experiment 2). Rats underwent two surgeries 5 days apart. First, AAV expressing ChR2 ($n=11$), ArchT ($n=15$), or EYFP (controls, $n=7$) (approximately 0.4 μ l per hemisphere) were bilaterally injected using glass pipettes (tip diameter 10–20 μ m) connected to a picospritzer (Parker Hannifin Corporation) into the PL, at the following coordinates: 3.2 mm anterior to the bregma, 0.5 mm lateral of midline, 2.6 mm below the cortical surface, according to a classical stereotaxic procedure based on the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005). Second, rats were implanted with an intravenous catheter in the jugular vein and bilateral optic fibers directed to the PL (diameter: 200 μ m; numerical aperture: 0.37; flat tip, Doric Lenses). Implants were fixed to the skull with Super-Bond dental cement (Sun Medical, Shiga, Japan).

Intravenous Self-Administration Apparatus

The self-administration setup, consisting of 40 self-administration chambers made of plexiglas and metal (Imetronic, Pessac, France), and equipped with holes as operant manipulanda (Belin *et al*, 2009), is detailed in the Supplementary Information.

Cocaine self-administration. Cocaine self-administration (0.8 mg/kg/40 μ l infusion, i.v.) sessions were conducted daily, between 1000 and 1300 hours, 5–7 days per week. A blue cue light served as a discriminative stimulus signaling drug availability and was off during time-out (TO).

Introduction of the rat's nose into one hole (active device) turned on the white cue light, located above it, and, then 1 s later, the infusion pump was switched on for 2 s. The white cue light remained on for a total of 4 s. Nose-pokes in the other hole (inactive device) had no scheduled consequences.

Cocaine-induced reinstatement. During cocaine-induced reinstatement tests, cocaine was not available contingently. Following a 90-min (Experiment 1) or 50-min (Experiment 2) period of extinction, four increasing doses of cocaine (0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 mg/kg/infusion, i.v.) were delivered non-contingently at a rate of one infusion every 30 min. Over the whole session, active and inactive nose-pokes were recorded but were without scheduled consequences (details in the Supplementary Information). The discrete cocaine-associated cue light was not delivered during reinstatement sessions, either contingently or non-contingently.

In total, in Experiments 1 and 2, rats were tested in self-administration (and reinstatement) sessions over 35 and 39 days, respectively.

c-Fos Immunohistochemistry

Brain sampling and staining. Rats were anesthetized by inhalation of 2.5% isoflurane using oxygen as a vehicle and perfused transcardially with a solution of 9 g/l NaCl followed by 4% of paraformaldehyde in phosphate buffer (PB; pH = 7.4). Four drug-naïve control rats were killed at the same time. They were moved daily to the self-administration room together with the other rats. They were manipulated as the others, spent the session time in the self-administration experimental room, but in their home cage. The tissue for immunohistochemistry was processed as previously described (Herry and Mons, 2004) (details in the Supplementary Information).

Visualization and quantification of c-Fos expression. The stained sections of the brains were visualized at $\times 10$ magnification using an epifluorescent microscope coupled to a high-sensitivity camera driven by the MetaMorph software. Transmission acquisition mode was used to scan slides. Slide area was reconstructed with mosaic images produced with a motorized stage Scan. Equipment is detailed in the Supplementary Information.

Using ImageJ software, c-Fos-positive cells were quantified in the five structures of interest in both hemispheres and expressed as mean number per mm² of standardized fixed-area shapes (coordinates according to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005); coordinates relative to the bregma): IL (3.24 mm), PL (3.24 mm), Nac core (1.20 mm), Nac shell (1.20 mm), BLA (−2.64 mm). Areas sampled are indicated by black squares in Figure 4 and Supplementary Figure S5. For each region, the results of two successive slices were averaged. At all stages, the experimenter was blind to the experimental groups. For details see Supplementary Information.

Optogenetic Setup and Stimulation Protocol

Optogenetic manipulations were performed 38–41 days after virus injection. Stimulation of *ChR2* or *ArchT* (approximately 5 mW per implanted fiber, 250 ms pulse width, 1 Hz, during

the entire session) was delivered using a TTL pulse generator.

Each implanted optic fiber was connected to a LED module (465 nm) mounted on a dual LED Commutator, which was connected to a LED driver system (PlexBright, Plexon, USA) powered by the TTL pulse generator (Imetronic, Pessac, France). A dual pharmacology/optic fiber-motorized commutator (Imetronic, Pessac, France) assured smooth and combined rotation of optical fibers and cocaine self-infusion line, allowing animals to move as freely as usual. Details are provided in the Supplementary Information.

Efficiency of optical stimulation in activating/inhibiting neuronal activity in the PL was controlled in independent groups of rats injected with *ChR2* ($n = 2$) and *ArchT* ($n = 2$), using *in vivo* single unit electrophysiological recordings in behaving rats (Supplementary Information for details and Supplementary Figure S7).

EYFP Immunohistochemistry

Brain sampling and visualization of EYFP expression. Brain sampling was similar as for c-Fos immunohistochemistry. After short post-fixation, 80- μ m-thick coronal sections were cut and mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Images were acquired using a $\times 20$ digital slide scanner Nanozoomer 2.0 (Hamamatsu, Massy, France).

Calculation of Brain Cocaine Concentrations

In Experiment 1, whole-brain levels of cocaine were mathematically evaluated using a two-compartment model for rats receiving a chronic cocaine i.v. regimen (Zimmer *et al*, 2011; 2012) (details in the Supplementary Information).

Experimental Procedures

Acquisition of cocaine self-administration (Experiments 1 and 2). Three to five days after surgery (the second surgery in case of Experiment 2), rats were trained to self-administer cocaine (0.8 mg/kg/infusion) on an FR3, then FR5, (3 and 5 days, respectively) schedule of reinforcement, with a 40-s TO. The session ended after 180 min or 30 infusions. Criteria for acquisition of cocaine self-administration were defined by a stable number of self-infusions ($\pm 10\%$) and significant discrimination between active and inactive holes, over at least three consecutive self-administration sessions.

Experiment 1: implementation of procedures promoting High vs Low frequency cocaine self-administration: effect on cocaine-induced reinstatement and cocaine-induced c-Fos expression. After the eight acquisition sessions described above, three homogeneous groups were formed ($n = 8$ –9 per group) and assigned to 2- (2minTO), 4- (4minTO), or 6-min (6minTO) TO conditions. The procedure was similar to the one applied during the last five acquisition sessions (FR5), except for the TO and a reduction of the maximal number of infusions to 25. The number of infusions was reduced to minimize possible differences between the three groups (notably allowing the

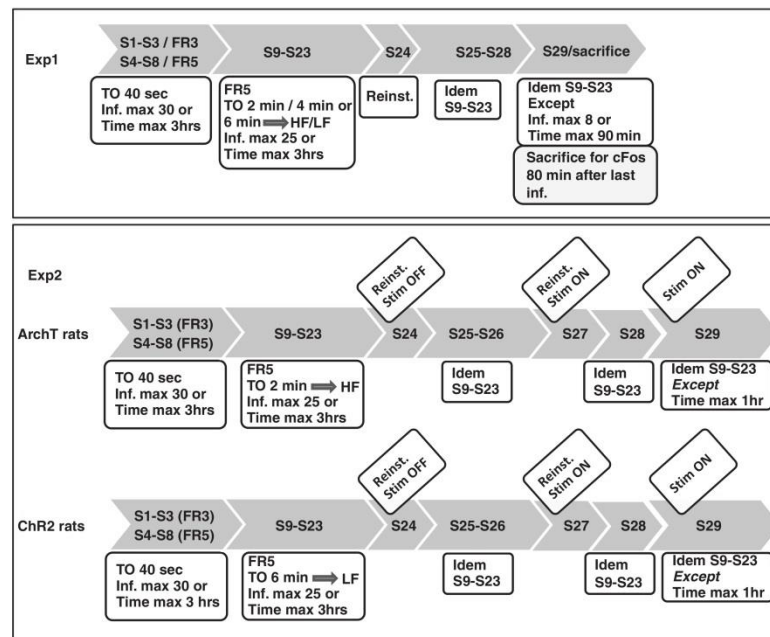


Figure 1 Experimental procedures applied in Experiments 1 (Exp1) and 2 (Exp2). FR, fixed ratio; S, session; and TO, Time-Out. Stim refers to optical stimulation. ArchT and ChR2 refer to the two groups of rats administered with AAV-CamKII-ArchT-EYFP and AAV-CamKIIa-hChR2(H134R)-EYFP in the PL for optical inactivation and activation, respectively. High frequency (HF) and Low frequency (LF) protocols were applied to ArchT and ChR2 rats, respectively. Control rats received EYFP in the PL and were tested for self-administration (HF) as ArchT rats.

6minTO group performing the maximal number of infusions within the allocated time). This procedure generated different frequencies of cocaine self-administration evaluated by the mean inter-infusions interval (III) and allowed separation in two groups showing short (*High frequency* rats, $n=12$) and long III (*Low frequency* rats, $n=13$) (see Results section). To evaluate the incentive properties of the drug, cocaine-induced reinstatement (Belin *et al.*, 2009; Epstein *et al.*, 2006) was tested on session 24, ie, after 15 sessions of this new TO procedure.

After cocaine-induced reinstatement, four additional training sessions were performed in the same conditions as sessions 9 to 23. Then a subset of 12 representative rats (*High frequency*, $n=6$; *Low frequency*, $n=6$) were submitted to a last session using a similar procedure, except that session stopped after eight infusions or 90 min. Following the session, rats were immediately returned to the vivarium and killed 80 min later. c-Fos expression reflects strong neuronal activity about 1 h before sacrifice. The 80-min lapse was chosen because it allowed cocaine to decrease to comparable low brain levels in the two groups about 1 h before sacrifice (see schematic procedures in Figure 1).

Experiment 2: optogenetic manipulation of neuronal activity in the PL: effect on cocaine-induced reinstatement and cocaine self-administration in High and Low frequency rats. On the basis of Experiment 1, we observed a higher cocaine-induced reinstatement in *High frequency* than in *Low frequency* rats. As the PL had been shown to

promote drug seeking in reinstatement procedures, we hypothesized that the difference between the two groups resulted from a hyper- vs a hypoactivity of the PL in *High vs Low frequency* rats. Therefore, we planned to inactivate the PL in the *High frequency* and activate it in the *Low frequency* rats.

After acquisition, EYFP ($n=7$) and ArchT ($n=15$) rats were assigned to the *2minTO* procedure (*High frequency*), and ChR2 rats ($n=11$) were assigned to the *6minTO* procedure (*Low frequency*). Accordingly, the *2minTO* generated a higher frequency of intake compared with the *6minTO*. Each rat was tested once between sessions 16 and 19, with optical fibers connected, to identify possible disruptive effects of head connection on self-administration behavior. Two tests of cocaine-induced reinstatement were performed, on sessions 24 and 27; optical stimulation being applied in session 27. On sessions 25, 26, and 28, a basal FR5 procedure was applied, with a *2minTO* or *6minTO* depending on the group. On session 29, rats were tested in a 1-h cocaine self-administration session with the same basal FR5 procedure and with optical stimulation applied.

After experiment completion, eight rats were excluded (one EYFP, four ArchT, and three ChR2) for reasons described in the Supplementary Information.

Data Analysis

Cocaine self-administration. Total responses in the active and inactive holes and total number of cocaine infusions per self-administration session were considered.

Frequency of cocaine intake. Frequency of cocaine self-administration was determined according to III. It was calculated as the mean time, in minutes, between each infusion and the following one.

Cocaine-induced reinstatement. For each hole, responses were segregated in 5-min blocks. Extinction behavior was analyzed by comparing responses in the active vs inactive holes over the first 90 min (Experiment 1) or 50 min (Experiment 2) of the session. Cocaine-induced reinstatement (the last 120 min of the session), as a function of the dose, was analyzed by comparing responses in the active and inactive holes over the first 15 min following each cocaine infusion. For Experiment 1, the time course of active responses over the 120 min following the first cocaine infusion is also presented.

c-Fos immunohistochemistry. Beside quantitative differences in the mean number of c-Fos-positive cells per mm², indices of altered functional connectivity between the five structures of interest were also investigated. First, a descriptive approach using Hierarchical Ascendant Cluster Analysis was applied. It provides a qualitative picture (translated into a cluster tree) of the hierarchical distance between structures. Second, to support and complete the descriptive cluster analysis, a correlation approach was applied. It allows evaluating, and statistically testing, the nature and strength of the relationships between c-Fos activities in pairs of brain structures. See Supplementary Information for details.

Effect of optogenetic stimulation on cocaine-induced reinstatement and cocaine self-administration behavior. As eight rats were excluded, analyses were performed on 25 rats (six *EYFP*, eleven *ArchT*, and eight *Chr2*) using within-subject designs. For cocaine-induced reinstatement, the non-stimulated condition (session 24) was compared with the stimulated condition (session 27). Similarly, for cocaine self-administration, we compared behavior in session 29 (1 h session during which optical stimulation was applied) with behavior expressed over the same period of time during basal self-administration sessions (mean over sessions 26 and 28). Active and inactive nose-pokes, infusions, and III were analyzed.

Statistical Analysis

Self-administration behavior was analyzed using repeated-measures ANOVA with time (number of sessions, 1 or 5 min time blocks) or hole (active vs inactive) or stimulation (On vs Off) as a within-subject factor and group (*High* vs *Low frequency*/2minTO vs 4minTO vs 6minTO/*EYFP* vs *Chr2* vs *ArchT*) as a between-subject factor. c-Fos expression data were analyzed using one-way ANOVA with experimental groups as a between-subject factor. For both self-administration and c-Fos data, significant main effects or interactions were explored by pairwise comparisons of means using the Newman Keuls *post hoc* test. Pearson's correlation analyses were used to investigate correlations in c-Fos expression data between the five structures of interest. Student's *t*-test was used to investigate effects of optical

stimulation on firing frequency of PL neurons in the electrophysiological experiment. The results are presented as mean $\pm$ SEM. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using the STATISTICA 6.0 data analysis software system (StatSoft, Tulsa, OK, USA, 2001).

RESULTS

Acquisition of Cocaine Intravenous Self-Administration and Induction of Distinct Frequencies of Intake

Experiment 1. Over the first eight sessions, rats acquired cocaine self-administration (FR3/FR5, 40 s TO). On the basis of the last three acquisition sessions, three homogeneous groups were formed. Evidence of self-administration acquisition (Supplementary Figure S1) and homogeneity of experimental groups (Supplementary Figure S2) is described in the Supplementary Information.

Each group was then given a distinct TO period (2, 4, or 6 min). The procedure immediately produced different frequencies of intake as measured by the mean III (Supplementary Figure S3A–C). In each group, the IIIs were normally or log-normally distributed and centered on 3, 5, and 7 min, respectively. Therefore, low and high extremes in the 4minTO group overlapped with the 2minTO and 6minTO groups, respectively. Consequently, all rats were pooled and divided in two groups based on the median III value: High III ($n = 13$, mean III = 6.20 ± 0.25 , for *Low frequency* rats) and Low III ($n = 12$, mean III = 3.49 ± 0.22 , for *High frequency* rats). These two groups did not differ for III over the eight acquisition sessions, but did over the 19 following sessions, as expected (Figure 2a). Notably, the two groups were not significantly different for nose-poke responses and discrimination (Figure 2c) or for cocaine intake during all 27 self-administration sessions (Figure 2b).

Experiment 2. All groups acquired cocaine self-administration similarly. Starting session 9, *ArchT* and *EYFP* rats, trained with the 2minTO condition, constituted *High frequency* rats. The *Chr2* group, trained with the 6minTO condition, constituted *Low frequency* rats.

Cocaine-Induced Reinstatement is Increased in *High* vs *Low frequency* Rats (Experiments 1 and 2)

In both Experiments 1 and 2, rats were tested for cocaine-induced reinstatement in session 24. In Experiment 2, rats equipped for PL optogenetic stimulation were tested in the control condition; ie, the optic fibers were connected but the stimulation was not activated. *EYFP* and *ArchT* rats, trained with the 2minTO condition, did not differ and were pooled as *High frequency* rats.

Extinction. In Experiment 1, *High frequency* rats nose-poked more than *Low frequency* rats (Group effect, $F(1,23) = 4.86$, $p < 0.05$). This effect relied on more nose-pokes in the active hole during the first two 5-min time-blocks (Group $\times$ Hole $\times$ Time, $F(17,391) = 2.06$, $p < 0.001$). Importantly, however, the two groups showed a similar extinction rate,

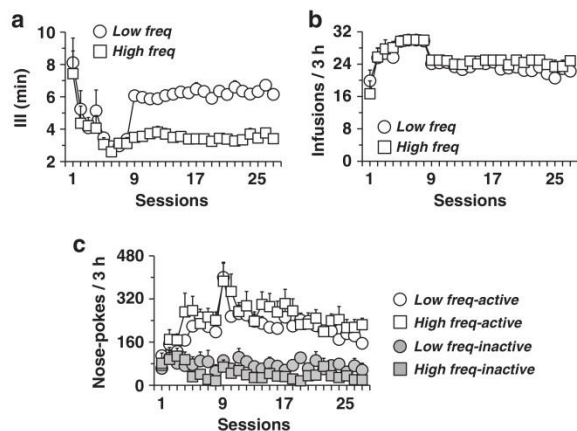


Figure 2 Cocaine self-administration in *High* (*High freq*) and *Low* frequency (*Low freq*) rats. The 8 acquisition sessions and 19 sessions of the distinct time-out (TO) procedure are shown. Starting session 9, distinct TOs were introduced that produced high and low frequencies of intake. (a) Daily mean inter-infusion interval (III) differed significantly between *High* and *Low* frequency rats, starting session 9, (b) intake of cocaine, as measured by the number of infusions per session, as well as mean active and inactive nose-pokes per session (c), were similar in the two groups. Data are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ to 13 per group).

as the discrimination time courses were similar over the first 15 min, ie, until discrimination was lost (Figure 3a). At the end of the 90-min extinction period, before non-contingent cocaine infusions, the two groups showed similar low levels of responding in both active and inactive holes.

Notably, in Experiment 2, *High* and *Low* frequency rats did not differ in extinction and the number of nose-pokes was lower than that in Experiment 1 (data not shown). We hypothesize that dummy connection of optical fibers was responsible for this decrease in operant responses, when cocaine was not available. Indeed decrease in responses (and self-infusions) was not observed when rats were head-connected during a regular self-administration session (tested between sessions 16 and 19 for habituation, data not shown). Importantly, however, the time course of extinction was similar in the two groups and at the end of the 50 min of the extinction period, before non-contingent cocaine infusions, the two groups showed similar low levels of responding in both active and inactive holes.

Reinstatement. On session 24, in both experiments, non-contingent cocaine infusions produced reinstatement of extinguished instrumental responses, inducing a specific and dose-dependent increase of active responses (Figure 3c–Experiment 1—Figure 3d–Experiment 2). In both cases also, *High* frequency rats responded more than *Low* frequency rats, specifically in the active hole (Group $\times$ Hole, $F_{(1,23)} = 6.52$, $p < 0.05$; $F_{(1,22)} = 1.69$, $p < 0.05$, respectively). A time course of responses over the 120 min following the first non-contingent cocaine infusion is displayed in Figure 3b (Experiment 1).

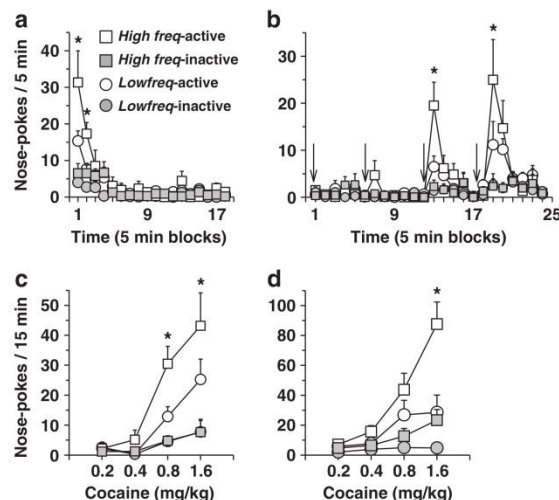


Figure 3 Reinstatement of cocaine self-administration behavior in *High* (*High freq*) and *Low* frequency rats (*Low freq*). The session lasted 210 min (90 min extinction + 120 min of cocaine-induced reinstatement). (a–c) Experiment 1. (a) Time course of active and inactive nose-pokes during the 90 min period of extinction. Active nose-pokes were higher in the *High* frequency rats, over the first 10 min. Behavior was fully extinguished in both groups when the first cocaine dose was infused. (b) Time course of active nose-pokes following four non-contingent infusions (one every 30 min) of increasing doses of cocaine (time of infusions is indicated by a black arrow). Cocaine induced a dose-dependent increase of active response, an effect that was higher in *High* frequency rats. (c) Dose-response of reinstatement. Total active and inactive responses over the first 15 min following each cocaine infusion are represented ($n = 12$ to 13 per group). * $p < 0.05$ as compared with *Low* freq rats. (d) Experiment 2: total active and inactive responses over the first fifteen minutes following each cocaine infusion are represented. Rats had been administered with virus and optical fibers into the PL before self-administration training. As for Experiment 1, *High* frequency rats showed higher cocaine-induced reinstatement than *Low* frequency rats ($n = 17$ *High* freq (EYFP & ArchT) and $n = 11$ *Low* freq (ChR2)). * $p < 0.05$ as compared with *Low* freq rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Cocaine Self-Administration Induces Distinct c-Fos Expression Profiles in *High* vs *Low* frequency Rats

Last self-administration session before sacrifice. In Experiment 1, twelve representative rats (six *High* and six *Low* frequency) were tested in a last self-administration session that ended after eight self-administered infusions or if 90 min had elapsed (mean III: 3.68 ± 0.32 and 6.72 ± 0.18 , respectively, over the 19 self-administration sessions of the specific TO procedure—Group effect, $F_{(1,10)} = 66.41$, $p < 0.001$). All rats completed the eight infusions within the allocated time; the longest session lasted 80 min. Each rat was killed 80 min after completion of its last infusion.

During this last session, the difference in III was maintained, though slightly amplified (Group effect, $F_{(1,10)} = 16.47$, $p < 0.005$; low: 8.66 ± 0.76 , high: 3.92 ± 0.88). Accordingly, the mean duration of the session was significantly different between the two groups (Group effect, $F_{(1,10)} = 14.11$, $p < 0.01$; low: 59.33 ± 10 ; high: 29.16 ± 7.55). The self-administration behavior and

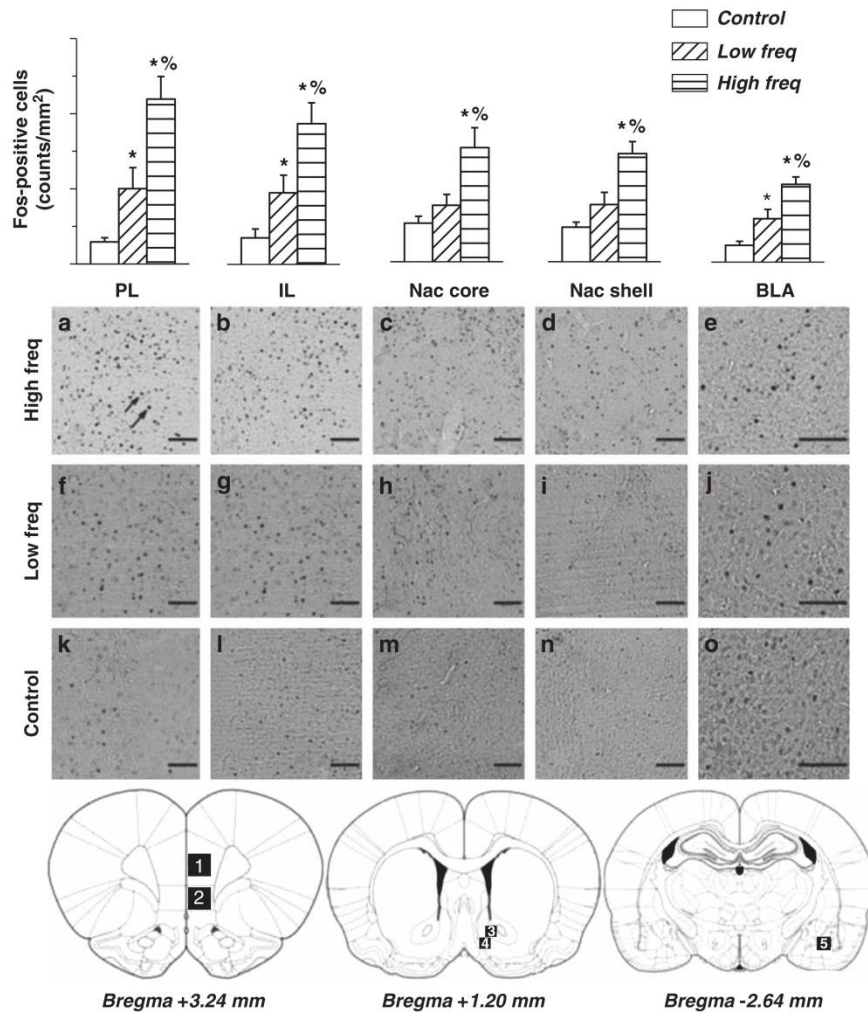


Figure 4 In the upper part, mean number of c-Fos-positive cells/mm² in PL, IL, NAc Core, NAc Shell, and BLA in *High* (*High freq*) and *Low frequency* (*Low freq*) rats. The three groups significantly differed for c-Fos expression in the five structures of interest. In the prelimbic cortex (PL), infralimbic cortex (IL) and basolateral amygdala (BLA), cocaine self-administration increased c-Fos expression, but *High frequency* rats showed higher c-Fos expression than *Low frequency* rats. In the nucleus accumbens core (NAc core) and nucleus accumbens shell (NAc shell), *High frequency* was specifically associated with increased c-Fos expression, as *Low frequency* rats did not differ from *Control* rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 4-6$ per group). *: significant as compared with *Control*, %: significant as compared with *Low frequency* rats. In the medium part, representative pictures of c-Fos staining in the five structures of interest for the three experimental groups (a-e: *High frequency*, f-j: *Low frequency*, and k-o: *Control*). In the bottom part, pictures are schematic representations of coronal sections of the rat brain taken at 3.24, 1.20, and -2.64 mm from the bregma (Paxinos and Watson, 2005). Numbers in the sections represent the regions analyzed for c-Fos: (1) PL; (2) IL; (3) NAc core; (4) NAc shell; (5) BLA. All images were taken at $\times 10$ magnification. Scale bar is equal to 100 μ m. Visible c-Fos protein expression was manifested as dark ovals (highlighted by arrows).

cocaine-induced reinstatement of these two representative groups are portrayed in Supplementary Figure S4.

Quantitative differences in c-Fos expression levels between Low and High frequency rats. The three groups (*High frequency*, *Low frequency*, and cocaine-naïve animals) significantly differed in c-Fos expression in the five structures of interest (Figure 4) (Group effect, $F_{(2,13)} = 16.73$, $p < 0.0005$).

C-Fos expression was higher in the NAc core and NAc shell of the *High frequency* group. Cocaine-naïve (*control*) and *Low frequency* rats were similar and significantly lower than the *High frequency*. For the other three structures (PL, IL, BLA), both *High frequency* and *Low frequency* rats showed increased c-Fos expression as compared with cocaine-naïve rats, although *High frequency* rats still produced more c-Fos expression as compared with *Low frequency* rats.

Higher c-Fos expression in *High* compared with *Low frequency* rats is unlikely to be a general nonspecific effect

due to a behavioral or a biochemical/metabolic bias. First, locomotor activity, expressed during this last session, did not correlate with c-Fos expression (Supplementary Table S1, Supplementary Information). Second, among other structures investigated, two could be identified in which c-Fos expression was similarly activated in *Low* and *High frequency* rats, ie, cingular cortex area 2 (CG2) and hippocampal *cornu ammonis* 2 (CA2) (Supplementary Information and Supplementary Figure S5). Third, brains were sampled 80 min after the last of the eight cocaine self-infusions in all rats. c-Fos expression reflects strong neuronal activity about 1 h before sacrifice. At this time, corresponding to 20 min after the last infusion, considering the dynamics of self-infusions and estimated elimination of cocaine from the brain, the calculated cocaine brain levels were similarly low in the two groups (see Figure 8C and F).

Qualitative differences in c-Fos expression between Low and High frequency rats (Experiment 1)

Cluster analysis. The two groups showed different hierarchical organization between the five structures of interest. In the *Low frequency* rats, cortical structures (IL and PL) and subcortical structures (NAc core, NAc shell, and BLA) clustered separately and distantly (Figure 5a-left). NAc core and shell showed the smallest Euclidean distance. In the *High frequency* rats, this cortical/subcortical hierarchy was not observed; instead, PL and NAc core clustered closely together (Figure 5b-left).

Correlations. Significant correlations of c-Fos expression were observed between the five structures. However, different structures were involved depending on the experimental group. Notably, expression in PL and NAc

core correlated positively in high ($R=0.91$; $p<0.05$), but not low frequency rats. In contrast, expression in BLA and NAc core correlated positively in the low ($R=0.83$; $p<0.05$), but not high frequency rats (Figure 5a and b-right).

Optogenetic Inhibition of PL Neuronal Activity in High Frequency Rats Decreases Cocaine-Induced Reinstatement; Optogenetic Activation of PL Neuronal Activity in Low frequency Rats has no Effect (Experiment 2)

In session 27, as in session 24, rats from Experiment 2 were tested for cocaine-induced reinstatement but under PL optical stimulation.

In session 24 (Figure 6a), *EYFP*, *ArchT* and *ChR2* rats differed for cocaine-induced reinstatement (Group $\times$ Hole $\times$ Dose, $F_{(6,63)}=2.48$, $p<0.05$). Specifically, *EYFP* and *ArchT* (*High frequency*) rats did not differ, but showed a higher reinstatement than *ChR2* (*Low frequency*) rats ($p<0.05$ for both).

In session 27, the three groups still differed for cocaine-induced reinstatement (Group effect, $F_{(2,21)}=3.24$, $p<0.05$). However, *ArchT* (*High frequency*) and *ChR2* (*Low frequency*) rats showed a similar reinstatement that was significantly lower than reinstatement by *EYFP* rats (*High frequency*) ($p<0.05$ for both) (Figure 6b). Reinstatement was similar in session 24 and session 27 in *EYFP* rats as well as in *ChR2* rats. Remarkably, there was a decrease of reinstatement in *ArchT* rats (Stimulation $\times$ Dose $\times$ Hole, $F_{(3,54)}=2.92$, $p<0.05$). Thus, PL inactivation in *High frequency* rats decreased cocaine-induced reinstatement, while PL activation in *Low frequency* rats had no effect.

Optical stimulation did not alter responding during the first 50 min of the session, ie, during extinction, which

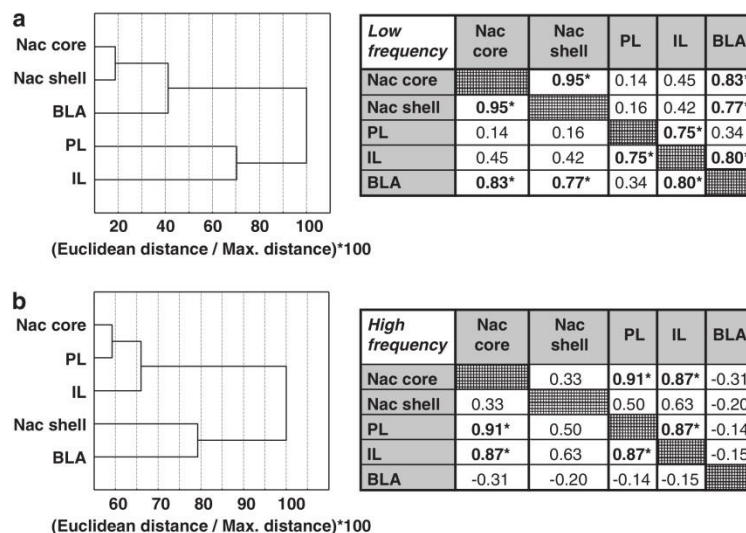


Figure 5 Cluster analysis of the hierarchical organization between the five structures of interest in the *Low* and *High frequency* rats. (a) In *Low frequency* rats, cortical structures (IL and PL) and subcortical structures (NAc core, NAc shell and BLA) clustered separately and distantly. NAc core and shell showed the smallest Euclidean distance. (b) In *High frequency* rats the cortical/subcortical hierarchy evidenced in *Low frequency* rats was not observed, ie, PL and NAc core clustered close together. Correlations of c-Fos expression between structures in *Low* (Top table) and *High frequency* rats (Bottom table), respectively. Different profiles of significant correlations were observed; a strong positive correlation between PL and NAc core in the *High frequency* group, a strong positive correlation between BLA and NAc core in the *Low frequency* group ($n=6$ per group).

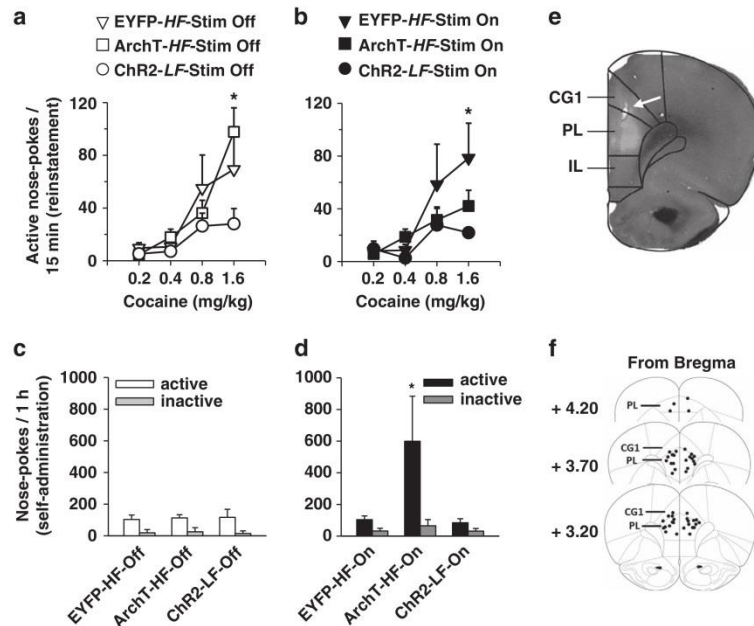


Figure 6 Effect of optical manipulation of the PL on cocaine-induced reinstatement (a, b) and cocaine self-administration (c, d). (a, b) Cocaine-induced reinstatement in EYFP, ChR2 and ArchT rats. (a) Reinstatement of extinguished behavior measured by active nose-pokes in response to non-contingent infusions of increasing doses of cocaine in absence of optical stimulation (control condition: Stim Off). EYFP and ArchT (both High frequency (HF)) showed a comparable reinstatement that was higher as compared with ChR2 rats (Low frequency (LF)). $*p < 0.05$ ArchT and EYFP as compared with ChR2. (b) Same as in panel a but during optical stimulation (Stim On). Inactivation of the PL in ArchT rats significantly decreased reinstatement while its activation in ChR2 rats was without effect. Optical stimulation did not alter the behavior of the EYFP rats. $*p < 0.05$ EYFP as compared with ArchT and ChR2. (c, d) Cocaine self-administration (60 min session) in High frequency (HF) (ArchT and EYFP) and Low frequency (LF) (ChR2) rats. (c) The three groups did not differ for cocaine self-administration as measured by the total number of active nose-pokes (compared with inactive nose-pokes) over 60 min in the absence of optical stimulation (Stim Off). (d) Same as in panel c but with optical stimulation being used (Stim On). PL inactivation in High frequency rats (ArchT-HF-On) increased cocaine self-administration, while PL activation in Low frequency rats (ChR2-LF-On) had no effect. Optical stimulation did not alter behavior in the EYFP rats. $*p < 0.05$ ArchT as compared with EYFP and ChR2. (e, f) Example of EYFP expression labeling and localization of optic fiber implantation in all tested rats. (e) EYFP was largely expressed in the PL. (f) Specificity of PL inactivation or activation relied on optical fiber localization. Each dot represents the tip of a fiber. CG1, cingulate cortex area 1; IL, infralimbic cortex; PL, prelimbic cortex.

precedes non-contingent cocaine infusions. In both session 24 (stim Off) and 27 (stim On), self-administration behavior extinguished over the 50 min (Hole $\times$ Time, $F_{(9,189)} = 2.10$, $p < 0.05$; Hole $\times$ Time, $F_{(9,189)} = 2.55$, $p < 0.01$, respectively) and the three experimental groups did not differ.

Optogenetic Inhibition of PL Neuronal Activity in High Frequency Rats Increased Cocaine Seeking in a Basal Self-Administration Session; Optogenetic Activation of PL Neuronal Activity in Low frequency Rats had no Effect (Experiment 2)

When optical stimulation was off, ie, in basal conditions, the three groups did not differ in total nose-pokes or discrimination (Figure 6c). Optical stimulation altered discrimination as a function of the group (Hole $\times$ Stim $\times$ Group, $F_{(2,22)} = 2.86$, $p < 0.05$). Stimulation specifically increased active responses in the ArchT group without affecting responses in the other two groups (Figure 6d). Stimulation did not impact the total number of infusions received during the test or the mean III (Supplementary Figure S6), suggesting that the increase in active nose-pokes in ArchT rats was attributable mainly to responses during TO periods. Importantly, this increase was associated with an

alteration in the time course of active responses (Stim $\times$ Time, $F_{(59,590)} = 2.28$, $p < 0.0001$): stimulation did not produce an immediate increase in active nose-pokes, rather it was progressive and reached significance after 14 min (NK post hoc, $p < 0.05$) (Figure 7b). The time course of infusions was not changed (Figure 7d). In comparison, optical stimulation did not alter time course of active nose-pokes (Figure 7a) or time course of infusions in ChR2 rats (Low frequency) (Figure 7c). As expected, in both ON and OFF stimulation conditions, over 60 min of self-administration, High frequency rats reached higher level of infusions than Low frequency rats (Figure 7c and d, Supplementary Figure S6A). Also, as expected, ChR2 rats (Low frequency) showed a lower III than both EYFP and ArchT rats (High frequency) (Supplementary Figure S6B).

Impact of High vs Low Frequency Self-Administration on Calculated Whole-Brain Cocaine Concentrations on the 7th, 23rd and Last Sessions (Experiment 1)

Cocaine concentration in the brain was calculated in 10 s intervals during the 7th self-administration session, ie, before the different TO conditions were applied, and is shown for two representative rats (rats 1 and 2), in Figure 8a

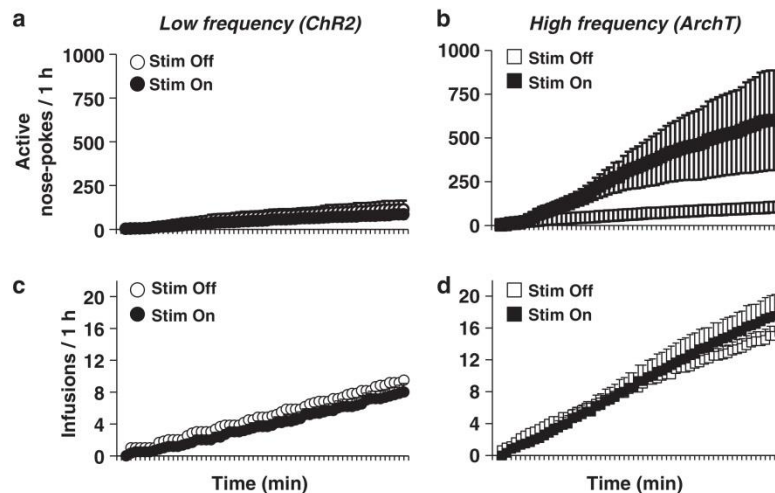


Figure 7 Time course of cocaine seeking (a, b) and taking (c, d) during PL optogenetic manipulation in *Low* (*ChR2*) (a–c) and *High* frequency rats (*ArchT*) (b–d). Cocaine seeking and taking are expressed by the cumulative active nose-pokes and the cumulative infusions over time (per min), respectively. (a) PL activation in *Low* frequency rats (*ChR2*) did not alter active nose-poking (Stim On as compared to Stim Off). (b) PL inactivation (*ArchT*) in *High* frequency rats increased active nose-pokes in a time-dependent manner (Stim On as compared to Stim Off) with a significant difference occurring after 14 min. (c, d) Time course of self-administration was altered by optical stimulation neither in *Low* nor *High* frequency rats. Over 60 min of self-administration, *High* frequency rats self-administered more infusions than *Low* frequency rats, as expected.

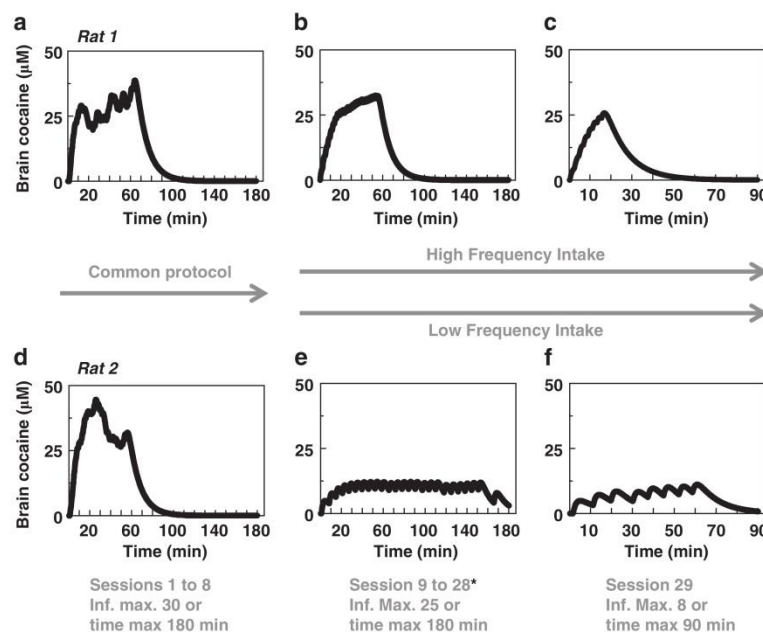


Figure 8 Calculated brain cocaine concentrations in two representative rats of the *High* and *Low* frequency groups. Whole-brain levels of cocaine were mathematically evaluated every 10 s and are represented over session 7 (a–d), session 23 (b–e), and over the last session (c–f) for one *High* frequency rat (rat 1, upper line) and one *Low* frequency rat (rat 2, lower line). Session 7 was the penultimate session of acquisition with the 40-s time-out (TO) condition for all rats. Cocaine infusions were limited to 30. Session 23 was the 15th session of the TO-specific procedure promoting *High* and *Low* frequency self-administration; cocaine infusions were limited to 25. In both cases, the session ended after 180 min or when the maximal number of infusions allowed was reached. The last session (session 29) was the one immediately preceding sacrifice for brain sampling. Cocaine infusions were limited to eight, and session length was limited to 90 min. For each rat, sacrifice was performed 80 min after the end of its session. Rats 1 and 2 showed a comparable time course of brain cocaine concentrations in session 7. In session 23 and in the last session, they showed very distinct time courses of cocaine brain concentrations.

and d. In this session, rats were allowed to self-administer 30 infusions over 180 min maximum. Considering their intake, both groups would reach within 10–15 min comparable brain concentrations of cocaine that would stabilize over 60 min to 30–40 μ M. Starting session 9, rats were submitted to TO conditions, which led to high and low frequency self-administration, respectively. Here, rats were allowed to self-administer a maximum of 25 infusions over a maximum of 180 min. Session 23rd (Figure 8b and e) is the 15th session of this new condition. Rat 1 would have reached 30 μ M of cocaine within 15 min and maintained it, over 45 min. Rat 2 would have reached as rapidly a maximum of 10 μ M, maintained, over almost 180 min. The same general profile was calculated based on intake during the last session before sacrifice (Figure 8c and f). In this case, infusions were limited to 8 and the session to 90 min.

Detailed results and statistics are provided in Supplementary Information.

DISCUSSION

These results demonstrate that manipulating the frequency of cocaine use can influence reinstatement of cocaine seeking. Our data indicate that cocaine seeking is controlled by the PL for high, but not low, frequency use. In addition, the PL can either positively or negatively control cocaine seeking, depending on the contingencies regulating the instrumental responses.

PL Neuronal Activity Promotes Cocaine-Induced Reinstatement in Rats, which Self-Administered Cocaine at High Frequency

After acquisition of cocaine self-administration, we used behavioral procedures that promoted higher or lower frequency self-administration. Rats were then tested for reinstatement of self-administration behavior induced by non-contingent infusions of cocaine. Higher frequency cocaine self-administration was associated with higher cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking. It is unlikely that the differences observed in cocaine-induced reinstatement between *High* and *Low frequency* rats are due to behavioral biases because the number of active nose-pokes was similar between the two groups.

On the basis of pharmacological (Capriles *et al*, 2003), lesion (Pelloux *et al*, 2013), and optogenetic (Stefanik *et al*, 2013) studies, we hypothesized that higher cocaine seeking in *High frequency* rats could rely on increased neuronal activity in the PL. Accordingly, optical inactivation of the PL in *High frequency* rats decreased cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking to the level of *Low frequency* rats.

Importantly, distinct factors are known to promote relapse to cocaine seeking. They are modeled through cue-/context-, stress- and drug-induced reinstatement in rodents (Epstein *et al*, 2006). The neurobiological circuits supporting reinstatement differ substantially according to the triggering stimulus (Buffalari and See, 2010; Kalivas and McFarland, 2003). Our results apply to cocaine-induced reinstatement. Whether frequency of use also alters other forms of reinstatement is unknown.

High Frequency Cocaine Self-Administration Promotes Correlated c-Fos Activity in PL and NAc Core; Low Frequency Cocaine Self-Administration Promotes Correlated c-Fos Activity in BLA and NAc Core

Using c-Fos expression as a marker of neuronal activity, we investigated how frequency of cocaine self-administration altered neuronal activation in the PL and associated structures (IL, BLA, NAc core and NAc shell), forming a key network involved in cocaine-induced reinstatement (Peters *et al*, 2008). Cocaine-induced c-Fos expression was evaluated 80 min after *High* and *Low frequency* rats had self-administered eight cocaine infusions. c-Fos expression was higher in *High frequency* rats in both the PL and the four related structures. Not only were the structures of interest more intensely recruited by cocaine in *High frequency* rats, but they were also recruited differently. The cluster analysis, evaluating distance in the intensity of c-Fos expression between the brain structures, revealed a cortical/subcortical cleavage in the *Low frequency* rats, as shown by a lower distance within cortical, and within subcortical areas, as opposed to between them. A distinct functional recruitment of the circuit in the two groups was also supported by correlation analyses. Notably, in response to cocaine self-administration, strong positive correlations were observed between the BLA, the NAc shell, and the NAc core in the *Low frequency* rats, but not in the *High frequency* rats. These later showed a specific strong positive correlation between the medial prefrontal cortex, particularly the PL, and the NAc core.

Both BLA and PL projections to the NAc core might control cocaine seeking (Di Ciano and Everitt, 2004; McFarland and Kalivas, 2001; McFarland *et al*, 2003). However, it is likely that the underlying mechanisms could be different. Functional connectivity between the BLA and NAc core is known to be implicated in processing information about emotional or motivational significance and in mediating Pavlovian and instrumental incentive processes (Shiflett and Balleine, 2010). In contrast, connectivity between the PL and NAc core could contribute to reward-associated action selection (Mannella *et al*, 2013) by integrating learned contingencies that mediate instrumental performance and ultimately behavioral control.

Depending on the frequency of self-administration, cocaine might promote activation of one pathway over the other. It is unknown whether the observed c-Fos differences result from acute or repeated (during the 19 preceding sessions) cocaine self-administration at *High* vs *Low frequency*. Nevertheless, the observed differential recruitment of the circuit is likely to influence expression and control of cocaine seeking and supports the view that the PL has a more predominant role in controlling cocaine seeking in *High frequency* rats than in *Low frequency* rats. Further studies will be required to investigate the role of the BLA in cocaine seeking in *High* and *Low frequency* rats.

It has to be noted that the control rats used might be a limitation, as they were not exposed to the same extensive operant training and responding as rats trained for cocaine self-administration.

PL Neuronal Activity Inhibits Cocaine Self-Administration

In *High frequency* rats, the same inactivation that decreased cocaine-induced reinstatement produced a strong increase

in cocaine self-administration. Importantly, the increased seeking in response to PL optical inactivation only occurred after a few cocaine self-infusions and was mainly during the time-out periods. This suggests that the PL is recruited after a given load of cocaine to engage control on non-adapted operant responses. In the case of optical manipulation (ie, PL inactivation), this recruitment would not occur and control would be lost.

Whether this inhibitory control exerted by the PL on self-administration results from previous repeated exposure to *High frequency* cocaine is questionable. Indeed, it cannot be ruled out that it is an acute involvement of the PL due to *High frequency* access to cocaine that would not occur in *Low frequency* access, for example. In other words, the influence exerted by the PL in *High frequency* rats on self-administration could be different from the one exerted during reinstatement.

However, although paradoxical, the opposite effect of PL inactivation on reinstatement and self-administration fits with a role of the PL in coordinating the acquired contingencies that mediate operant responses. Inactivation of the PL would compromise retrieval of the operant response after extinction (ie, decrease reinstatement), but would also dysregulate reinforced instrumental responses (ie, increase self-administration), compromising control of acquired contingencies such as time-out, FR, and so on. Accordingly, this dysregulation in operant responding produced by PL inactivation is also observed for responses reinforced by natural reinforcers. Jonkman *et al.* (2009) investigated the involvement of the PL in acquisition of instrumental responding for a food reinforcer, under fixed interval schedules. Inactivation of the PL by post-session infusion of a protein synthesis inhibitor did not affect any measure of acquisition, but strongly increased established responding, leading the authors to conclude that the PL might mediate a form of inhibitory response control.

Recently, this paradoxical opposite effect of PL inactivation was also observed for alcohol. Pharmacological inactivation of the PL increased, or reduced, nose-poking for alcohol, depending on whether behavior was reinforced by the drug or not (Willcocks and McNally, 2013).

The ability of the PL to exert inhibitory control on cocaine seeking is also supported by the recent work by Chen *et al.* (2013). Cocaine seeking was suppressed by foot-shock in some rats. Optical inactivation of the PL abolished this foot-shock-induced decrease in cocaine seeking, an effect that was not observed by Pelloux *et al.* (2013) after PL lesions. Considering that PL controls learned instrumental responses but not their acquisition (Jonkman *et al.*, 2009), a main procedural difference could explain this discrepancy. Both studies used a seeking-taking chain procedure, with the seeking response being randomly punished by an electric foot-shock. In Chen *et al.* (2013), the taking lever and cocaine remained accessible. Suppression of seeking responding by shock would rely on a conflicting situation between punishment and cocaine reinforcement. Alternatively, in Pelloux *et al.* (2013), suppression of responding by shock would rely on new learning. Indeed the seeking response is not only punished by a shock but also extinguished because it is not reinforced anymore by the occurrence of the taking lever.

Although optical inactivation of the PL abolished a foot-shock-induced decrease in cocaine seeking, Chen *et al.* (2013) also showed that it did not alter basal cocaine self-administration behavior, a discrepancy with our study. However, in Chen *et al.* (2013), optical stimulation is only applied during presentation of the seeking lever. Thus, the PL can be activated when cocaine is delivered, allowing its recruitment to control operant responding. Alternatively, this discrepancy could result from a ceiling effect compromising the expression of increased seeking. Indeed, in Chen *et al.* (2013), control rats already self-administered the maximal number of infusions with a very short inter-press interval (around 35 s).

PL Neuronal Activity does not Control Cocaine Seeking in *Low frequency* Rats

While PL inactivation can promote dysregulated cocaine seeking (present study, Chen *et al.*, 2013), PL activation can produce the opposite effect, ie, inhibit responses in rats maintaining drug-seeking responses despite electric foot-shocks (Chen *et al.*, 2013). This dual effect reveals that control of behavior by the PL can be modulated bidirectionally. It also links regulated/deregulated responding with hypoactivity/hyperactivity in the PL, respectively. In the present study, optical activation of the PL in *Low frequency* rats did not alter cocaine-induced reinstatement or cocaine self-administration. This suggests that the PL was not recruited to control cocaine seeking in *Low frequency* rats.

It was beyond our experimental hypothesis to apply optical inhibition of the PL in *Low frequency* rats. Therefore, we cannot rule out that such inhibition could affect either self-administration or reinstatement. As well we cannot foresee the behavioral consequences of PL activation in *High frequency* rats.

High and Low frequency Rats: Distinct Pharmacological Profiles

Calculation of brain cocaine levels supports that differences in frequency of use imply differences in both cocaine dynamics (time to peak) and cocaine peak level. *High frequency* self-administration achieves faster, higher and shorter lasting brain cocaine levels. In the present self-administration conditions, *High frequency* rats reached a theoretical maximal brain concentration of cocaine that is approximately three times higher than the one reached by *Low frequency* rats. Cocaine concentration reached 10 μ M in 20 min in the *Low frequency* rats, as compared with fewer than 10 min in *High frequency* rats. Finally, as the maximal number of self-infusions is limited, cocaine would be present in the brain three times longer in *Low frequency* rats than in *High frequency* rats.

Whether the behavioral differences between *High* and *Low frequency* rats rely on differences in cocaine dynamics, peak brain level, or an interaction of both, cannot be disentangled based on the present procedure. Nevertheless, several observations support the view that peak level and temporal dynamic interact to recruit specific circuits involved in promoting/inhibiting cocaine seeking.

Indeed, differences in peak levels reached could explain the higher c-Fos activation shown by *High frequency* rats in the five structures of interest. However, qualitative differences in c-Fos activation between these structures, together with similar c-Fos activation in *High* and *Low frequency* rats for other brain structures (ie, CG2 and CA2—see Supplementary Information), suggest that the dynamics of cocaine delivery also have a role in the observed biological and behavioral effects.

Critically, modulating dynamics alters cocaine-induced reinstatement only if cocaine intake is high. Shortening the time to peak cocaine brain levels (through narrow manipulation of the rate of infusion from 5 to 90 s), without altering the peak level achieved, provokes sensitization of the psychomotor and reinforcing effects of psychostimulants and produces specific and relevant neurobiological adaptations (Ferrario et al, 2008; Liu et al, 2005a, 2005b; Samaha and Robinson, 2005; Samaha et al, 2002, 2004). However, it is associated with increased cocaine-induced reinstatement only in rats that have had long (6 h), but not short (1 h), daily access to the drug (Crombag et al, 2008; Wakabayashi et al, 2010). In addition, fast delivery rate is necessary to observe high frequency use (escalation) in the 6-h rats (Wakabayashi et al, 2010), supporting that the two factors, ie, high reinstatement and high frequency use, are related. Finally, protocols leading to repeated transiently high plasma levels of cocaine increase motivation for cocaine, supporting that frequency of cocaine use can impact its psychopharmacological consequences (Zimmer et al, 2012).

CONCLUSIONS

In a multi-symptomatic model of cocaine addiction in the rat (Deroche-Gammonet and Piazza, 2014; Deroche-Gammonet et al, 2004), we observed both *High frequency* self-administration and high cocaine-induced reinstatement in about 20% of addiction-vulnerable rats. These features are present both after early and late cocaine training (Belin et al, 2009). However, after late training, these rats also express addiction-like behaviors, ie, dysregulated cocaine seeking. They seek drug, although it is signaled as unavailable. They also seek and take cocaine despite punishment by electric foot-shocks. Their early behavioral profile is compatible with an involvement of the PL in controlling cocaine seeking, while their late profile is not, at least in terms of PL functionality after early training. How a greater role of PL in controlling responses for cocaine after early training might lead to cocaine addiction behavior is unknown and remains to be investigated. However, altogether our data suggest that high frequency use could be a risk factor for increased cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking and addiction, and the PL is a target of interest in regulating vs dysregulating operant responses for cocaine.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was supported by INSERM, Université of Bordeaux Segalen and Région Aquitaine, by ANR-2010-BLAN-1442-01, ANR-10-EQX-008-1 and LABEX BRAIN ANR-10-LABX-43 grants to CH and VDG. EMG was supported by a 'Sara Borrell' post-doctoral fellowship (CD07/00244) from the Spanish 'Instituto de Salud Carlos

III'. JC was supported by an AXA doctoral fellowship. The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center of the University of Bordeaux Segalen. The help of Sébastien Marais is acknowledged. We thank Dr R. Rozeske and Robyn St Laurent for precious help with editing. We thank Dr D Belin for discussion of an early version of the manuscript.

REFERENCES

- Ball KT, Slane M (2012). Differential involvement of prefrontal and infralimbic medial prefrontal cortex in discrete cue-induced reinstatement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) seeking in rats. *Psychopharmacology* 224: 377–385.
- Belin D, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gammonet V (2009). Pattern of intake and drug craving predict the development of cocaine addiction-like behavior in rats. *Biol Psychiatry* 65: 863–868.
- Bossert JM, Marchant NJ, Calu DJ, Shaham Y (2013). The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology* 229: 453–476.
- Buffalari DM, See RE (2010). Amygdala mechanisms of Pavlovian psychostimulant conditioning and relapse. *Curr Top Behav Neurosci* 3: 73–99.
- Capriles N, Rodaros D, Sorge RE, Stewart J (2003). A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 168: 66–74.
- Chen BT, Yau H-J, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW et al (2013). Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature* 496: 359–362.
- Di Ciano P, Everitt BJ (2004). Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. *J Neurosci* 24: 7167–7173.
- Crombag HS, Ferrario CR, Robinson TE (2008). The rate of intravenous cocaine or amphetamine delivery does not influence drug-taking and drug-seeking behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 797–804.
- Dackis CA, O'Brien CP (2001). Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J Subst Abuse Treat* 21: 111–117.
- Deroche-Gammonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305: 1014–1017.
- Deroche-Gammonet V, Piazza PV (2014). Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. *Neuropharmacology* 76(Pt B): 437–449.
- Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y (2006). Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology* 189: 1–16.
- Ferrario CR, Shou M, Samaha AN, Watson CJ, Kennedy RT, Robinson TE (2008). The rate of intravenous cocaine administration alters c-fos mRNA expression and the temporal dynamics of dopamine, but not glutamate, overflow in the striatum. *Brain Res* 1209: 151–156.
- Gawin FH (1991). Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 251: 1580–1586.
- Gawin FH, Khalsa-Denison ME (1996). Is craving mood-driven or self-propelled? Sensitization and 'street' stimulant addiction. *NIDA Res Monogr* 163: 224–250.
- Gawin FH, Kleber HD (1988). Evolving conceptualizations of cocaine dependence. *Yale J Biol Med* 61: 123–136.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* 12: 652–669.

- Herry C, Mons N (2004). Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 20: 781–790.
- Jaffe JH, Cascella NG, Kumor KM, Sherer MA (1989). Cocaine-induced cocaine craving. *Psychopharmacology* 97: 59–64.
- Jonkman S, Mar AC, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ (2009). The rat prelimbic cortex mediates inhibitory response control but not the consolidation of instrumental learning. *Behav Neurosci* 123: 875–885.
- Kalivas PW, McFarland K (2003). Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology* 168: 44–56.
- LaLumiere RT, Smith KC, Kalivas PW (2012). Neural circuit competition in cocaine-seeking: roles of the infralimbic cortex and nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci* 35: 614–622.
- Liu Y, Roberts DCS, Morgan D (2005a). Sensitization of the reinforcing effects of self-administered cocaine in rats: effects of dose and intravenous injection speed. *Eur J Neurosci* 22: 195–200.
- Liu Y, Roberts DCS, Morgan D (2005b). Effects of extended-access self-administration and deprivation on breakpoints maintained by cocaine in rats. *Psychopharmacology* 179: 644–651.
- Mannella F, Gurney K, Baldassarre G (2013). The nucleus accumbens as a nexus between values and goals in goal-directed behavior: a review and a new hypothesis. *Front Behav Neurosci* 7: 135.
- McFarland K, Kalivas PW (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 21: 8655–8663.
- McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW (2003). Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 23: 3531–3537.
- McLaughlin J, See RE (2003). Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* 168: 57–65.
- Mihindou C, Guillem K, Navailles S, Vouillac C, Ahmed SH (2013). Discriminative inhibitory control of cocaine seeking involves the prelimbic prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 73: 271–279.
- Paxinos G, Watson C (2005). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. 5th edn, Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands.
- Pelloux Y, Murray JE, Everitt BJ (2013). Differential roles of the prefrontal cortical subregions and basolateral amygdala in compulsive cocaine seeking and relapse after voluntary abstinence in rats. *Eur J Neurosci* 38: 3018–3026.
- Peters J, LaLumiere RT, Kalivas PW (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *J Neurosci* 28: 6046–6053.
- Samaha A-N, Li Y, Robinson TE (2002). The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization. *J Neurosci* 22: 3244–3250.
- Samaha A-N, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE (2004). The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. *J Neurosci* 24: 6362–6370.
- Samaha A-N, Robinson TE (2005). Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci* 26: 82–87.
- Shiflett MW, Balleine BW (2010). At the limbic-motor interface: disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. *Eur J Neurosci* 32: 1735–1743.
- Stefanik MT, Moussawi K, Kupchik YM, Smith KC, Miller RL, Huff ML et al (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addict Biol* 18: 50–53.
- Vertes RP (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1–20.
- Wakabayashi KT, Weiss MJ, Pickup KN, Robinson TE (2010). Rats markedly escalate their intake and show a persistent susceptibility to reinstatement only when cocaine is injected rapidly. *J Neurosci* 30: 11346–11355.
- Willcocks AL, McNally GP (2013). The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. *Eur J Neurosci* 37: 259–268.
- Zimmer BA, Dobrin CV, Roberts DCS (2011). Brain-cocaine concentrations determine the dose self-administered by rats on a novel behaviorally dependent dosing schedule. *Neuropsychopharmacol* 36: 2741–2749.
- Zimmer BA, Oleson EB, Roberts DC (2012). The motivation to self-administer is increased after a history of spiking brain levels of cocaine. *Neuropsychopharmacol* 37: 1901–1910.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Supplemental information

Supplemental methods and materials

Animals

In the animal house, temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($60 \pm 5\%$) were controlled. Animals were habituated to environmental conditions and experimental handling, for 15 days before surgery. Animal procedures were conducted in strict accordance with the guidelines of the European Union Directive 2010/63/EU regulating animal research and were approved by the committee on Animal Health and Care of Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and French Ministry of Agriculture and Forestry (authorization B33 12 055).

Surgeries

During surgeries (one in Experiment 1, 2 in Experiment 2, 2 in the control experiment), rats were placed on a heat pad (30°C), and immediately after surgery, they were placed in a post-operative chamber (27°C) until wake up. In Experiment 1, they were implanted with an intravenous catheter as previously described (Belin *et al.*, 2009). In Experiment 2, they were injected in the Prelimbic Cortex (PL) with a solution of AVV expressing ChR2-EYFP, ArchT-EYFP or EYFP. Five days later they were implanted with an intravenous catheter in the jugular vein and with optic fibers in the PL bilaterally. In both cases, rats were anaesthetized with isoflurane (induction 3%, maintenance 1.5%) in oxygen. Rats were allowed to recover for 3 to 5 days after the last surgery before self-administration started. To prevent infection, rats received daily i.p. injections of a 0.05 ml gentamicine solution (11.4 mg/ml) for a period of 4-5 days following surgeries. Once self-administration started, catheters were flushed daily with a saline solution containing unfractionated heparin (30 IU/ml), after the session. For the Control experiment, coupling electrophysiology and optogenetic, for validation of optogenetic procedures, rats underwent two surgeries 20 days apart. On the first surgery, AAV expressing ChR2 ($n=2$) or ArchT ($n=2$) (approximately $0.4 \mu\text{l}$ per hemisphere) were bilaterally injected from glass pipettes (tip diameter 10-20 μm) connected to a picospritzer (Parker Hannifin Corporation) into the PL at the following coordinates: 3.2 mm anterior to bregma, 0.5 mm lateral of midline, 2.6 mm below cortical surface, according to a classical stereotaxic procedure based on the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005). On the second surgery, rats were implanted with bilateral electrodes and unilateral optic fiber in the PL (diameter: 200 μm ; numerical aperture: 0.37; flat tip, Doric Lenses). Electrodes and fiber ends were inserted at the virus injection site. Implants were fixed to the skull with Super-Bond dental cement (Sun Medical). In both cases, rats were anaesthetized with isoflurane (induction 3%, maintenance 1.5%) in oxygen.

Surgery for self-administering rats (Experiment 1)

A silastic catheter (internal diameter = 0.28 mm; external diameter = 0.61 mm; dead volume = $12 \mu\text{l}$) was implanted in the right jugular vein under ketamine (80 mg/kg) / xylazine (16 mg/kg) (Experiment 1), as previously described (Belin *et al.*, 2009).

Surgeries for brain optogenetic manipulations in self-administering rats (Experiment 2)

Rats underwent two surgeries 5 days apart. In both cases, rats were anaesthetized with isoflurane (induction 3%, maintenance 1.5%) in oxygen. Body temperature was maintained at 37° Celsius with a temperature controller system (FHC). On the first surgery, AAV expressing ChR2 (n=11), ArchT (n=15) or EYFP (controls, n=7) (approximately 0.4 µl per hemisphere) were bilaterally injected from glass pipettes (tip diameter 10-20 µm) connected to a picospritzer (Parker Hannifin Corporation) into the PL at the following coordinates: 3.2 mm anterior to bregma, 0.5 mm lateral of midline, 2.6 mm below cortical surface, according to a classical stereotaxic procedure based on the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005). On the second surgery, rats were implanted with an intravenous catheter in the jugular vein and bilateral optic fibers in the PL (diameter: 200 µm; numerical aperture: 0.37; flat tip, Doric Lenses). Fiber ends were inserted at the virus injection site. Implants were fixed to the skull with Super-Bond dental cement (Sun Medical).

Intravenous self-administration apparatus

Each self-administration chamber (40 cm long x 30 cm width x 52 cm high) was located within an opaque box equipped with exhaust fans that assured air renewal and masked background noise. Briefly, each rat was placed daily in an operant self-administration chamber where its chronically implanted intracardiac catheter was connected to a pump-driven syringe (infusion speed: 20 µl / sec). Two holes, located at opposite sides of the chamber at 5 cm from the grid floor, were used to record instrumental responding. A white cue light (1.8 cm in diameter) was located 9.5 cm above the active hole. A blue cue light (1.8 cm in diameter) was located on the opposite wall at 33 cm of the floor on the left side. Two parallel photocell beams located on each side of the chamber allowed recording horizontal motor (total non-successive beam breaks) and locomotor [total successive breaks of the two beams] activities. Experimental contingencies were controlled and data was collected with a PC-windows-compatible software (Imetronic, Pessac, France).

Cocaine-induced reinstatement

Extinction was limited to 50 min in experiment 2, based on results obtained in experiment 1 (behavior being fully extinguished). As our optogenetic equipment allows connecting/stimulating 10 rats in parallel, the 170 min reinstatement session (50 min extinction-120 reinstatement), allowed testing all rats within the dark phase with the first session starting at least 1h30 after the dark onset and the last session finishing at least 1h30 min before the dark offset.

c-Fos immunohistochemistry

Rats were anaesthetized by 2.5% isoflurane inhalation using oxygen as vehicle, and perfused transcardially with solution of 9 g / L NaCl, followed by 4% of paraformaldehyde in phosphate buffer (PB; pH = 7.4). Additional 4 drug-naïve rats, kept in the animal house and handled daily, were used as controls and sacrificed in the same conditions and time as the cocaine self-administering rats. The tissue for immunohistochemistry was processed as previously described (Herry and Mons, 2004). Briefly, after post-fixation overnight in the same fixative at 4 °C, coronal brain sections (50 µm) were cut on a vibratome (Leica) and collected in PB. Free-floating sections were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and pretreated with 0.3% H₂O₂ in PBS to reduce endogenous peroxidase activity. After four

were incubated in primary polyclonal rabbit anti-c-Fos antibody (Oncogene Research Products; 1:20000 dilution) in the blocking solution overnight at RT. Subsequently, sections were washed with PBS and incubated for 2h at RT with biotinylated goat antirabbit IgG (Jackson ImmunoResearch; 1 : 2000 in PBS) followed by 2h at RT in the avidin–biotin–peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Sections were rinsed in PBS and then PB. The peroxidase reaction end-product was visualized by incubating sections in 0.05 M Tris (pH 7.6) containing 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 0.037%) as chromogen and hydrogen peroxide (0.015%) for 15 min. Finally, immunolabelled sections were washed in PB, mounted on gelatin-coated slides, dehydrated and coverslipped.

Visualization and quantification of c-Fos expression

The stained sections of the brains were visualized at 10 X magnification objective using an epifluorescent microscope (Leica DM5000, Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled to a high sensitivity camera (CoolSnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA) driven by the MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Transmission acquisition mode was used to scan slides. Slide area was reconstructed with mosaic images produced with a motorized stage Scan (Märzhäuser, Wetzlar, Germany).

Using ImageJ software, the numbers of c-Fos-positive cells were quantified in the five structures of interest [coordinates according to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2005); “-” signifies posterior to bregma]: IL [3.24 mm], PL [3.24 mm], Nac core [1.20 mm], Nac shell [1.20 mm], BLA [-2.64 mm]. Circular particles were analyzed in transformed binary images using a region of interest (ROI). ROI was constant across samples for a given structure, but was of different size depending on the structure. Areas sampled are indicated by black squares in **figures 3 & S5**. The threshold was automatically determined by computing the slope of a Gaussian approximating the ROI image histogram. Cell counts were taken from both hemispheres in each brain region and expressed as mean number of c-Fos-positive cells per mm². For each region, the results of two successive slices were averaged. At all stages, the experimenter was blind to the experimental groups.

c-Fos quantification in additional brain structures.

Using ImageJ software, the numbers of c-Fos-positive cells were quantified in two additional structures [coordinates according to the rat brain atlas; “-” signifies posterior to bregma]: cingulate cortex area 2 (CG2) [1.20 mm] and hippocampal *cornu ammonis* 2 (CA2) [-2.64 mm]. The procedure was the same as the one described for the five structures of interest.

Optogenetic set-up

The sound-attenuating cubicles in which the self-administration boxes are enclosed have been designed for coupling with neurobiological studies, notably optogenetic (Imetronic, Pessac, France). They are equipped with a removable cap allowing accommodation of the LED system and commutator with the self-administration box remaining isolated. Available LED systems and commutators allowed testing ten rats in parallel.

Validation of the optogenetic procedures (Control experiment)

Six days after the last surgery, they were placed in a 30 cm x 30 cm x 40 cm box while headstage was connected to the electrophysiological and optogenetic set-ups. Light stimulation in rats expressing ChR2 induced a significant neuronal activation during the entire length of the light pulse, whereas the same manipulation in rats expressing ArchT induced a significant neuronal inhibition (**figure S7**).

Rats excluded from Experiment 2

After experiment completion, 8 rats were excluded (1 *EYFP*, 4 *ArchT* and 3 *Chr2*); 6 due to low or unilateral viral infection, one for one fiber misplacement and one for malformation of one hemisphere. Then analyses were performed on 6 *EYFP*, 11 *ArchT* and 8 *Chr2* rats.

Calculation of brain cocaine concentrations

The following equation was used: $c = [dk/v(\alpha - \beta)] * (e^{-\beta t} - e^{-\alpha t})$, where c is the concentration of cocaine in the brain (μM), d is the dose of cocaine (mg), k is the rate constant for transfer from the blood to the brain (0.233), v is the volume of the brain (4.4 cm^3), α and β (0.642 and 0.097) are constants representing the flow of cocaine between the blood and brain compartments and the elimination of cocaine from the body, respectively. t is the time (min) elapsed since the last infusion. Brain cocaine concentration generated by each infusion was calculated every 10 sec from the time of infusion to the end of the session. The time course of each cocaine infusion was calculated independently of the others. The actual brain cocaine concentration was then obtained by summing the concentrations produced by each infusion in 10 sec intervals.

Data analysis

c-Fos immunohistochemistry

Beside quantitative differences in expression, evaluated by the mean number of *c-Fos* positive cells per mm^2 , indices of altered functional connectivity between the five structures of interest were also investigated. First, a descriptive approach using Hierarchical Ascendant Cluster Analysis was applied. It was performed using the measure of Euclidian distance and average distance linkage methods. It is based on a relative comparison (one to one structure) of similarities between *c-Fos* expression into the five structures of interest. It provides a qualitative picture (translated into the cluster tree) of the hierarchical distance between structures. Different cluster trees in *Low* and *High frequency* rats support distinct recruitments of the circuit in the two groups. Second, to support and complete the descriptive cluster analysis, a correlation approach was applied. It allows evaluating, and statistically testing, the nature and strength of the relationships between *c-Fos* activity in pairs of brain structures.

Supplemental results

Acquisition of cocaine intravenous self-administration (Experiment 1)

Over the first 8 sessions, rats acquired cocaine self-administration. Over the last three sessions, number of self-infusions was stable [Session effect, $F(2,48) = 2.09$, ns] (**figure S1A**) and discrimination between active and inactive holes was stable and significant [Hole effect, $F(1,24) = 62.62$, $p < 0.0001$; Hole x Session, $F(2,48) = 0.39$, ns] (**figure S1B**). Based on these last three sessions, three homogeneous groups were formed showing stable cocaine intake [Group effect, $F(2,22) = 0.59$, ns; Group x session interaction, $F(4,44) = 0.47$, ns] (**figure S2A**), stable significant discrimination [Group effect, $F(2,22) = 0.0033$, ns; Group x Hole, $F(2,22) = 1.79$, ns; Group x Hole x Session, $F(4,44) = 1.40$, ns] (**figure S2B**) and stable pattern of use as measured by the III [Group effect, $F(2,22) = 0.06$, ns; Group x Session, $F(4,44) = 0.65$, ns] (**figure S2C**).

Induction of distinct frequencies of intake (Experiment 1)

After acquisition (**figures S1 and S2**), and formation of three equivalent groups, each one was assigned to a distinct TO period (2 min, 4 min or 6 min). The procedure immediately produced different patterns of intake as measured by the mean inter-infusion intervals (III) [Group effect $F(2,22) = 102.04$, $p < 0.0001$, $III = 3.19 \text{ min} \pm 0.18$ (2minTO) $< 4.91 \text{ min} \pm 0.19$ (4minTO) $< 6.84 \text{ min} \pm 0.19$ (6minTO)] (**figure S3A**). Discrimination [Hole effect, $F(1,22) = 142.22$, $p < 0.001$; Group effect, $F(2,22) = 0.41$, ns; Group x Hole, $F(2,22) = 2.22$, ns; Group x Hole x Session, $F(36,396) = 0.80$, ns] and daily intake of cocaine [Group effect, $F(2,22) = 2.54$, ns; Group x session, $F(36,396) = 0.94$, ns] were similar among groups over the 19 basal sessions of this differential TO procedure (**figures S3B, S3C**).

In each group, the III were normally or log-normally distributed centered on 3, 5 and 7 min III respectively. Therefore low and high extremes in the 4minTO group overlapped with the 2minTO and 6minTO groups, respectively. Consequently, all rats were pooled and divided in two groups based on the median III value: High III ($n = 13$, mean III = 6.20 ± 0.25 , *Low frequency* rats) and Low III ($n = 12$, mean III = 3.49 ± 0.22 , *High frequency* rats). These two groups did not differ for III over the 8 acquisition sessions [Group effect, $F(1,23) = 0.38$, ns; Group x Session, $F(7,161) = 0.2$, ns], but did over all 19 following sessions, as expected [Group effect, $F(1,23) = 62.21$, $p < 0.001$] (**figure 1A**). Notably, the two groups were not significantly different for nose-poke responding and discrimination [Group effect, $F(1,23) = 0.0095$, ns; Hole effect, $F(1,23) = 164.84$, $p < 0.001$; Group x Hole x Session, $F(26,598) = 1.07$, ns] (**figure 1C**) nor for cocaine intake [Group effect, $F(1,23) = 2.59$, ns; Group x Session, $F(26,598) = 0.59$, ns] over all 27 self-administration sessions (**figure 1B**).

Acquisition of cocaine intravenous self-administration and induction of distinct frequencies of intake (Experiment 2)

Over the first 8 sessions, rats acquired cocaine self-administration, whatever the experimental group, *EYFP*, *ArchT* or *ChR2* rats. Indeed, over sessions 6 to 8, number of self-infusions was stable [Session effect, $F(2,44) = 1.32$, ns; Group effect, $F(2,22) = 0.67$, ns; Group x Session, $F(4,44) = 0.7$, ns] and discrimination between active and inactive holes was stable and significant [Hole effect, $F(1,22) = 169.35$, $p < 0.0001$; Hole x Session, $F(2,44) = 1.84$, ns; Group effect, $F(2,22) = 0.75$, ns; Group x Hole, $F(2,22) = 0.38$, ns; Group x Hole x Session, $F(4,44) = 2.06$, ns]. Also, frequency of use, as measured by the mean III, was stable [Session effect, $F(2,44) = 1.57$, ns; Group effect, $F(2,22) = 0.8$, ns; Group x Session, $F(4,44) = 2.26$, ns] (data not shown).

After acquisition, *EYFP* and *ArchT* rats were assigned to the 2minTO procedure (*High frequency*) and *ChR2* rats were assigned to the 6minTO procedure (*Low frequency*).

Over the 15 sessions preceding the first cocaine-induced reinstatement test, the three groups differed, in a stable manner, for the frequency of use, as measured by the mean III per session [Group effect, $F(2,22) = 12.35$, $p < 0.0005$; Group x Session, $F(28,308) = 0.87$, ns]. *EYFP* and *ArchT* rats showed a similar frequency of self-administration (mean III: 4.54 ± 1.06 ; 5 ± 0.99 , respectively) (NK, $p = \text{ns}$), which was higher than the frequency of the *ChR2* rats (mean III: 6.61 ± 0.26) (NK, $p < 0.0005$, $p < 0.005$, as compared to *EYFP* and *ArchT*, respectively). The three groups did not differ for discrimination over the 15 sessions preceding the cocaine-induced reinstatement test [Hole effect, $F(1,22) = 8.17$, $p < 0.01$;

session 23, [Group effect, $F(2,22) = 1.01$, ns], which was equal to, or close to, the maximal possibly earned (i.e. 25) (25 ± 0 *EYFP*, 24.77 ± 0.52 *ArchT*, 24.71 ± 0.29 *Chr2*) (data not shown).

Cocaine-induced reinstatement is increased in *High vs Low frequency* rats (Experiment 1 and 2).

In both Experiment 1 and 2, rats were tested for cocaine-induced reinstatement in session 24. In Experiment 2, rats equipped for PL optogenetic stimulation, were tested in control condition; i.e. the skull headstage was connected but the stimulation was not activated. *EYFP* and *ArchT* rats, trained with the *2minTO* condition, did not differ and were pooled as *High frequency* rats. The *Chr2* group, trained with the *6minTO* condition, constituted *Low frequency* rats.

Extinction. In Experiment 1, during the first 90 min of the reinstatement session (extinction conditions), discrimination progressively decreased over time [Hole effect, $F(1,23) = 33.05$, $p < 0.001$; Time effect, $F(17,391) = 18.33$, $p < 0.001$; Time x Hole, $F(17,391) = 10.1$, $p < 0.001$] (**figure 2A**). Notably, *High frequency* rats showed higher responding than *Low frequency* rats [Group effect, $F(1,23) = 4.86$, $p < 0.05$; Group x Time, $F(17,391) = 2.56$, $p < 0.001$; Group x Hole x Time, $F(17,391) = 2.06$, $p < 0.001$]. This effect relied on specific higher responding in the active hole during the first two 5min time-blocks ($p < 0.001$ for both). Importantly, however, the two groups showed a similar extinction rate, as evidenced by a similar time-course in discrimination over the first 15 minutes, i.e. until discrimination was lost (**figure 2A**) [Group x Time, $F(2,46) = 1.04$, $p = \text{ns}$; Group x Hole x Time, $F(2,46) = 1.71$, $p = \text{ns}$]. At the end of the 90 min of the extinction period, before non-contingent cocaine infusions, the two groups showed similar low level of responding in both active and inactive holes [Group effect, $F(1,23) = 1.5$, ns; Hole effect, $F(1,23) = 2.56$, ns; Group x Hole, $F(1,23) = 0.35$, ns; over the last 15 minutes].

Notably, in Experiment 2, *High* and *Low frequency* rats did not differ for extinction [Group effect, $F(1,22) = 0.002$, ns] and responding was lower than in Experiment 1 (data not shown). We hypothesize that dummy connection of optical fibers was responsible for this decrease in operant responses, when cocaine was not available. Indeed decrease in responses (and self-infusions) was not observed when rats were head connected during a regular self-administration session (tested between sessions 16 and 19 for habituation – data not shown). Importantly however, the time-course of extinction was similar in the two groups [Group x Hole x Time, $F(9,198) = 0.7$, ns] and at the end of the 50 min of the extinction period, before non-contingent cocaine infusions, the two groups showed similar low level of responding in both active and inactive holes [Group effect, $F(2,21) = 0.22$, ns; Group x Hole x Time, $F(4,42) = 1.53$, ns; over the last 15 minutes].

Reinstatement. In both experiments (**figure 2**), non-contingent cocaine infusions produced reinstatement of extinguished instrumental responding. It induced a specific [Hole effect, $F(1,23) = 30.33$, $p < 0.001$; $F(1,22) = 14.95$, $p < 0.001$ for experiments 1 (**figure 2C**) and 2 (**figure 2D**), respectively] and dose-dependent increase of active responding [Dose effect, $F(3,69) = 10.05$; $p < 0.001$; $F(3,66) = 17.89$, $p < 0.001$, respectively; Hole x Dose, $F(3,69) = 6.62$, $p < 0.001$; $F(3,66) = 7.38$, $p < 0.0005$, respectively]. This effect, however, depended on the group. *High frequency* rats had higher responding than *Low frequency* rats [Group effect, $F(1,23) = 5.51$, $p < 0.05$; $F(1,22) = 6.99$, $p < 0.01$, respectively] specifically in the active hole [Group x Hole, $F(1,23) = 6.52$, $p < 0.05$; $F(1,22) = 1.69$, $p < 0.05$, respectively]. Time course of

nose-pokes over the 120 min following the first non-contingent cocaine infusion is portrayed in **figure 2B** (Experiment 1).

Self-administration behavior in *High* and *Low frequency* rats selected for c-Fos immunohistochemistry.

Twelve rats ($n = 6$ *High* and $n = 6$ *Low frequency* rats) were tested in a last self-administration session that ended when rats self-administered 8 infusions or 90 min elapsed. After the last infusion, they were placed back in their home cage. They were sacrificed 80 minutes later by perfusion, for c-Fos immunohistochemistry.

The selected rats were representative of the *High* and *Low frequency* groups. They did not differ for cocaine intake [Group effect, $F(1,10) = 3.224$, ns; Group x Session, $F(26,260) = 0.363$, ns] (**figure S4A**), for hole responding or discrimination (data not shown) [Group effect, $F(1,10) = 0.38$, ns; Hole effect, $F(1,10) = 57.84$, $p < 0.001$; Group x Hole x Session, $F(26,260) = 0.86$, ns] over all the 27 self-administration sessions. *High frequency* rats showed higher cocaine-induced reinstatement than *Low frequency* rats (**figure S4B**).

Optogenetic inhibition of PL neuronal activity in *High frequency* rats decreases cocaine-induced reinstatement. Optogenetic activation of PL neuronal activity in *Low frequency* rats has no effect (Experiment 2).

In session 27, as in session 24, rats from Experiment 2 were tested for cocaine-induced reinstatement but under PL optical stimulation. In session 24 (**figure 5A**), EYFP, ArchT and Chr2 rats differed for cocaine-induced reinstatement in a dose [Hole effect, $F(1,21) = 18.61$, $p < 0.0005$; Hole x Dose, $F(3,63) = 9.65$, $p < 0.0005$] and group dependent manner [Group effect, $F(2,21) = 4.23$, $p < 0.05$; Group x Hole x Dose, $F(6,63) = 2.48$, $p < 0.05$]. Precisely, EYFP and ArchT (*High frequency*) rats did not differ, but showed a higher reinstatement than Chr2 (*Low frequency*) rats ($p < 0.05$ for both).

In session 27, the three groups still differed for cocaine-induced reinstatement [Group effect, $F(2,21) = 3.24$, $p < 0.05$]. However, ArchT (*High frequency*) and Chr2 (*Low frequency*) rats produced a similar reinstatement that was significantly lower than reinstatement by EYFP rats (*High frequency*) ($p < 0.05$ for both) (**figure 5B**). Reinstatement was similar in session 24 and session 27 in EYFP rats [Stimulation effect, $F(1,10) = 0.002$, $p = 0.9$; Dose x Stimulation effect, $F(3,30) = 0.06$, $p = 0.9$; Dose x Hole x Stimulation, $F(3,30) = 0.06$, $p = 0.97$] as well as in Chr2 rats [Stimulation effect, $F(1,14) = 0.13$, $p = 0.71$; Dose x Stimulation effect, $F(3,42) = 0.3$, $p = 0.82$; Dose x Hole x Stimulation, $F(3,42) = 0.2$, $p = 0.89$]. Remarkably, there was a dose and hole dependent decrease of reinstatement in ArchT rats [Dose x Stimulation effect, $F(3,54) = 5.35$, $p < 0.005$; Stimulation x Dose x Hole x Stimulation, $F(3,54) = 2.92$, $p < 0.05$].

Optical stimulation did not alter responding during the first 50 min of the session, i.e. during extinction which precedes non contingent cocaine infusions [Stimulation effect, $F(1,38) = 0.57$, $p = 0.45$; Group effect, $F(2,38) = 0.48$, $p = 0.62$; Stimulation x group, $F(2,38) = 0.55$, $p = 0.58$; Stimulation x Group x Hole, $F(2,38) = 0.48$, $p = 0.63$; Stimulation x Group x Hole x Time, $F(18,342) = 1.29$, $p = 0.2$]. In both session 24 (stim Off) and 27 (stim On), self-administration behavior extinguished over the 50 min [Hole effect, $F(1,21) = 9.65$, $p < 0.01$, Hole x Time, $F(9,189) = 2.10$, $p < 0.05$; Hole effect, $F(1,21) = 2.07$, $p = 0.2$; Hole x Time, $F(9,189) = 2.55$, $p < 0.01$, respectively] and the three experimental groups did not differ [Group effect, $F(2,21) = 0.05$, $p = 0.94$; Hole x Group, $F(2,21) = 1.60$, $p = 0.22$; Hole x Time x Group, $F(18,189) = 1.05$, $p = 0.40$; Group effect, $F(2,21) = 0.73$, $p = 0.5$; Hole x Group, $F(2,21) = 2.14$, $p = 0.15$; Hole x Time x Group, $F(18,189) = 1.15$, $p = 0.31$, respectively].

Correlations between locomotor activity expressed during the last self-administration sessions and c-Fos expression.

Locomotor (as measured by total successive cell beam breaks) and motor (as measured by total non-successive beam breaks) activities expressed during the last self-administration session before sacrifice did not correlate with c-Fos expression in the five structures of interest (see **table 1** below).

Table 1

	Nac core	Nac shell	PL	IL	BLA
Locomotor activity	$r=-0,1926$ $p=,549$	$r=-0,2193$ $p=,493$	$r=-0,3772$ $p=,227$	$r=-0,1745$ $p=,588$	$r=-0,147$ $p=,649$
Motor activity	$r=-0,0143$ $p=,965$	$r=0,1102$ $p=,733$	$r=-0,2122$ $p=,508$	$r=-0,2168$ $p=,499$	$r=-0,2676$ $p=,400$

c-Fos quantification in additional brain structures.

Different from what was observed for the five structure of interest, *High* ($p < 0.01$ for CG2, $p < 0.05$ for CA2) and *Low frequency* rats ($p < 0.01$ for CG2, $p < 0.05$ for CA2) showed a similar c-Fos expression, higher than the one of cocaine-naïve rats [Group effect, $F(2,13) = 5.39$, $p < 0.01$ for CG2, $F(2,13) = 4.9$, $p < 0.05$ for CA2], in both the CG2 and CA2 (**figure S5**).

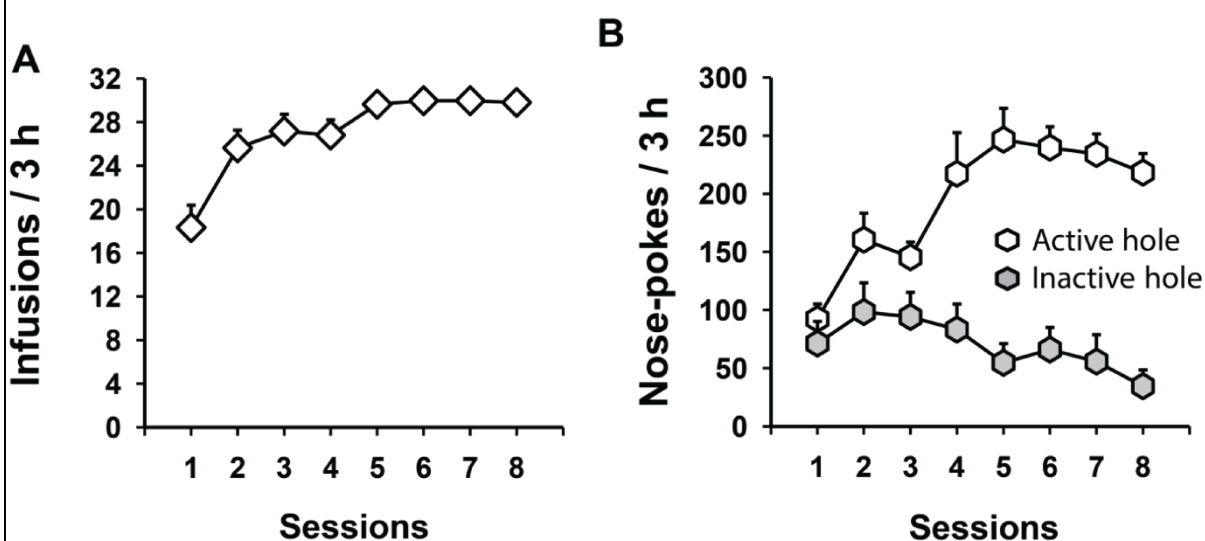


Figure S1: Acquisition of cocaine self-administration behavior. Mean daily self-infusions (**A**) and nose-pokes (**B**) during the first 8 sessions are represented, for *Experiment 1*. Cocaine self-administration (0.8mg/kg/40μL) was conducted daily in an FR3 (first three days), then FR5 (last five days) schedule. A 40 sec TO was applied during these first 8 sessions. Total self-infusions per session were limited to 30. The 25 tested rats acquired cocaine self-administration as shown by the rapid stability of intake (**A**) and by significant and stable discrimination between the active and inactive holes (**B**).

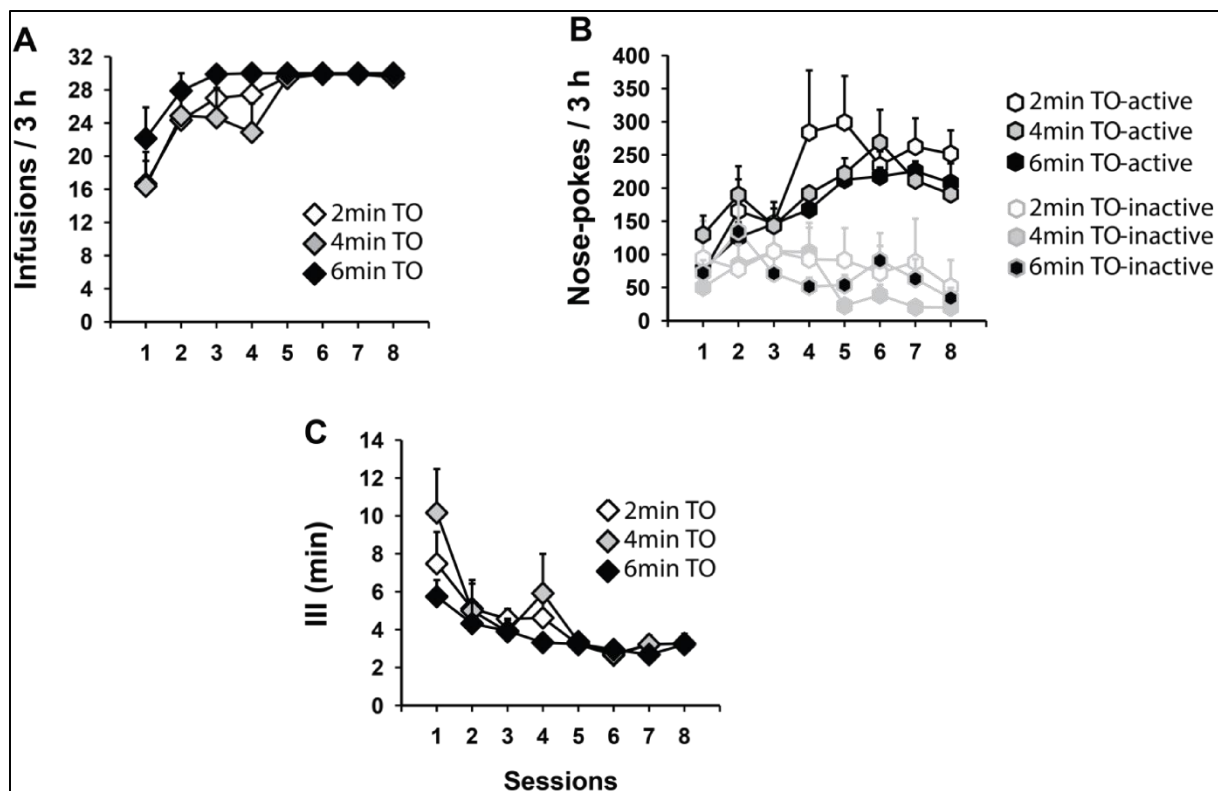


Figure S2: Homogeneity in acquisition of cocaine self-administration behavior in the three groups constituted at the end of the 8 acquisition sessions (Experiment 1). Mean daily self-infusions (A), nose-pokes (B) and Inter-Infusion Interval (III) (C) over the 8 sessions are presented. The three groups ($n=8$ to 9 per group) showed similar self-administration behavior for the three considered factors. They were then assigned to different TO conditions (2 min, 4 min or 6 min) starting in session 9, to induce distinct frequencies of self-administration (*High / Low*).

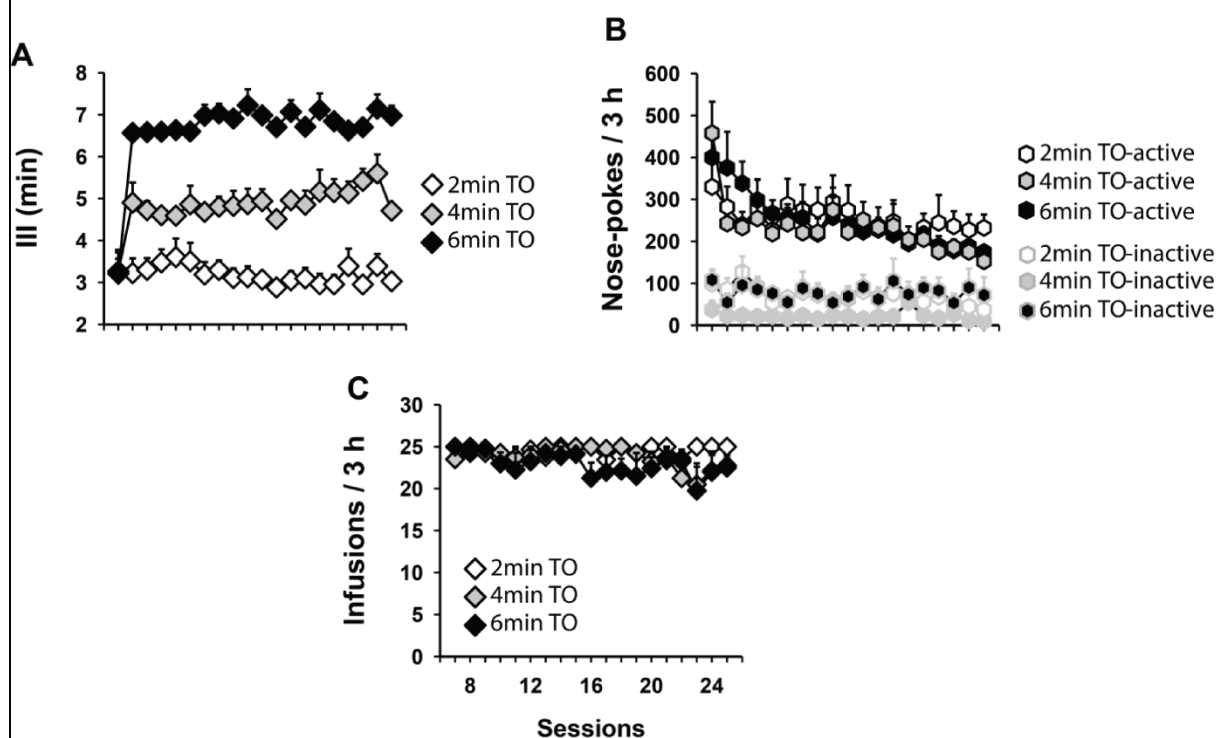


Figure S3: Cocaine self-administration behavior in the three groups attributed with 2, 4 or 6 min TO period (Experiment 1). Mean daily frequency of use, as measured through the Inter-Infusion Interval (III) (A). Nose-spokes (B) and self-infusions (C) are shown for the last acquisition session (40sec TO period for all) and all following 19 sessions with the specific TO for each group. The procedure induced distinct stable frequencies of use. Discrimination between active and inactive holes, as well as cocaine intake, was similar among groups over all 19 basal sessions of this specific TO procedure.

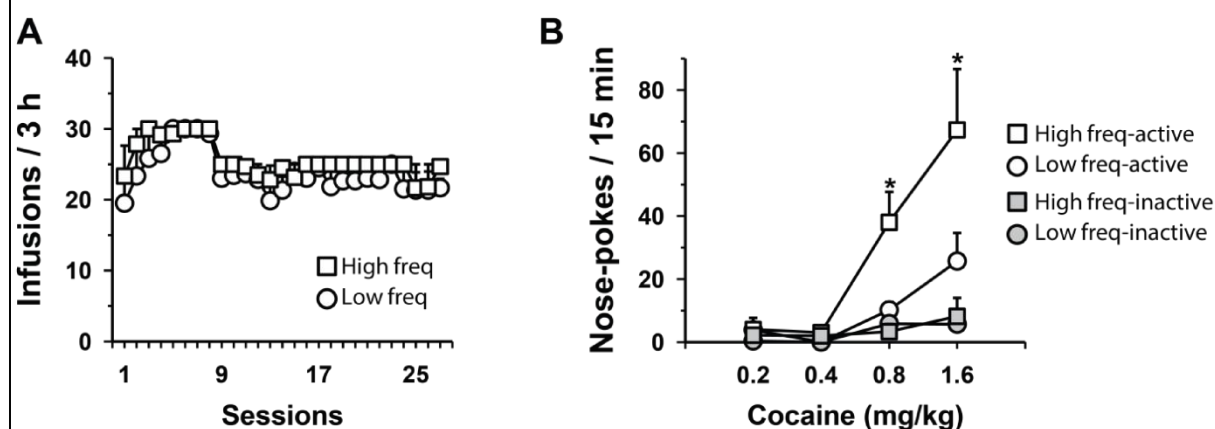


Figure S4: Cocaine self-administration behavior and cocaine-induced reinstatement in *High* (*High freq*) and *Low frequency* rats (*Low freq*) selected for c-Fos quantification. (A) Daily total self-infusions over the 27 sessions was similar in the representative *High* ($n = 6$) and *Low frequency* ($n = 6$) rats. (B) Total active and inactive nose-pokes over the first fifteen minutes following each non-contingent infusion of cocaine. *High frequency* rats showed higher reinstatement than *Low frequency* rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ as compared to *Low freq* rats.

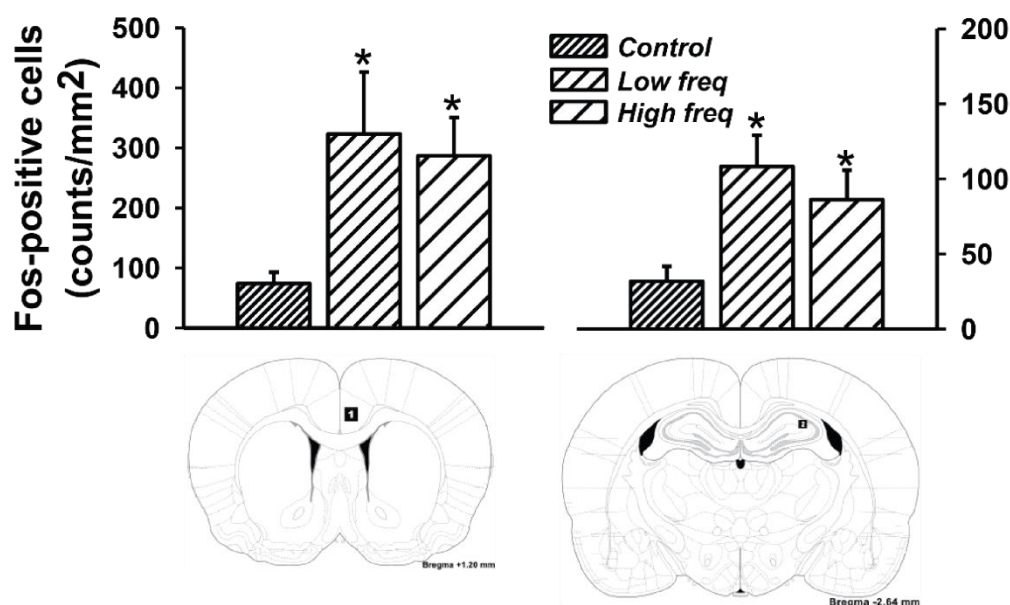


Figure S5: Mean number of Fos-positive cells/mm² in Cingulate cortex area 2 (CG2) and hippocampal CA2 in *High* and *Low frequency* rats. In CG2 (A) and CA2 (B), *High* and *Low frequency* rats had a similar activation as compared to cocaine naïve animals. In the bottom part, the pictures

are schematic representations of coronal sections of the rat brain taken at 1.20, and -2.64 mm from Bregma. Numbers in the sections represent the regions analyzed for c-Fos: (1) CG2; (2) CA2.

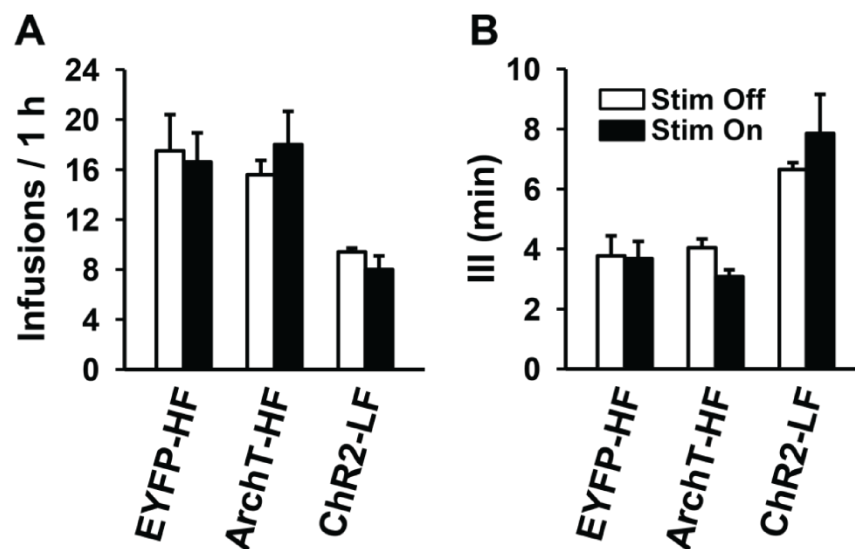
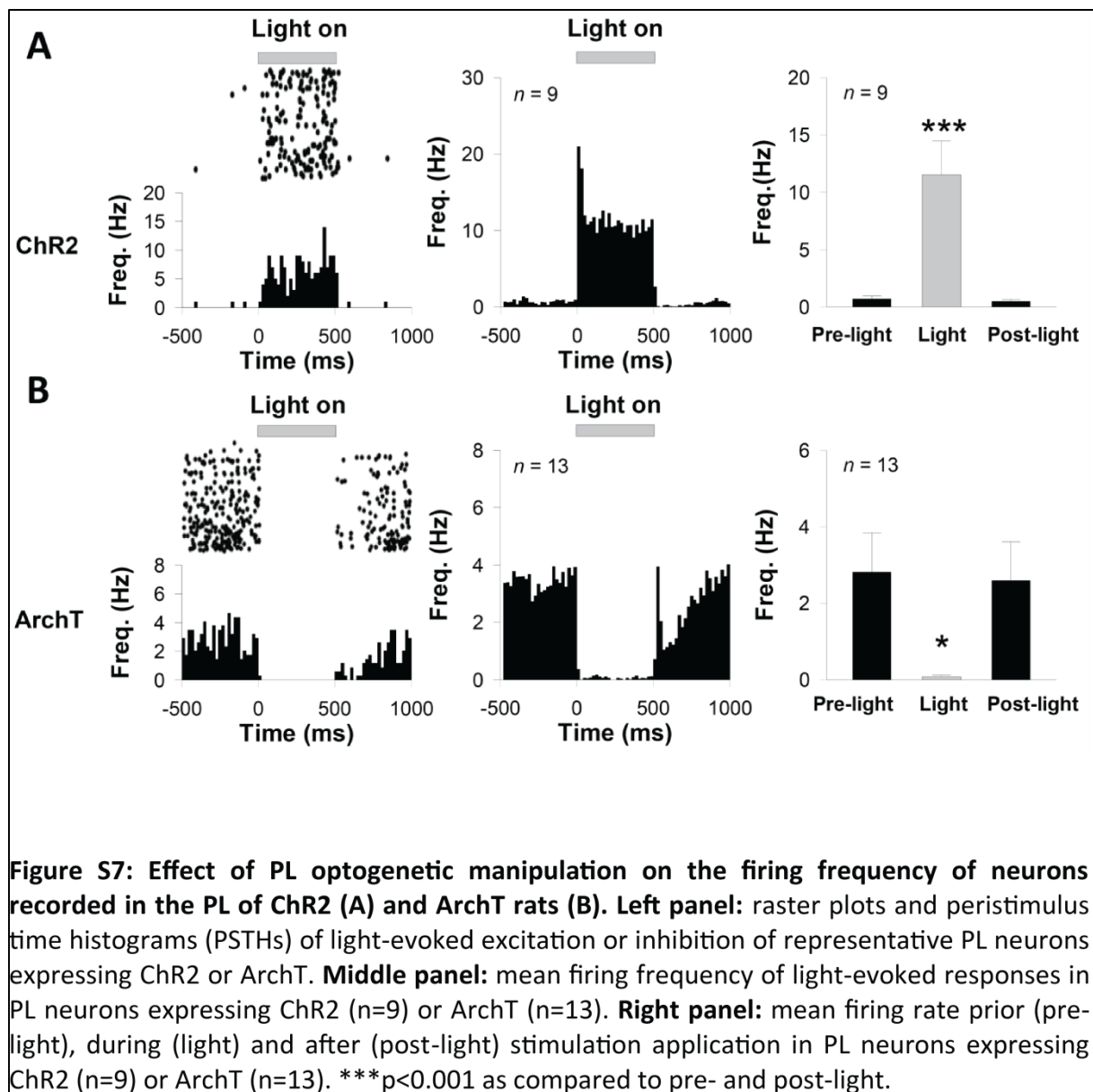


Figure S6: Effect of PL optogenetic manipulation on cocaine self-administration in *High frequency* (HF) (*ArchT* & *EYFP*) and *Low frequency* (LF) (*ChR2*) rats. Total number of infusions (**A**) and Inter-Infusion-Interval (III) (**B**) over the 60 min of test in the absence (control condition-*Stim Off*) and presence of optical stimulation (*Stim On*). Neither inactivation (*ArchT-HF*) nor activation of the PL (*ChR2-LF*) altered total cocaine intake and III. Optical stimulation per se (*EYFP-HF*) had no effect. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *ChR2-LF* showed lower infusions than the *High frequency* rats over the 60 min of self-administration and their III were longer, logically.



1.1 DISCUSSION

Une vision dichotomique, 'PL-go et IL-stop', du rôle du PL et de l'IL dans la réinstallation du comportement d'auto-administration de cocaïne, a longtemps prévalu et est désormais largement remise en cause [pour revue (Gourley and Taylor, 2016; Jasinska *et al*, 2015; Moorman *et al*, 2015)]. Il est reconnu que nos travaux y ont contribué (Moorman *et al*, 2015). D'autres données (Limpens *et al*, 2015), complémentaires à celles de (Chen *et al*, 2013) testant l'inhibition du comportement de recherche de cocaïne, non par un choc électrique, mais un stimulus conditionné à un choc électrique, confirment l'implication possible du PL dans l'inhibition du comportement.

Cette nouvelle vision du rôle du PL, vaut aussi pour des données obtenues avec des renforçateurs naturels. Dans une étude récente, utilisant le sucre comme renforçateur et

réalisant des enregistrements unitaires, (Moorman and Aston-Jones, 2015) identifient tant avant qu'après extinction des neurones qui répondent à un stimulus discriminatif signifiant 'sucrose' et tant dans le PL que dans l'IL.

Pour la première fois, nous montrons que, chez les mêmes individus, le PL peut promouvoir ou inhiber le comportement selon le contexte expérimental. Nos données réconcilient des données, qui contradictoires en apparence, montraient que l'inactivation du PL pouvait diminuer la recherche de cocaïne (LaLumière *et al*, 2012), mais à l'opposé, aussi promouvoir une recherche compulsive de cocaïne (Chen *et al*, 2013; Mihindou *et al*, 2013). Plus qu'un promoteur du comportement de recherche de cocaïne, le PL semble, au moins précocement, contrôler des aspects liés aux contingences expérimentales. Dans une revue publiée à la même période, (Jasinska *et al*, 2015) propose, comme nous le suggérons dans la discussion de notre article, que cet engagement différentiel du PL dépend de la tâche apprise. L'activité dans le PL favorise l'exécution de la réponse comportementale la plus 'appropriée' ou la mieux apprise dans les conditions testées. La cocaïne renforce le comportement d'auto-administration. Dans un protocole de réinstallation après auto-administration classique, la cocaïne agit comme un stimulus qui réactive cette réponse acquise d'auto-administration et le PL en facilite l'exécution. Dans une condition, où la réponse acquise sous l'effet de la cocaïne est de ne pas émettre le comportement, comme pendant le time-out dans notre cas, en réponse à la présentation d'un discriminatif indiquant l'indisponibilité de la drogue (Mihindou *et al*, 2013) ou encore quand les deux types d'options (rechercher / inhiber la recherche) sont en conflit (Chen *et al*, 2013a; Limpens *et al*, 2015) (la réponse renforcée par la cocaïne est désormais punie par un choc électrique), le PL facilite l'exécution de la réponse la plus adaptée, à savoir ne pas répondre.

2. INACTIVATION OPTOGENETIQUE DE LA VOIE PL-NACORE ET AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE : CIBLAGE DE LA VOIE PAR UNE STIMULATION OPTIQUE AU NIVEAU DU NACORE

Avec l'inhibition optogénétique du PL (Martín-García *et al*, 2014), nous avons montré une implication différentielle de cette structure en fonction des contingences expérimentales, avec un effet facilitateur sur la réinstallation du comportement et un effet inhibiteur sur le contrôle de la prise pendant les périodes de time-out.

Dans une seconde étape, pour mieux caractériser le rôle du PL, nous avons cherché à étudier l'implication différentielle de ses voies de projection. Nous nous sommes intéressés à la voie PL-NAcCore, décrite comme favorisant la recherche de cocaïne dans des protocoles de réinstallation. Nous avons notamment pour objectif d'étudier si cette voie était spécifique de cet effet facilitateur, sans intervenir dans l'inhibition sur le contrôle de la prise.

Dans cette première étape, comme pour l'étude précédemment décrite (Martín-García et al, 2014), nous avons infecté le PL avec un virus exprimant une opsine, mais ici la stimulation optique a été appliquée non pas au niveau du PL, mais dans le NAcCore.

2.1. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES

Virus

Nous avons utilisés deux virus adéno-associés (AAV) concentrés. Le virus contrôle, qui code uniquement pour une protéine fluorescente (AAV5/CamKII-EYFP) et le virus d'intérêt qui code pour l'archéorhodopsine de souche TP009 (AAV5/CamKII-ArchT-GFP) sous le contrôle du promoteur à la calmoduline kinase II (CamKII) qui lui confère une spécificité pour les neurones glutamatergiques. Le virus d'intérêt code aussi pour une protéine fluorescente (GFP) qui permet de visualiser la zone d'expression du virus et donc de la protéine ArchT.

Chirurgie

Les procédures chirurgicales et le suivi post-opératoire appliqués à cette expérience sont les mêmes que ceux qui ont été utilisés pour les expériences précédentes à l'exception des procédures spécifiques liées à l'utilisation des outils de stimulation optogénétique qui sont décrites ci-dessous.

Injections (virales) intracérébrales

Après avoir effectué une désinfection à la Bétadine, les rats ont été rasés au niveau du crâne, et la peau a été incisée sur 2 cm. Un orifice a été pratiqué dans le crâne au niveau de chaque hémisphère, la dure-mère est délicatement percée pour laisser passer l'injecteur. Il s'agit d'une pipette de verre étirée [25 μ m, WPI (1B150F-4)] ; descendue dans chaque orifice au moyen d'un micro-descendeur (IVM, Scientifica) au niveau de la structure d'intérêt. Dans cette expérience, nous avons injecté bilatéralement la solution virale, au niveau du **PL**, aux coordonnées suivantes ; AP = + 3,2 ; L = $\pm$ 0,6 par rapport au Bregma et DV = - 2,6 par rapport à la surface du cerveau. Les injecteurs ont été remontés 5 min après la fin de l'injection, pour laisser la solution diffuser (0,5 μ L par hémisphère). Les orifices ont été rebouchés avec de la cire à os (Bone Wax, Ethicon).

Implantation des fibres optiques et cathétérisation jugulaire

7 jours après l'injection virale une deuxième chirurgie a été pratiquée pour mettre en place les fibres optiques (MFC_200/245-0.37_8mm_RM3-E_FLT, Doric Lenses -extrémité plate, ouverture optique de 0.37, 245 μ m diamètre extérieur) au niveau du **NAc** selon les coordonnées suivantes : AP = 1,56 ; L = $\pm$ 2,68 avec un angle de 10° et DV = - 6,2 par rapport à la surface du cerveau. Dans un deuxième temps, les animaux ont été implantés d'un

cathéter intra-jugulaire ; dans les conditions décrites dans les matériels et méthodes générales.

Stimulations optogénétiques

Avant chaque session de stimulation, l'intensité du signal en sortie de fibre a été vérifiée et ajustée à des valeurs proches de 7 mW (PM100D, Thorlabs, Newton, USA). Les animaux ont alors été connectés à la fibre servant de cordon de raccordement (MFP_200/230/LWMJ-0.37_0.65m_LC-CM3, Doric Lenses, Quebec) entre le commutateur PlexBright et les implants situés sur leur tête. La session d'auto-administration a débuté immédiatement après la connexion de la voie liquide puis des fibres optiques.

La stimulation (1 Hz, 500ms ON, 500ms OFF) a été appliquée 1 minute avant la première injection lors de la session de réinstallation et 1 minute avant le début de la session de base lors du test sur l'auto-administration de base. Dans les deux cas, la stimulation a été maintenue jusqu'à la fin de la session.

2.2. PROTOCOLE

Après la période d'habituation à l'animalerie, l'injection intracérébrale de virus a été réalisée sur l'ensemble des rats, 7 ont reçu une injection bilatérale du virus contrôle contenant uniquement la protéine fluorescente, les 13 autres ont été injectés avec le virus contenant l'archéorodopsine (ArchT) sensible à la lumière. Une semaine plus tard tous les rats ont été cathétérisés et implantés d'une fibre optique dans chaque hémisphère au niveau du NAcCore. Après 3 jours de repos post-opératoire, les animaux ont commencé l'auto-administration de cocaïne par une période d'acquisition composée de 3 sessions à FR3, puis 5 sessions à FR5 avec un TO de 40 secondes et un nombre d'injections maximum fixé à 30 (la session s'arrête lorsque le rat atteint cette valeur). Le reste de l'expérience s'est déroulée en appliquant un ratio fixe de 5 et un TO de 2 minutes avec un nombre d'injections maximum de 25 (conditions identiques à l'article présenté au-dessus). Le 1^{ier} test avec stimulation a eu lieu au cours de la 24^{ième} session après le début de l'expérience. La stimulation lors de la session de base a été effectuée pendant la session 29.

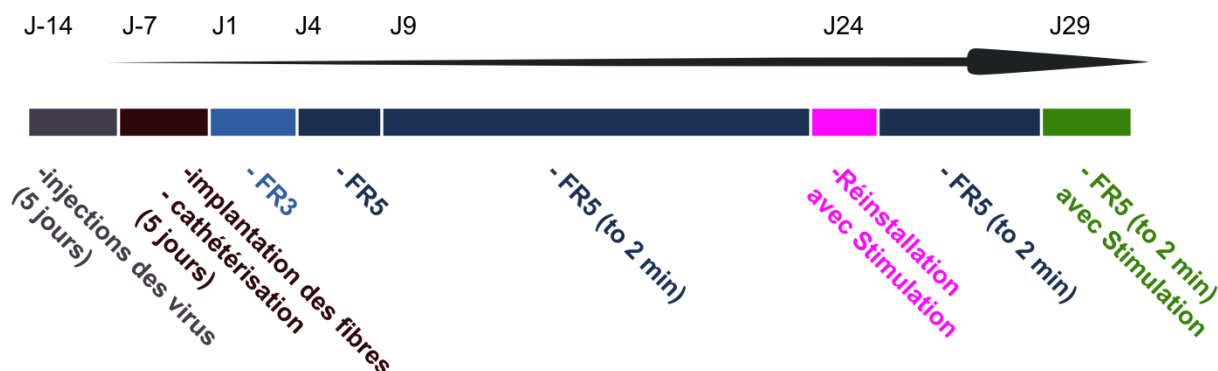


Figure 34 : Protocole expérimental de l'expérience intitulée « Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore ».

2.3. RESULTATS

Données comportementales

Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne par les rats ArchT et EYFP

Après une période d'acquisition de 8 jours, composée de 3 jours à FR3 puis 5 jours à FR5, les rats ont été soumis à un protocole identique à celui décrit dans (Martín-García *et al*, 2014). Les rats acquièrent rapidement le comportement. Le nombre d'injections par session augmente progressivement de J1 à J7 [Effet Temps, $F(1,18)=4,50$, $p<0,0005$] et cette augmentation est identique entre le groupe contrôle et le groupe ArchT [Effet Groupe, $F(1,18)=0,24$, $p<0,5$] et se stabilise au 7^{ième} jour. La discrimination entre les trous actif et inactif intervient elle aussi rapidement et est significative sur les sessions J1 à J23 [Effet trou, $F(1,18)=36,94$, $p<0,0001$] et elle est comparable dans les deux groupes expérimentaux sur l'ensemble de la période [Trou*Groupes, $F(1,18)=0,009$, $p=0,92$] mais aussi dans sa cinétique [Trou*Groupe*Temps, $F(22,396)=0,609$, $p=0,91$].

Les animaux montrant un comportement d'auto-administration significatif et stable, nous avons appliqué le protocole avec un TO de 2 min et un nombre d'injections maximum fixé à 25 à partir du jour 9.

Globalement la discrimination entre trous actif et inactif est observée des sessions 1 à 27 [Effet Trou, $F(1,18)=36,94$, $p<0,00001$] et est comparable dans les deux groupes expérimentaux [Effet Trou*Groupe, $F(1,18)=0,01$, $p>0,5$].

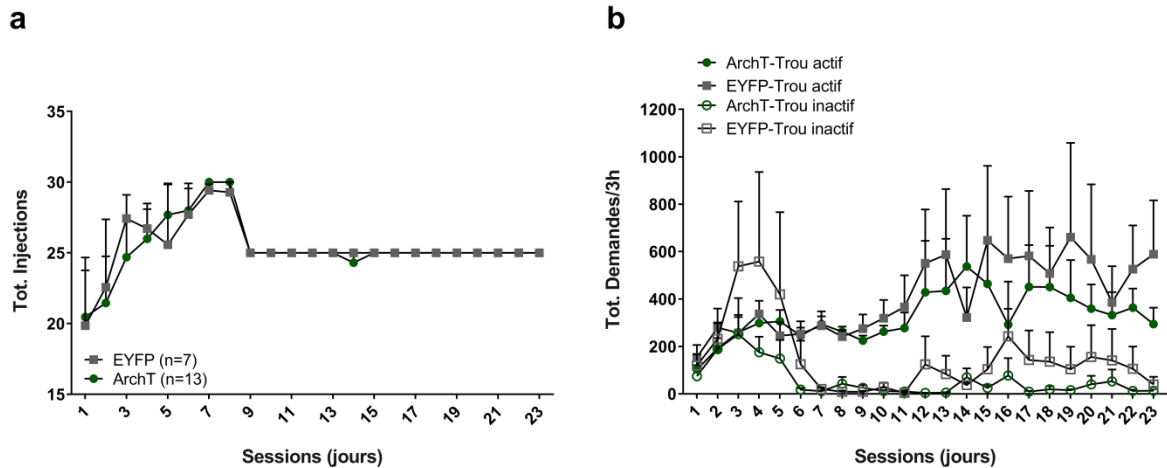


Figure 35 : Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne chez les rats *ArchT* et contrôle *EYFP*.

a. Prise de Cocaïne mesurée au travers du nombre moyen d'injections obtenu par session. b. Moyenne par session du nombre total de demandes au niveau des trous actif et inactif.

Effet d'une inactivation de la voie PL-NAcCore sur le comportement d'auto-administration de cocaïne et sa réinstallation après extinction : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore

Pendant la phase d'extinction, les deux groupes expérimentaux montrent une discrimination significative entre trous actif et inactif [Effet Trou, $F(1,18)=71,33$, $p<0,0001$] (Figure 36c-d), mais les réponses dans le trou actif diminuent de façon significative au cours des 50 min d'extinction [Effet Temps, $F(49,882)=2,69$, $p<0,0001$] et de façon similaire dans les deux groupes [Groupes*Temps, $F(49,882)=1,15$, $p=0,22$] (Figure 36a). Néanmoins, sur l'ensemble de la période, le groupe contrôle EYFP produit plus de comportement d'auto-administration que le groupe ArchT [Effet Groupe, $F(1,18)=5,98$, $p<0,05$]. Cet effet tend à porter spécifiquement sur le trou actif [Groupes*Trou, $F(1,18)=4,12$, $p=0,057$] (Figure 36c-d).

Néanmoins, on peut constater sur les courbes de cinétique d'extinction que le nombre de demandes au trou actif sur les quinze dernières minutes de l'extinction est proche de zéro pour les deux groupes (Figure 36a).

Pendant la phase de réinstallation, on observe une reprise des demandes au trou actif dont l'amplitude est fonction de la dose de cocaïne administrée (Figure 36b). Globalement, sur cette phase, on observe un nombre plus élevé de demandes au trou actif qu'au trou inactif [Effet Trou, $F(1,18)=69,34$, $p<0,0001$]. Pendant cette phase, les deux groupes présentent le même comportement [Effet Groupes, $F(1,18)=3,04$, $p=0,09$] et ce quel que soit le trou considéré [Trous*Groupes, $F(1,18)=0,41$, $p>0,5$].

La stimulation optique au niveau du NAcCore, appliquée 1 minute avant la première injection non-contingente de cocaïne et pendant les deux heures de réinstallation, n'affecte

pas différemment le comportement de réinstallation du groupe ArchT et du groupe contrôle EYFP [Effet Groupes, $F(1,18)=3,05$ $p>0,05$].

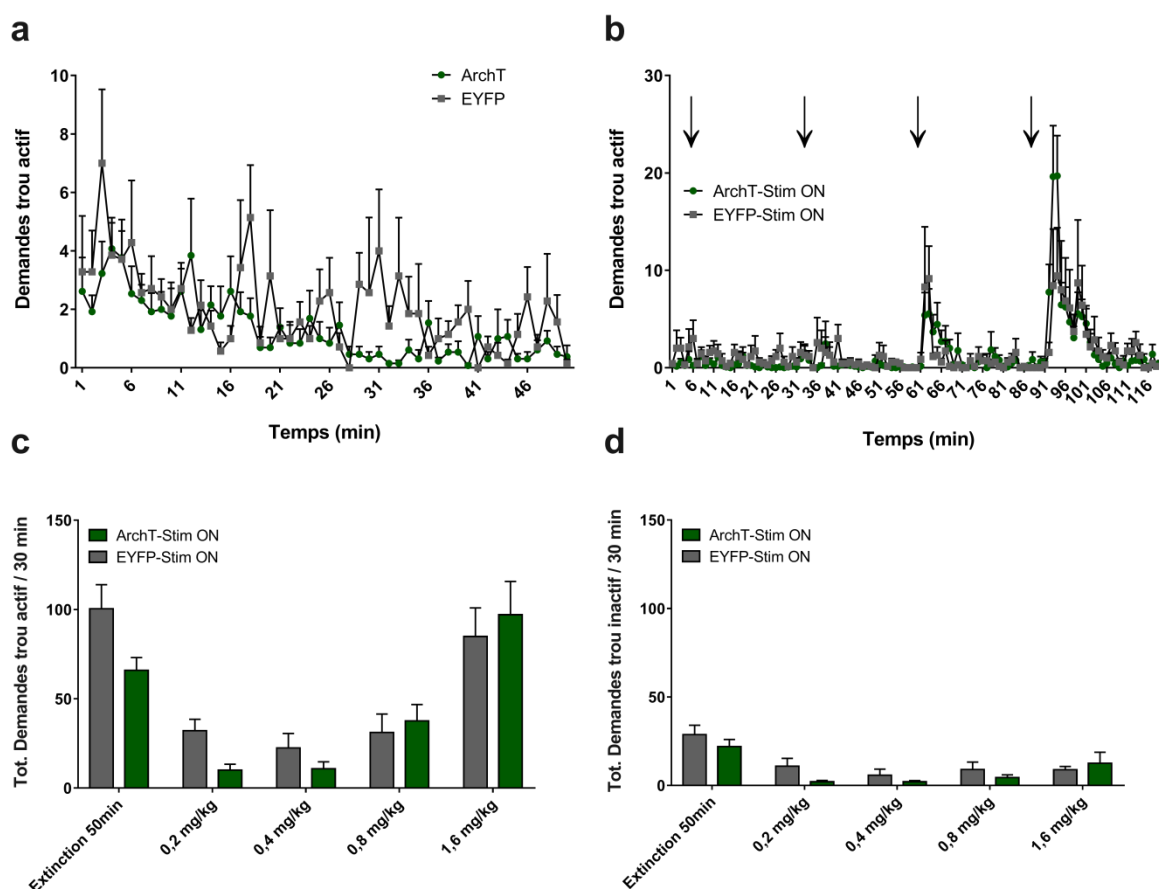


Figure 36 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NACore, par stimulation optique au niveau du NACore, sur la réinstallation du comportement d'auto-administration de cocaïne.

a. Cinétique des demandes au niveau du trou actif pour les groupes ArchT et contrôle EYFP pendant les 50 min d'extinction qui précèdent la phase de réinstallation. b. Cinétique des demandes au niveau du trou actif pendant la période de réinstallation (les flèches représentent les temps où sont administrées les injections non-contingentes de cocaïne). La stimulation optique est appliquée une minute avant la première injection non-contingente de cocaïne et sur toute la période de réinstallation. Les histogrammes c. et d. représentent respectivement le nombre total de demandes au niveau des trous actif et inactif durant les 50 min d'extinction et au cours des 30 min qui suivent les injections.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de la stimulation optique sur la prise et la recherche de drogue. Nous avons comparé le nombre d'injections pendant 1 heure d'auto-administration avec et sans stimulation du NACore. La stimulation optique n'affecte pas le nombre d'injections [Effet Stim, $F(1,18)=0,099$, $p=0,75$] que ce soit chez les rats ArchT ou chez les rats contrôles EYFP [Stim*Groupes, $F(1,18)=0,18$, $p=0,68$] (Figure 37a).

De même, le nombre des demandes au trou actif pendant les 2 min de TO n'est pas affecté par la stimulation optique [Effet Stim, $F(1,18)=1,84$, $p=0,19$] et ce quel que soit le groupe expérimental [Stim*Groupes, $F(1,18)=0,19$, $p=0,66$] (Figure 37b). On note une forte

variabilité individuelle lors de la session de stimulation (Stim On) (Figure 37c). Son impact sur la moyenne est plus important sur le groupe EYFP dont l'effectif est moindre. Cette variabilité pourrait être due à une sensibilité différentielle à la connexion des fibres optiques, bien que les animaux aient été habitués à la connexion et qu'elle n'affecte pas le nombre d'injections.

Au vu de ces résultats, ni l'effet facilitateur ni l'effet inhibiteur du PL observés précédemment lors d'une stimulation optique du PL, ne semblent trouver leur origine dans la voie PL-NACore.

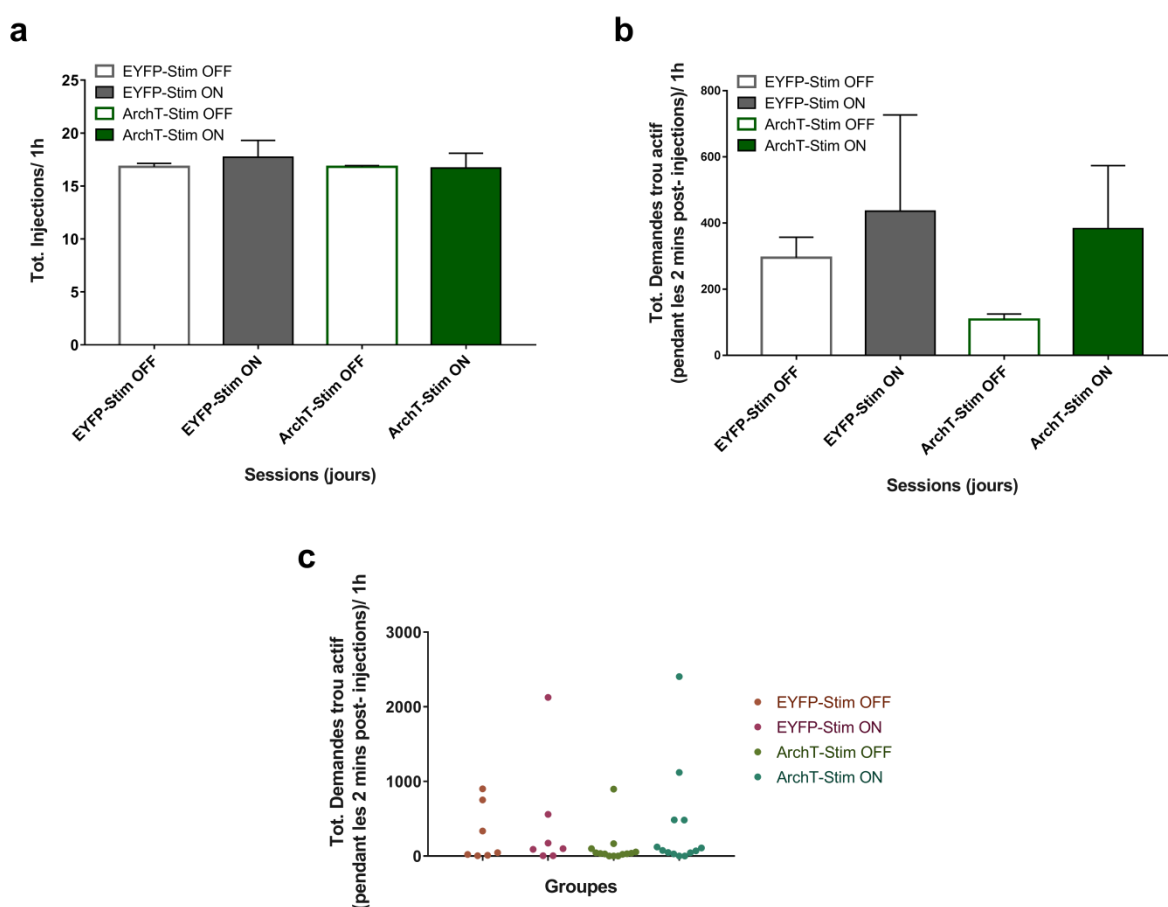


Figure 37 : Effet d'une inhibition optogénétique de la voie PL-NACore, par stimulation au niveau du NACore, sur le comportement d'auto-administration de cocaïne.

a. Nombre total d'injections obtenues pendant 1 h de session de base avec ou sans stimulation, pour les groupes ArchT et contrôle EYFP. b. Nombre total de demandes au trou actif pendant le TO, avec ou sans stimulation, pendant 1 heure de session de base. c. Représentation de la distribution des demandes en TO en fonction des groupes et des conditions (Stim On ou Off).

Données histologiques

A la fin de l'expérience, nous avons vérifié l'efficacité de l'infection au travers de l'expression de la protéine fluorescente. Les observations histologiques ont montré que tous les rats injectés exprimaient la protéine fluorescente et que l'expression était bien localisée au niveau du PL. Nous avons également pu valider les sites d'implantation des fibres optiques au niveau du NAcCore (Figure 38).

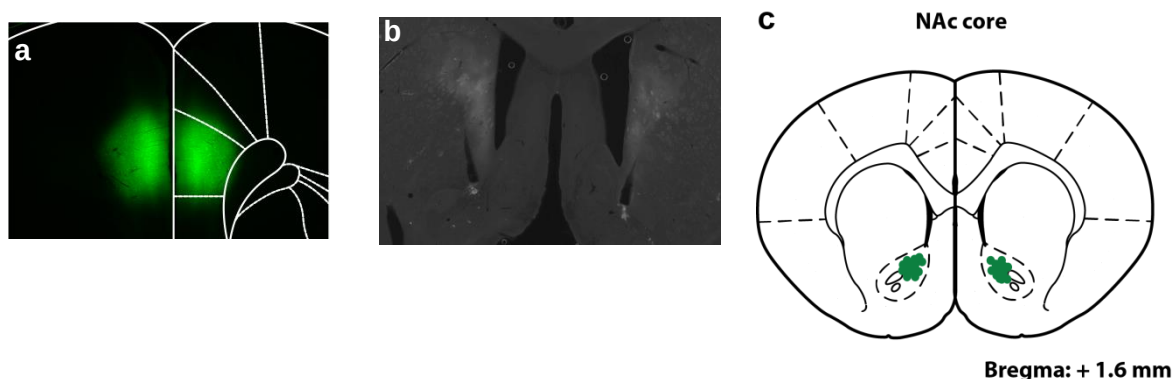


Figure 38 : Contrôles histologiques de l'expression virale, de sa localisation dans le PL et des sites d'implantation des fibres optiques dans le NAcCore (Effet d'une inactivation de la voie PL-NAcCore : ciblage de la voie par une stimulation optique au niveau du NAcCore).

a. Exemple de l'expression de la protéine fluorescente (GFP) au niveau du PL et b. de la localisation des fibres optiques dans le NAcCore. c. Représentation des sites d'implantation des fibres optiques au niveau du NAc. Chaque point représente l'extrémité d'une fibre optique.

2.4. DISCUSSION

Cette approche optogénétique, qui visait à inactiver la voie PL-NAcCore en appliquant une stimulation optique au niveau du NAcCore chez des rats exprimant ArchT dans les neurones du PL, ne reproduit aucun des effets, inhibiteur ou facilitateur, observés avec l'inactivation du PL dans sa globalité dans la première partie de nos travaux (Martín-García *et al*, 2014). Aucun de ces deux types d'effets ne semble donc trouver son origine dans la voie PL-NAcCore, tout au moins quand son implication est questionnée dans les conditions utilisées ici.

Pourtant, par ce même type d'approche, cette voie a été impliquée dans la réinstallation du comportement d'auto-administration par la cocaïne (Stefanik *et al*, 2013). Plusieurs différences expérimentales peuvent être à l'origine des divergences entre nos résultats et ceux de (Stefanik *et al*, 2013). Le protocole expérimental de Stefanik implique 10 jours d'extinction du comportement avant le test de réinstallation, alors que nous utilisons le test de réinstallation plus comme un test des propriétés motivationnelles/incitatrices de la drogue, après une extinction 'aigüe' de 90 min. Chez Stefanik, la contribution de ce nouvel apprentissage, l'extinction, entre en compétition avec le comportement d'auto-administration. La voie PL-NAcCore pourrait jouer un rôle différent dans cette situation de compétition entre les effets 'incitateurs' de la cocaïne et les effets 'inhibiteurs' de l'extinction, sur la réinstallation.

Dans des protocoles impliquant également une dizaine de jours d'extinction du comportement d'auto-administration, (McGlinchey *et al*, 2016) et (Stefanik *et al*, 2016) ont récemment montré que la réinstallation, provoquée par des stimuli contextuels saillants associés à la cocaïne, mettait également en jeu cette voie PL-NAcCore.

Pour ce qui concerne, le contrôle inhibiteur sur le comportement, à notre connaissance il n'y a pas d'étude testant une voie de projection spécifique du PL dans cet effet. Qu'il s'agisse de l'inhibition du comportement par un stimulus aversif inconditionné (Chen *et al*, 2013) ou conditionné (Limpens *et al*, 2015), ou par un stimulus discriminatif (indiquant l'absence de drogue) (Mihindou *et al*, 2013), ces travaux testent l'implication du PL dans sa globalité.

Néanmoins, notre méthode de ciblage de la voie PL-NAcCore, similaire à celle de (Stefanik *et al*, 2013) ne garantit pas un ciblage totalement spécifique de la voie. Même si les fibres optiques localisées dans le NAcCore ne stimulent que des fibres provenant du PL, certaines de ces fibres peuvent être des fibres de passage et projeter sur une autre structure que le NAcCore. Pour écarter cette possibilité et augmenter la spécificité du ciblage, nous avons travaillé à la mise au point d'une stratégie réellement spécifique, qui consiste à exprimer l'opsine ArchT exclusivement dans les neurones du PL qui projettent sur le NAcCore. C'est à la mise au point de ce ciblage spécifique et son application dans une expérience similaire à celle décrite ci-dessus, qu'est dédiée l'expérience suivante décrite dans le paragraphe 3 ci-dessous.

3. INACTIVATION OPTOGENETIQUE DE LA VOIE PL-NAcCore ET AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE : CIBLAGE DE LA VOIE PAR UNE INFECTION VIRALE DOUBLE

Une des limites de l'approche expérimentale précédente, qui consiste à stimuler les zones de projection de neurones infectées par le virus contenant l'opsine est la possible absence de spécificité. Des cellules exprimant l'opsine peuvent projeter du PL vers d'autres structures que le NAcCore, mais en passant à son niveau. La stimulation du NAcCore peut donc toucher des neurones projetant spécifiquement vers le NAcCore et d'autres fibres « en passant ». Par ailleurs, l'illumination des terminaisons axonales peut aussi provoquer une propagation antidromique de potentiels d'action vers le soma, causant des potentiels d'action secondaire hors de la région d'intérêt (Sjulson *et al*, 2016).

C'est pour être plus spécifique et s'affranchir de cette contrainte que nous avons testé une autre approche expérimentale. Le but de cette expérience était de la valider, avec comme référence, l'approche expérimentale de simple infection.

Cette autre approche consiste en l'utilisation d'infections virales combinées. Un adenovirus canin rétrograde (CAV) codant pour la Cre recombinase est injecté au niveau du champ terminal de la voie (ici le NAcCore), alors qu'un AAV codant l'opsine, sous le contrôle du

promoteur CAG-FLEX, est injecté au niveau des corps cellulaires (ici le PL) (Yizhar *et al*, 2011). Dans ces conditions, l'opsine ne peut être exprimée qu'en présence de la recombinaison. Au niveau des cellules exprimant les deux constructions virales, la recombinaison va ré-orienter les séquences inversées entourant l'opsine permettant son expression.

Après les infections virales combinées, nous avons évalué la spécificité de l'expression de l'opsine ArchT, dans la voie PL-NAcCore, en visualisant la protéine fluorescente associée. Au moyen d'enregistrements électrophysiologiques unitaires chez des rats anesthésiés, nous avons testé la capacité d'une stimulation optique à inhiber les neurones PL infectés.

3.1. DETERMINATION DES CONDITIONS POUR UN CIBLAGE OPTOGENETIQUE DE LA VOIE PL-NAcCore : INFECTION VIRALE COMBINEE

3.1.1 Matériels et Méthodes spécifiques

Les virus

Les procédures chirurgicales et le suivi post-opératoire utilisés pour cette expérience sont les mêmes que ceux qui ont été utilisés dans l'expérience précédente. A l'exception des virus utilisés, il s'agissait en effet dans cette expérience de déterminer, dans un premier temps, le délai optimal pour obtenir un taux de recombinaison suffisant suite à l'injection combinée de deux virus : 1. un virus AAV codant pour l'archéorhodopsine (rAAV9/CAG-Flex-ArchT-GFP) sous le contrôle d'un promoteur CAG-Flex dépendant de la Cre-recombinaison injecté au niveau du **PL** aux coordonnées suivantes : AP = + 3,2 ; L = $\pm$ 0,6 par rapport au Bregma ; DV = - 2,6 par rapport à la surface du cerveau. 2. Un virus Cav-Cré concentré, codant pour la cre-recombinaison sous la dépendance d'un promoteur Cav (adénovirus canin) lui conférant la capacité de migrer de façon rétrograde des synapses présentes au niveau du site d'injection jusqu'aux corps cellulaires. Ce virus a été injecté au niveau du **NAcCore** aux coordonnées suivantes AP = + 1,5 ; L = $\pm$ 1,6 par rapport au Bregma ; DV = - 6,9 par rapport à la surface du cerveau. Le virus contrôle est identique dans sa construction à celui qui contient l'opsine mais code uniquement une protéine fluorescente (rAAV5/Flex-GFP).

A titre de comparaison, sur un autre groupe d'animaux, nous avons utilisé le même virus que dans l'expérience précédente (AAV5/CamKII-ArchT-GFP) que nous avons injecté au niveau du **PL** aux mêmes coordonnées que le virus (rAAV9/CAG-Flex-ArchT-GFP). Les deux stratégies virales (simple et double infection) sont décrites dans la Figure 39.

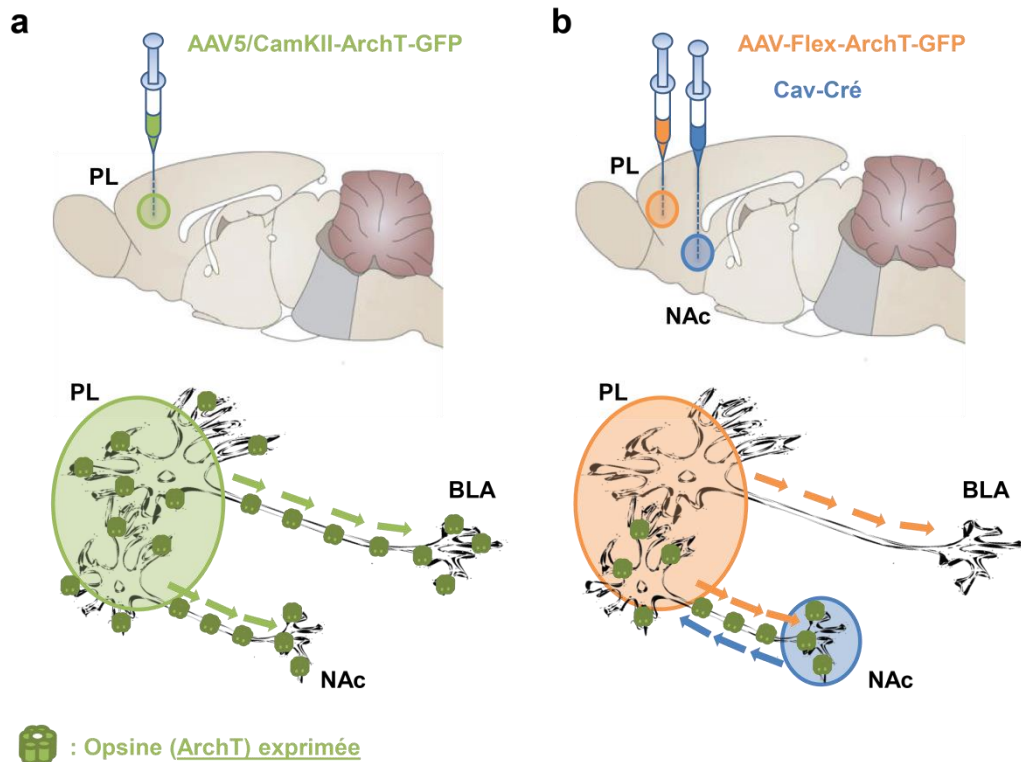


Figure 39 : Comparaison des deux approches virales utilisées pour exprimer l'opsine.

a. Simple infection au niveau du PL avec une construction virale contenant l'archéorodopsine (ArchT) sous le contrôle d'un promoteur CamKIIA. Dans ce cas les neurones du PL sont infectés indépendamment de leur site de projection. b. Infections combinées d'un vecteur contenant l'opsine au niveau du PL sous le contrôle d'un promoteur Cré-dépendant et d'un vecteur codant pour la recombinaise au niveau du NAcCore sous la dépendance d'un promoteur CAV rétrograde, lui conférant la capacité de remonter au niveau des corps cellulaires. Dans ces conditions, seuls les neurones projetant du PL au NAcCore, co-exprimant les deux vecteurs, peuvent exprimer l'opsine.

Caractéristiques de l'optrode

Nous avons utilisé une optrode manufacturée (Neuronexus) d'une largeur maximum de 240 μm et 33 μm minimum à son extrémité. D'une part, elle est constituée d'une microélectrode à faible impédance composée de 32 canaux linéaires, espacés de 50 μm . La surface de chaque site d'enregistrement est de 177 μm^2 . D'autre part elle comprend une fibre optique de 105 μm de diamètre placée du même côté que les sites d'enregistrement, 200 μm au-dessus du premier. La fibre optique est raccordée à un laser (CNI) émettant une lumière verte (526,5 nm ; 200 mW max), piloté par un générateur de signal TLL (Master 9 ; AMPI) (Figure 40).



Figure 40 : Caractéristiques des optrodes.

a. Photo de l'optrode utilisée pour les enregistrements. b. Représentation de la répartition linéaire des sites d'enregistrement.

Mise en place de l'optrode

Après une phase d'induction à 3 % d'isoflurane, les rats sont fixés sur un cadre stéréotaxique (KOPF) placé dans une station de travail (Thor Labs) sur un châssis et une table anti-vibration équipée d'une cage de Faraday. Les procédures pré-opératoires d'antalgie et de désinfection sont les mêmes que celles appliquées lors des injections intracérébrales. Pendant les premières étapes de la chirurgie, le maintien de l'anesthésie est obtenu au masque à un débit de 0,4 l/min (1.2% d'isoflurane). Le rat est rasé au niveau du crâne et la peau est incisée sur 2 cm. Le cuir chevelu est dégagé du crâne. L'utilisation d'un kit de cautérisation (FST) peut être utile pour stopper les micro-saignements plus fréquents lors de la deuxième intervention, en grande partie lié à la présence de tissus cicatriciels très vascularisés qui se développent après la première chirurgie.

Une craniotomie est effectuée avec une mini-perceuse (Dremel, France), ouvrant une fenêtre de travail suffisante pour accéder à la zone d'intérêt ; le PL. La surface du cerveau, alors accessible, est maintenue hydratée pendant tout le reste de l'expérience avec une solution de saline (Cooper, France) et des éponges hémostatiques résorbables en gélatine (Gelita-spon). La dure-mère est ouverte au niveau du site de descente de l'optrode à l'aide d'une seringue de 30 Gauge courbée à l'extrémité. Après avoir été désinfectée avec une solution d'alcool (70%), puis rincée avec une solution de saline, l'optrode est fixée avec soin sur le micro-manipulateur. Il s'agit d'un système à mobilité XYZ équipé d'une colonne de marque Linus-Neumann, précise au micromètre, associée à un joystick de commande de la même marque (modèle SM7). Les deux électrodes de référence ont été positionnées au niveau des muscles de la peau du crâne et l'ensemble a été relié à la terre pour diminuer le bruit.

La descente, effectuée sous microscope (Olympus) peut alors commencer à partir de la surface du cerveau en s'assurant qu'il n'y ait pas de résistance. A partir de cette étape, le débit au masque est maintenu à 0,4 l/min ; mais le pourcentage d'isoflurane est amené à des valeurs comprises entre 0,5 et 0,9 % (avec une observation régulière accrue de tous les signes qui pourraient indiquer que l'anesthésie n'est pas suffisante) (Figure 41).

C'est à partir de la zone d'intérêt (AP = + 3,2 ; L = $\pm$ 0,6 par rapport au Bregma) la plus dorsale (DV = 1,8) que nous avons commencé la descente de l'optrode par palier de 15 μ m jusqu'à la zone la plus ventrale (DV = 3,8). A chaque niveau, nous avons laissé l'électrode en place entre 2 et 5 min avant de tester si nous avions une activité électrique. Lorsque c'était le cas, nous avons testé l'efficacité de la stimulation.

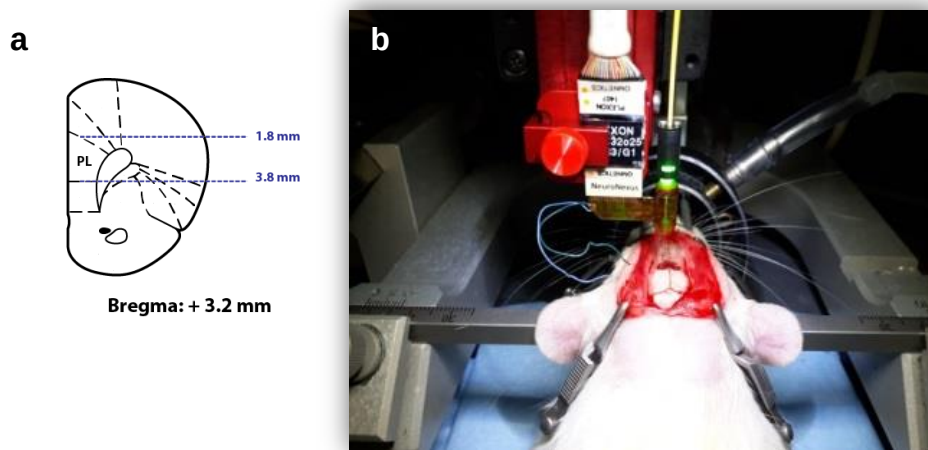


Figure 41 : Mise en place de l'optrode pour la stimulation optique et l'enregistrement électrophysiologique.

a. Représentation de la zone d'intérêt ciblée ; AP = + 3,2 ; L = $\pm$ 0,6 par rapport au Bregma, DV = de 1,8 à 3,8 par rapport à la surface du cerveau. b. Photo d'un rat pendant l'enregistrement et la stimulation optogénétique (1 Hz).

3.1.2. Protocole

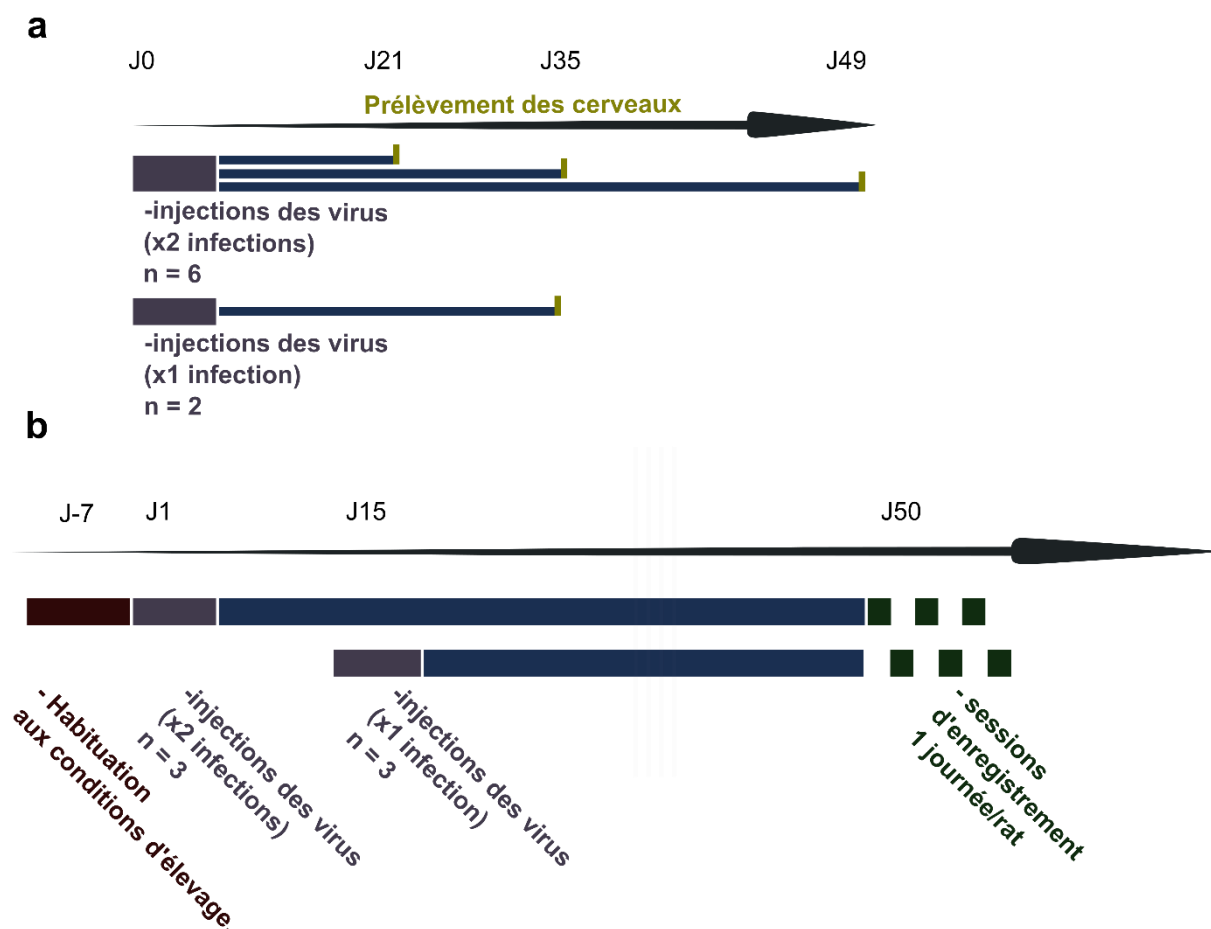


Figure 42 : Protocole expérimental pour la « détermination des conditions pour un ciblage optogénétique de la voie PL-NAcCore : infection virale combinée ».

a. protocole appliqué pour contrôler le niveau d'expression de la protéine fluorescente en fonction du temps après l'infection b. protocole utilisé pour déterminer l'efficacité d'une stimulation optogénétique du PL sur l'activité électrique suite à une simple infection ou une infection combinée.

3.1.3. Résultats

Données histologiques

Dans un premier temps nous avons évalué l'efficacité de la recombinaison. Pour cela, nous avons effectué une infection combinée sur 6 rats, qui ont été sacrifiés deux par deux après 3, 5 ou 7 semaines. Deux rats supplémentaires ont reçu une infection simple et ont été sacrifiés 5 semaines après. Comme cela a été montré chez le rat et la souris précédemment, l'expression virale suite à une simple infection de virus est massive, 5 semaines seulement après l'injection virale. Dans le cas des infections combinées l'expression virale est faible après 3 semaines. La recombinaison, nécessaire pour que la protéine fluorescente, et donc l'opsine, s'exprime, peut expliquer ce délai. Mais l'expression augmente rapidement après 5 semaines, pour atteindre un niveau comparable à la simple infection après 7 semaines. C'est

ce délai minimum que nous avons respecté entre l'injection de virus et la première stimulation (Figure 43).

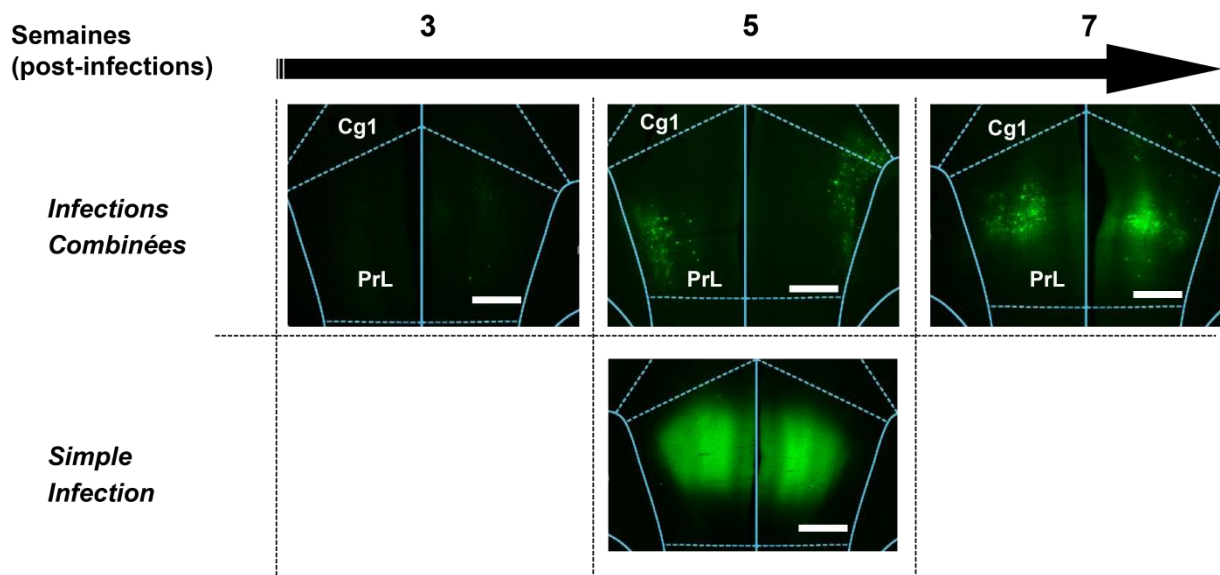


Figure 43 : Expression de la protéine fluorescente en fonction du temps après une infection virale combinée.
L'expression de la protéine fluorescente observée dans le cas de la simple infection (bas) au bout de 5 semaines sert de référence. Echelle = 500 μm.

Données électrophysiologiques

C'est également ces délais de 5 et 7 semaines post-injection virale que nous avons respectés lorsque nous avons évalué l'efficacité de cette approche chez l'animal anesthésié au moyen d'enregistrements des activités unitaires au niveau du PL chez des rats simplement ou doublement infectés.

La stimulation optogénétique appliquée au niveau du PL peut supprimer l'activité neuronale des neurones enregistrés, et ce quelle que soit l'approche expérimentale utilisée (Figure 44 et Figure 45). Il est donc possible d'inhiber des neurones exprimant l'opsine (ArchT) à la suite d'une infection combinée via une stimulation optogénétique. On doit tout de même noter qu'il existe un délai entre le début de la stimulation et l'inhibition de l'activité électrique des neurones chez les rats doublement infectés. Pour expliquer cette latence de 40 ms, on peut proposer que les neurones stimulés ne sont pas les neurones qui sont enregistrés. L'inhibition observée dans ce cas serait indirecte (Figure 45).

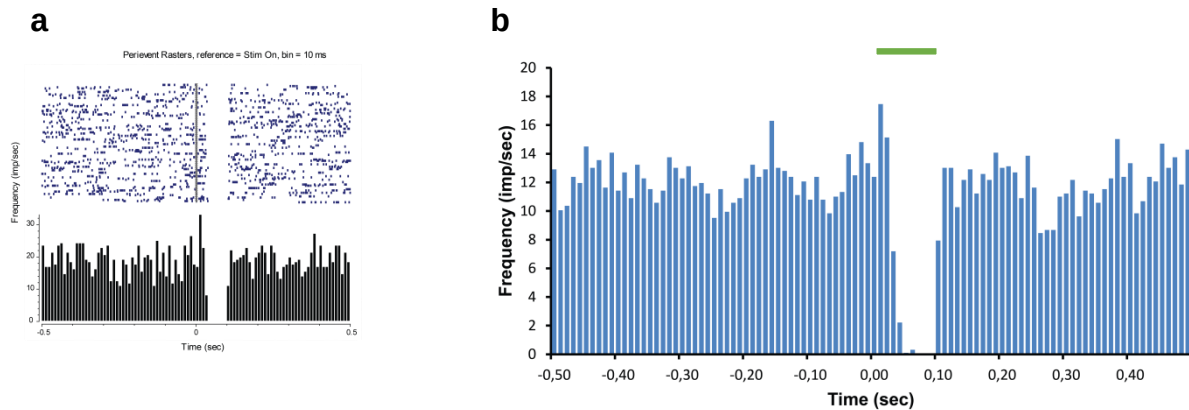


Figure 44 : Effet d’une manipulation optogénétique sur la fréquence de décharges des neurones du PL chez des rats exprimant l’opsine (ArchT) suite à une double infection virale.

a. exemple d’inhibition d’un neurone du PL pendant les 100 ms de la stimulation (en vert) chez un rat doublement infecté. b. Représentation de la fréquence de décharge moyenne de plusieurs neurones chez ce même rat pendant l’inhibition (n= 6).

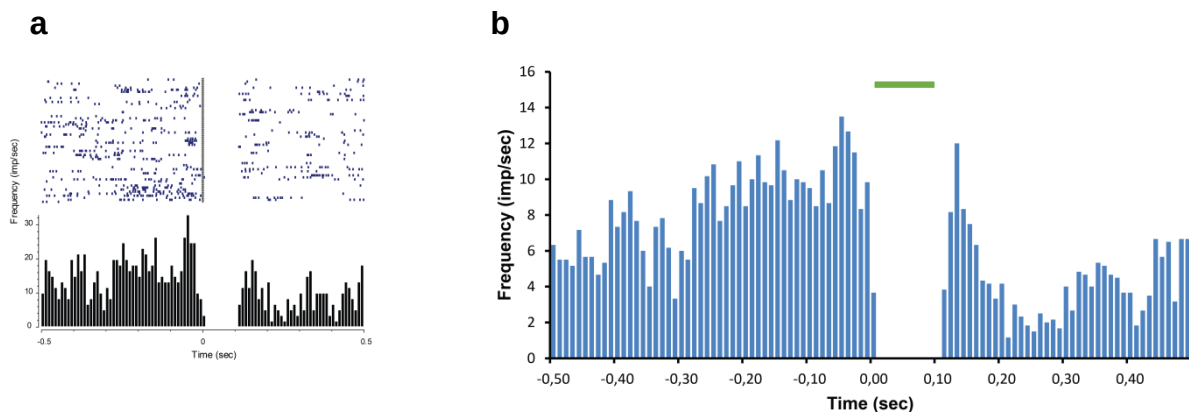


Figure 45 : Effet d’une stimulation optogénétique sur la fréquence de décharges des neurones du PL chez des rats exprimant l’opsine (ArchT) suite à une simple infection virale.

a. exemple d’inhibition d’un neurone du PL pendant les 100 ms de la stimulation (en vert). b. Représentation de la fréquence de décharge moyenne de plusieurs neurones chez ce même rat pendant l’inhibition (n= 10).

3.1.4. Conclusions

Les exemples d’infections virales combinées chez le rat sont rares (Gradinaru *et al*, 2010). A notre connaissance, une seule étude montre un exemple fonctionnel, chez des rats Long-Evans, dans des neurones projetant du cortex moteur primaire au cortex sensoriel primaire et dans des neurones projetant d’un gyrus denté à l’autre (Zalocusky and Deisseroth, 2013). Les quelques autres exemples concernent des études chez des souris sauvages, et sont, soit appliquée au niveau d’une unique structure cérébrale (Gompf *et al*, 2015), soit limitée à l’étude de l’expression virale (Gore *et al*, 2013).

3.2. INACTIVATION OPTOGENETIQUE DA LA VOIE PL-NAcCore ET AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE : CIBLAGE DE LA VOIE PAR UNE INFECTION VIRALE DOUBLE

3.2.1 Matériels et Méthodes spécifiques

Les procédures chirurgicales et le suivi post-opératoire utilisés pour cette expérience sont les mêmes que ceux qui ont été utilisés pour l'expérience précédente. Le virus rAAV9/CAG-Flex-ArchT-GFP codant pour l'archeorhodopsine, ou le virus contrôle rAAV5/Flex-GFP codant uniquement pour la GFP ont été injectés au niveau du **PL** aux coordonnées suivantes AP = + 3,2 ; L = $\pm$ 0,6 par rapport au Bregma ; DV = - 2,6.

Le virus Cav-Cré rétrograde a été injecté au niveau du **NAcCore** aux coordonnées suivantes AP = + 1,5 ; L = $\pm$ 1,6 par rapport au Bregma ; DV = - 6,9 par rapport à la surface du cerveau.

Implantation des fibres optiques :

Dans ce cas les fibres, aux caractéristiques identiques à l'expérience de simple infection, hormis la longueur, ont été implantées au niveau du **PL** aux coordonnées suivantes : AP = 3,2 ; L = $\pm$ 1,25 avec un angle de 15°, DV = - 2,3 par rapport à la surface du cerveau (MFC_200/245-0.37_4mm_RM3-E_FLT, Doric Lenses, Québec).

3.2.2. Protocole

Pour cette expérience, 31 rats ont été opérés, 15 ont reçu une injection bilatérale combinée du virus CavCré au niveau du NAcCore et du virus contrôle dans le PL, exprimant la protéine fluorescente GFP après recombinaison. Les 16 autres rats ont été eux aussi doublement infectés, mais avec le vecteur permettant d'exprimer l'opsine (ArchT) au niveau des neurones doublement infectés suite à la recombinaison. La semaine suivante, tous les rats ont été cathétérisés et des fibres optiques ont été implantées dans les deux hémisphères au niveau du PL. Après 3 jours de repos post-opératoire, les rats ont commencé l'auto-administration de cocaïne. Le protocole appliqué lors de cette expérience était strictement identique à celui qui a été utilisé pour l'expérience de simple infection. Après une période d'acquisition classique, les rats ont été soumis à une stimulation optogénétique lors d'un test de réinstallation et au cours d'une session de base, respectivement les 23^{ième} et 28^{ième} jours après le début de l'auto-administration (Figure 46).

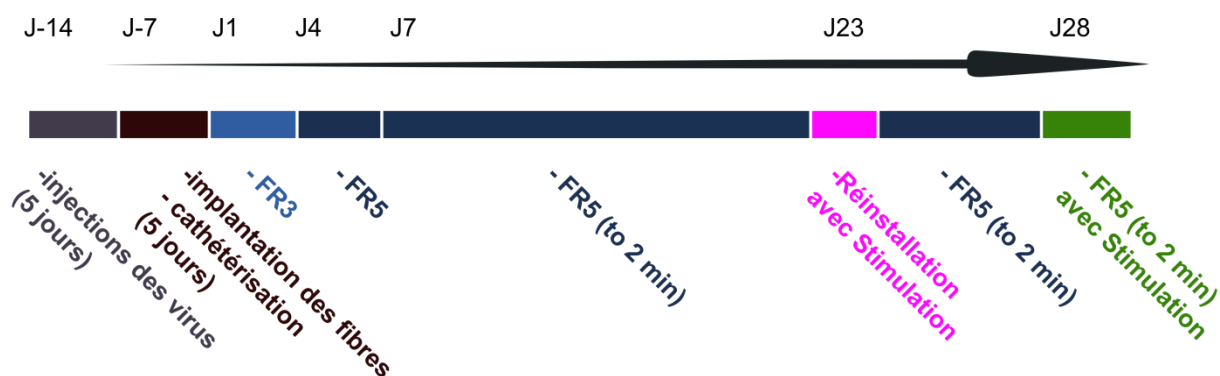


Figure 46 : Protocole expérimental de l'expérience « Inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore et auto-administration de cocaïne : ciblage de la voie par une infection virale double ».

3.2.3. Résultats

A la fin de l'expérience, nous avons vérifié l'efficacité de l'infection au travers de l'expression de la protéine fluorescente. Les observations histologiques ont montré que tous les rats injectés exprimaient la protéine fluorescente et que l'expression était bien localisée au niveau du PL. Nous avons également pu valider les sites d'implantation des fibres optiques au niveau du PL.

Données comportementales

Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne par les rats ArchT et GFP

Le nombre d'injections par session augmente progressivement de J1 à J7 [Effet Temps, $F(6,174)=4,21$, $p<0,001$] et cette augmentation est identique entre le groupe contrôle et le groupe ArchT [Effet Groupe, $F(1,29)=0,05$, $p=0,81$] et se stabilise au 7^{ième} jour. La discrimination entre les trous actif et inactif intervient elle aussi rapidement et est significative sur les sessions J1 à J22 [Effet trou, $F(1,29)=13,36$, $p<0,005$] et elle est comparable dans les deux groupes expérimentaux sur l'ensemble de la période [Trou*Groupes, $F(21,609)=0,54$, $p=0,95$] mais aussi dans sa cinétique [Trou*Groupe*Temps, $F(21,609)=0,78$, $p=0,73$] (Figure 47).

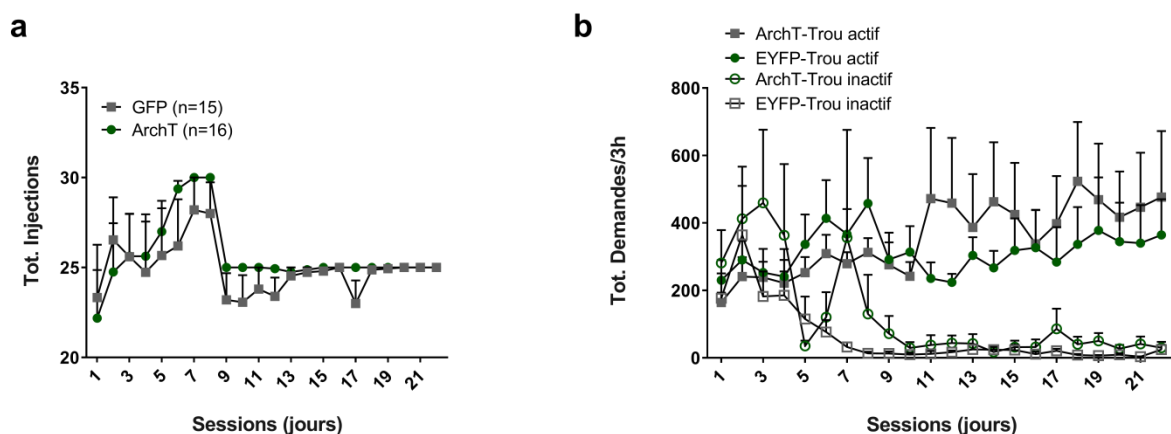


Figure 47 : Acquisition et maintien du comportement d'auto-administration de cocaïne chez les rats ArchT et contrôle GFP.

a. Prise de cocaïne mesurée au travers du nombre moyen d'injections obtenues par session pour le groupe ArchT et le groupe contrôle. b. Moyenne par session du nombre de demandes aux trous actif et inactif.

Effet d'une inactivation de la voie PL-NACore sur le comportement d'auto-administration de cocaïne et sa réinstallation après extinction : ciblage de la voie par une double infection virale

Pendant la phase d'extinction, les deux groupes expérimentaux montrent une discrimination significative entre trous actif et inactif [Effet Trou, $F(1,29)=0,22$, $p<0,0001$] (Figure 48Figure 36c-d), mais les réponses dans le trou actif diminuent de façon significative au cours des 50 min d'extinction [Effet Temps, $F(49,1421)=5,34$, $p<0,00001$] et de façon similaire dans les deux groupes [Groupes*Temps, $F(49,1421)=0,71$, $p=0,92$] (Figure 36a) et les deux groupes expérimentaux se comportent de façon similaire [Effet Groupe, $F(1,29)=0,64$, $p=0,43$] (Figure 48c-d).

Pendant la phase de réinstallation, on observe une reprise des demandes au trou actif dont l'amplitude est fonction de la dose de cocaïne administrée (Figure 48b). Globalement, sur cette phase, on observe un nombre plus élevé de demandes au trou actif qu'au trou inactif [Effet Trou, $F(1,29)=45,5$, $p<0,0001$]. Pendant cette phase, les deux groupes présentent le même comportement [Effet Groupes, $F(1,29)=1,22$, $p=0,27$] et ce quel que soit le trou considéré [Trou*Groupes, $F(1,29)=0,006$, $p=0,93$].

La stimulation optique au niveau du PL, appliquée 1 minute avant la première injection non-contingente de cocaïne et pendant les deux heures de réinstallation, n'affecte pas différemment la réinstallation du groupe ArchT et du groupe contrôle GFP le comportement de réinstallation [Effet Groupe, $F(1,29)=1,33$, $p=0,25$]. Ces résultats sont comparables aux résultats que nous avons obtenus avec l'approche expérimentale de simple infection.

L'inhibition spécifique de la voie PL-NACore ne semble pas affecter le comportement de réinstallation.

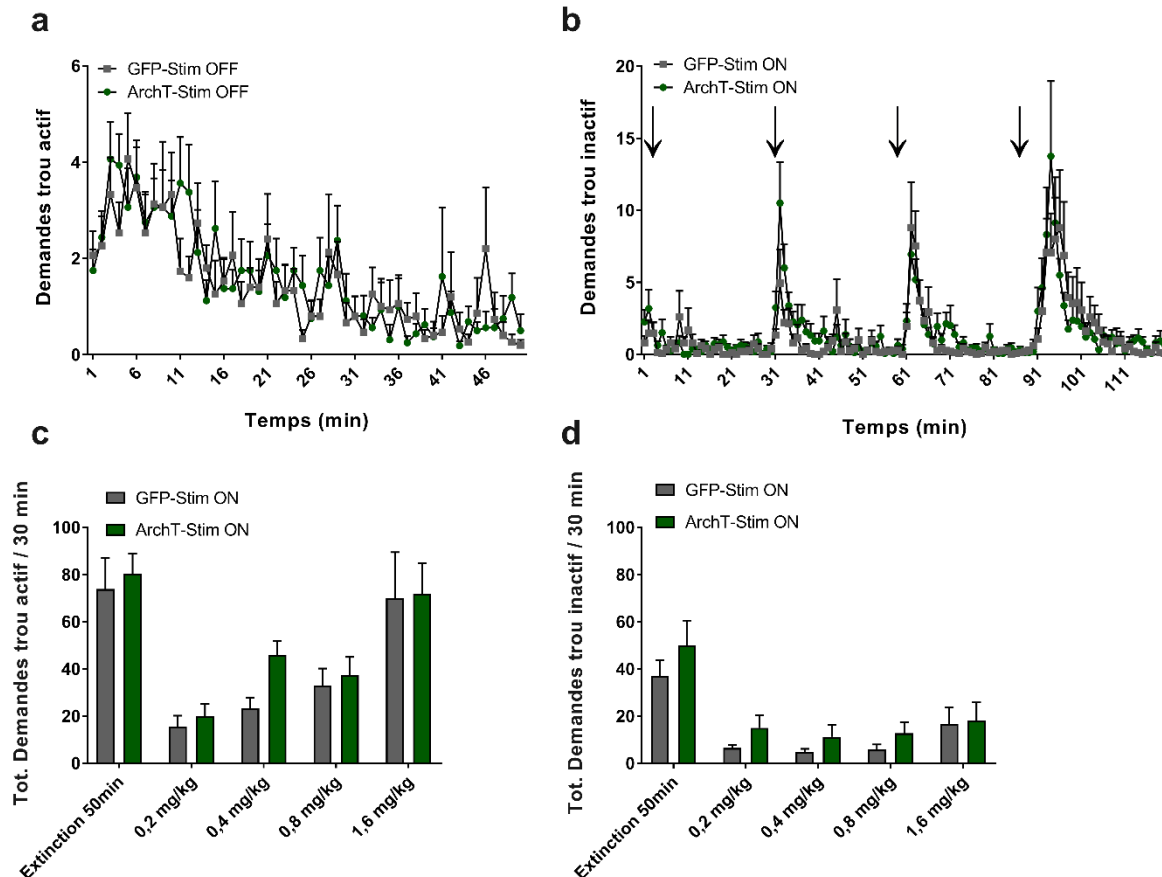


Figure 48 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NACore, au moyen d'une double infection virale, sur la réinstallation du comportement d'auto-administration de cocaïne.

a. Cinétique des demandes au trou actif des groupes ArchT et contrôle pendant les 50 min d'extinction. b. Cinétique des demandes au trou actif pendant la période de réinstallation (les flèches représentent les temps où sont administrées les injections non-contingentes de cocaïne). Les histogrammes c. et d. représentent respectivement le nombre total de demandes au niveau des trous actif et inactif durant les 50min d'extinction et au cours des 30 min qui suivent les injections. La stimulation optique est appliquée une minute avant la première injection non-contingente de cocaïne et sur toute la période de réinstallation. Les histogrammes c. et d. représentent respectivement le nombre total de demandes au niveau des trous actif et inactif durant les 50 min d'extinction et au cours des 30 min qui suivent les injections.

Comme pour l'expérience de simple infection, nous avons étudié les effets de la stimulation optique sur la prise et la recherche de drogue. Nous avons comparé le nombre d'injections pendant 1 heure d'auto-administration avec et sans stimulation du PL. La stimulation optique n'affecte pas le nombre d'injections [Effet Stim, $F(1,29)=0,49$, $p=0,48$] que ce soit chez les rats ArchT ou chez les rats contrôles EYFP [Stim*Groupes, $F(1,29)=0,37$, $p=0,54$] (Figure 49Figure 37a).

De même, le nombre des demandes au trou actif pendant les 2 min de TO n'est pas affecté par la stimulation optique [Effet Stim, $F(1,29)=0,044$, $p=0,83$] et ce quel que soit le groupe expérimental [Stim*Groupes, $F(1,29)=1,16$, $p=0,28$] (Figure 49Figure 37b). On note une forte

variabilité individuelle lors de la session de stimulation (Stim On) (Figure 49c). Comme pour l'expérience de simple infection, cette variabilité pourrait être due à une sensibilité différentielle à la connexion des fibres optiques, bien que les animaux aient été habitués à la connexion et qu'elle n'affecte pas le nombre d'injections.

Au vu de ces résultats, ni l'effet facilitateur ni l'effet inhibiteur du PL (Martín-García *et al*, 2014), observés précédemment, ne semblent trouver leur origine dans la voie PL-NAcCore.

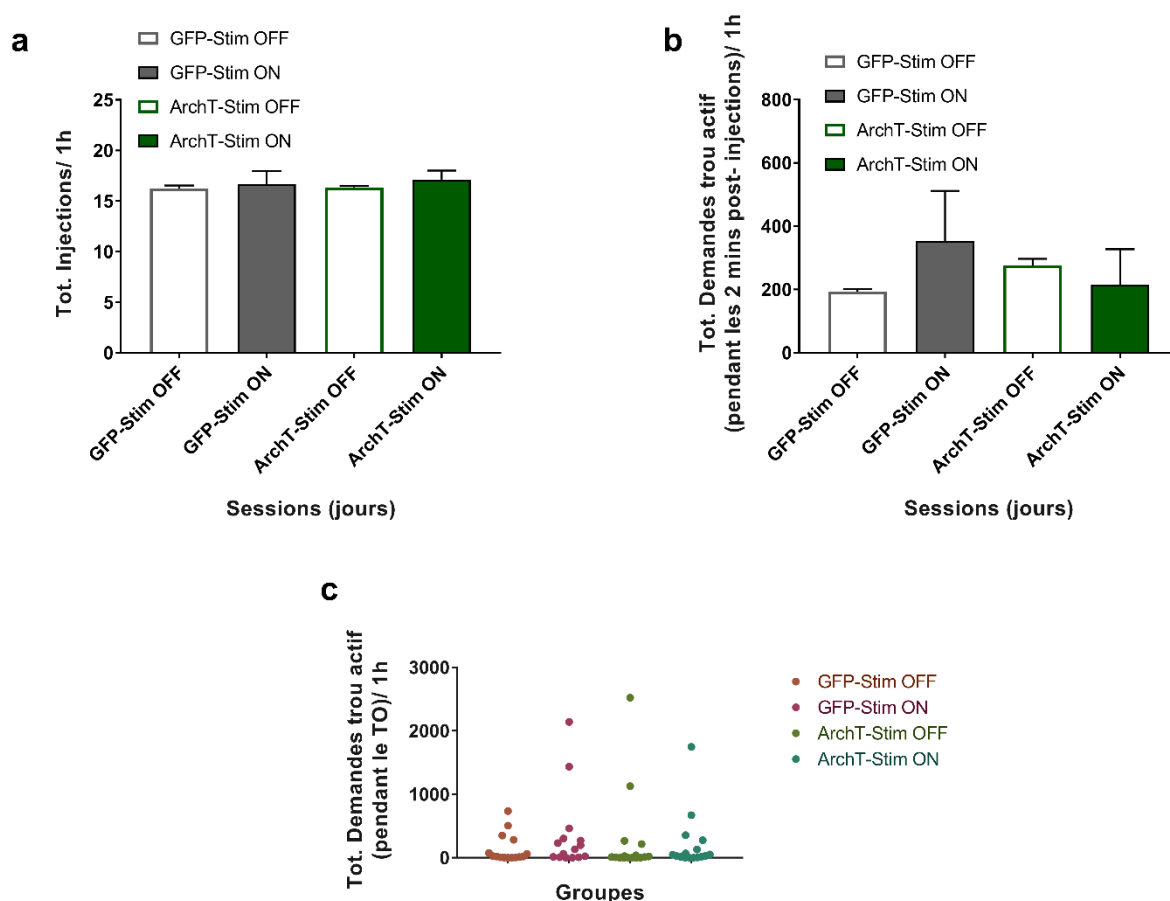


Figure 49 : Effet d'une inactivation optogénétique de la voie PL-NAcCore, au moyen d'une double infection virale, sur le comportement d'auto-administration.

a. Nombre total d'injections obtenues pendant 1 h de session de base avec ou sans stimulation, pour les groupes ArchT et contrôle GFP. b. Nombre total de demandes au trou actif pendant le TO, avec ou stimulation, pendant 1 heure de session de base. c. Représentation de la distribution des demandes individuelles en fonction des groupes et des conditions expérimentales.

Données histologiques

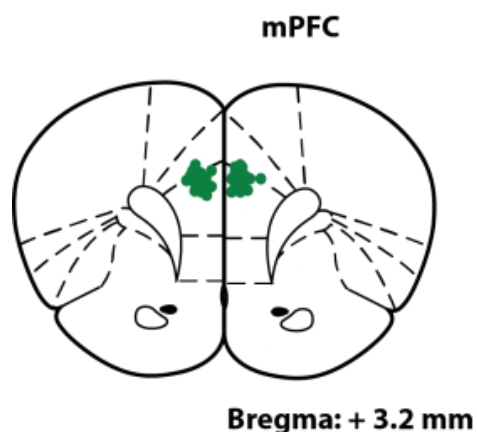


Figure 50 : Représentation des sites d'implantation des fibres optiques au niveau du PL.

Chaque point représente l'extrémité d'une fibre optique.

3.2.4. Discussion

Au vu des résultats produits par cette approche qui visait à inactiver très spécifiquement la voie PL-NAcCore, ni l'effet facilitateur ni l'effet inhibiteur du PL, observés précédemment (Martín-García *et al*, 2014), ne semblent trouver leur origine dans cette voie, tout au moins quand son implication est questionnée avec les outils utilisés ici. En effet comme nous l'avons indiqué précédemment d'autres travaux (Stefanik *et al*, 2013) ont mis en évidence une implication de la voie PL-NAcCore dans la réinstallation du comportement d'auto-administration par la cocaïne. Mais ces résultats ont été obtenus dans des conditions expérimentales qui ne sont pas comparables, ce qui pourrait justifier que nos résultats soient différents. Une autre explication pourrait être liée à l'approche expérimentale utilisée. En effet bien que les données obtenues sur animal anesthésié confirment l'efficacité de cette approche ; c'est à dire l'expression de l'opsine au travers de l'expression de la protéine fluorescente associée, mais également l'efficacité d'une inhibition grâce à une stimulation optogénétique des neurones exprimant l'opsine, l'absence d'effet comportemental observé pourrait être lié au nombre de neurones exprimant l'opsine. En utilisant cette approche et dans nos conditions le nombre de neurones concernés est peut-être trop faible pour que l'inhibition optogénétique appliquée soit efficace. Pour vérifier cette hypothèse nous souhaitons effectuer des contrôles complémentaires notamment en couplant les stimulations optogénétiques à des enregistrements des activités unitaires au niveau du NAcCore et du PL.

C. CHAPITRE 2 : CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Enjeux techniques

Un enjeu de ce second chapitre était le développement et la mise en œuvre de l'optogénétique chez le rat.

Nous avons travaillé sur trois techniques différentes. La première technique conduit à une inactivation ou une activation globale de la structure ciblée. Ainsi, nous avons manipulé le PL globalement. Nous l'avons inhibé, chez des rats injectés avec une construction virale exprimant ArchT, et activé chez des rats injectés avec une construction virale exprimant la channelrhodopsine (Martín-García *et al*, 2014).

Les autres techniques cherchaient à cibler spécifiquement une voie de projection du PL, pour l'inhiber. Si techniquement, on observe bien une expression virale et une inhibition des neurones lors d'enregistrements électrophysiologiques sur animal anesthésié, nous n'observons pas d'effet sur le comportement dans des expériences similaires à celle montrant des effets de l'inhibition globale du PL. L'absence oblige à questionner la fiabilité de la technique, dans les conditions que nous avons appliquées. Notamment, la quantité de neurones infectés, avec ces approches ciblées, est-elle suffisante pour obtenir un effet comportemental ? Les conditions de stimulation qui doivent être appliquées dépendent-elles de la voie ciblée ?

Enjeux conceptuels

Un enjeu majeur est de mieux comprendre le rôle controversé du mPFC, et en particulier du PL, dans le contrôle du comportement d'auto-administration de cocaïne.

Nous montrons pour la première fois, que le PL peut jouer un rôle facilitateur et inhibiteur sur la recherche de cocaïne, et ceci chez les mêmes animaux, selon les contingences expérimentales. L'inhibition optique globale du PL provoque une baisse des propriétés motivationnelles/incitatrices de la cocaïne dans un test de réinstallation et une augmentation de la recherche de cocaïne pendant l'auto-administration elle-même.

Nous proposons que le PL prend en compte les contingences expérimentales, et notamment les stimuli discriminatifs et conditionnés, pour sélectionner le comportement pertinent : produire une recherche de drogue sous l'effet d'une petite dose du stimulus (la drogue) auquel le comportement donne accès, ne pas produire de comportement pendant les périodes (time-out) connues pour ne pas y donner accès.

Limites et Perspectives

La caractérisation de la voie, ou des voies, de projection du PL, impliquées dans les effets opposés décrits ci-dessus, est un objectif que nous souhaitons poursuivre. Même si des

hypothèses émergent, les connaissances sur le rôle du PL dans le contrôle de la prise de cocaïne sont encore très limitées (Jasinska *et al*, 2015).

Dans une première étape, il paraît important d'établir des corrélats électrophysiologiques des deux comportements observés (réinstallation du comportement pas la cocaïne et réponses pendant le time-out en auto-administration) afin de pouvoir cibler les sites et conditions des manipulations optogénétiques.

Par la suite, l'enjeu est de comprendre comment ce rôle dual du PL évolue avec l'usage chronique de cocaïne et selon que l'individu devient *addict* ou pas.

Conclusion Générale

Le cerveau est un organe constitué de très nombreuses structures, définies par leur spécificité cellulaire et moléculaire, par leur contribution à tel ou tel processus physiologique ou comportement. Ces structures sont aussi caractérisées par les liens plastiques qu'elles établissent, avec de nombreuses autres structures, pour assurer ces fonctions. Depuis quelques années, la neuroimagerie chez l'homme et des approches précliniques plus invasives, placent cette connectivité au cœur de la neuropsychiatrie.

La conception de cette connectivité fonctionnelle évolue rapidement, avec la notion, non plus de structures cérébrales, mais d'assemblées neuronales recrutées dans un contexte et une tâche donnés (Cruz et al, 2013; Warren et al, 2017) et l'hypothèse que la synchronisation des activités oscillatoires des neurones, localement et à distance, constitue un élément fondamental de cette connectivité et de la communication neuronale (O'Neill et al, 2017; Schnitzler and Gross, 2005).

Le raffinement permanent des techniques d'exploration de cette connectivité, en particulier chez l'animal, mais aussi chez l'homme, doit permettre d'approcher les mécanismes de la pathologie neuropsychiatrique et de l'addiction à la cocaïne, en particulier. Parce qu'elles sont peu invasives, les techniques de neuroimagerie peuvent être communes aux deux espèces, et établir un pont translationnel fondamental (Nicolas *et al*, 2017), que compléteront ensuite des techniques plus invasives chez l'animal, comme l'électrophysiologie multi-site, pour l'étude fine des circuits identifiés.

Néanmoins, ces techniques et leur raffinement n'auront d'utilité, que si elles sont appliquées dans des conditions expérimentales ou sur des modèles pertinents. Tant chez l'homme que chez l'animal, la recherche fait encore face à l'enjeu majeur que nous avons évoqué dans l'introduction de ce travail de thèse : la nature de ce qui est étudié, et ce à deux niveaux.

Chez l'homme, l'hétérogénéité des sujets (usagers ou avec des niveaux plus ou moins sévères de CUD) et les méthodes d'étude qui consistent majoritairement à comparer des individus sains à des sujets ayant consommé de la cocaïne, ne permettent pas d'identifier de façon fiable des altérations spécifiques de l'addiction. Bien que des avancées majeures aient été produites en termes de validité de ressemblance depuis la fin des années 1990, le même type de questionnement se pose pour les modèles animaux. Que mesure-t-on et en quoi cela rend-t-il compte de la pathologie ?

RESULTATS OBTENUS AU COURS DES TRAVAUX DE THESE

Au cours de ces travaux de thèse nous avons deux objectifs. Le premier objectif visait à comparer des rats *addicts* et des rats *non-addicts* à la cocaïne, pour des marqueurs de connectivité fonctionnelle. Pour cela nous avons couplé notre modèle multi-symptomatique

d'addiction à l'électrophysiologie multi-site sur l'animal se comportant. Nous nous sommes focalisés sur quatre structures cérébrales, mPFC, NAc, BLA et HPc. Elles font partie de circuits indépendants, mais interconnectés, qui participent aux processus motivationnels et d'inhibition comportementale qui sont affectés dans l'addiction à la cocaïne.

Cette approche nous a conduits à établir les conditions pour l'enregistrement, en temps réel, d'activités unitaires et de potentiels de champ, dans quatre structures cérébrales, chez des animaux s'auto-administrant de la cocaïne, dans des cages de comportement opérant.

L'ensemble des données obtenues suggère qu'il existe une baisse de connectivité fonctionnelle chez les rats *addicts*. L'étude des oscillations thêta est concordante. En effet on observe une baisse significative de ces oscillations au niveau du mPFC, du NAc et de la BLA. Cette baisse chez les rats *addicts* pourrait être à l'origine de la baisse de connectivité observée, puisque les oscillations thêta sont décrites comme jouant un rôle fondamental dans la synchronisation des activités neuronales (Chan *et al*, 2017). Ces oscillations trouveraient leur origine dans les interactions cellules/cellules et plus particulièrement les jonctions communicantes (Konopacki *et al*, 2014). Ces structures membranaires participent au recrutement des cellules au sein d'un réseau, à leur synchronisation et au remodelage du réseau. Une modification de l'expression de ces protéines qui constituent les jonctions lacunaires a été mise en évidence au niveau du PFC chez le rats suite à une consommation prolongée de cocaïne (McCracken *et al*, 2005). Ces modifications tout comme les diminutions de plasticité observées chez des rats *addicts* (Kasanetz *et al*, 2010, 2013), pourraient être impliquées dans l'expression de l'addiction. Nous avons donc décidé d'étudier le rôle de ce marqueur de l'addiction, après une plus courte période d'exposition à la cocaïne. Dans ces conditions, la perturbation des oscillations thêta induite par une injection intra-septale de muscimol était combinée à une baisse de la cohérence entre le PL et l'HPc et ces modifications étaient associées, non pas à une augmentation, mais à une baisse de la prise de cocaïne. Des différences dans la durée d'exposition à la cocaïne ainsi que dans la nature des structures affectées par les modifications des oscillations thêta, pourraient être à l'origine de ce contrôle apparemment opposé. Néanmoins, l'ensemble des données suggère que les oscillations thêta interviennent dans le comportement d'auto-administration, et qu'elles pourraient intervenir de façon différente à court et long terme, et selon que l'individu développe, ou pas, une addiction.

Ces modifications de connectivité, entre des structures cérébrales qui jouent un rôle clé dans des circuits impliqués dans l'addiction à la cocaïne, pourraient être à l'origine des dysfonctionnements motivationnels et inhibiteurs observés chez les rats *addicts*.

Le deuxième objectif de cette thèse visait à développer et à mettre en œuvre l'optogénétique chez le rat, pour étudier, plus particulièrement, le rôle du PL dans le comportement d'auto-administration de cocaïne. En effet, des données montraient que le PL favorisait la recherche de cocaïne lors de test de réinstallation après extinction (Peters *et al*, 2008), d'autres suggéraient qu'il était impliqué dans l'inhibition de la recherche de drogue (Chen *et al*, 2013). Nous voulions évaluer l'hypothèse d'un effet opposé du PL ; parfois facilitateur, parfois inhibiteur en fonction des contingences expérimentales. Nous avons donc étudié son implication après une courte période d'exposition à la drogue, dans la régulation du comportement d'auto-administration. Après avoir développé, notamment le couplage de l'optogénétique à l'auto-administration, nous avons étudié les effets motivationnels de la cocaïne et le contrôle sur la prise de drogue, respectivement au cours d'un test de réinstallation par la cocaïne et d'une session de base. Chez des rats qui présentent une prise de drogue rapide, nous avons inhibé le cortex PL dans ces deux conditions. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que le PL peut à la fois promouvoir et inhiber le comportement en fonction du contexte et confirmer ce rôle double du PL, dépendant des contingences expérimentales. A partir de ces résultats nous voulions déterminer, s'il existait des voies de projections spécifiques impliquées préférentiellement dans la composante inhibitrice ou facilitatrice du PL que nous venions de mettre en évidence. Pour cela nous avons utilisé une approche optogénétique classique en injectant la construction virale contenant l'opsine au niveau du PL et les fibres optiques au niveau de la zone de projection que nous voulions cibler, c'est-à-dire le NAcCore. Dans ces conditions l'inhibition de la voie PL-NAcCore ne produit aucun des effets que nous avons pu révéler avec une inhibition directe du PL. En raison des publications qui identifient cette voie comme potentiellement impliquée dans la réinstallation du comportement d'auto-administration (Stefanik *et al*, 2013), nous avons voulu vérifier notre approche initiale, nous avons pour cela utilisé une autre approche plus spécifique dite d'expression conditionnelle. Elle consiste à effectuer une injection virale combinée. Une injection est réalisée au niveau du PL et l'autre au niveau de la structure de projection souhaitée, dans notre cas le NAc. Dans ces conditions seuls les neurones co-exprimant les deux virus ont la capacité d'exprimer l'opsine. Pour ce faire nous avons déterminé et validé, les conditions expérimentales nécessaires à l'utilisation de ce type d'approche dans un premier temps chez l'animal anesthésié. Puis nous avons étudié les effets d'une inhibition, nous permettant de cibler spécifiquement la voie PL-NAcCore avec cette approche. Les résultats suggèrent que dans ces conditions ni l'effet inhibiteur, ni l'effet facilitateur, observés lors de l'inhibition globale du PL, ne semblent provenir de cette voie PL-NAcCore, dans nos conditions expérimentales. Nous souhaitons tout de même effectuer des contrôles complémentaires pour valider notre approche expérimentale notamment chez l'animal se comportant.

Grâce à ces travaux de thèse nous avons donc pu identifier et manipuler des marqueurs de connectivité fonctionnelle chez des rats *addicts* et des rats *non-addicts* à la cocaïne, mais aussi identifier le rôle double du PL à la fois inhibiteur et excitateur sur la recherche de cocaïne. Mais au-delà des résultats ; nous avons pu développer des outils et les procédures expérimentales, nous permettant de questionner en temps réel des structures clés, des circuits cérébraux impliqués dans les processus motivationnels, émotionnels et de contrôle cognitif dans le cadre de l'addiction.

Sachant que l'addiction à la cocaïne repose sur un défaut de ces processus, avec l'étude de la connectivité *in vivo* sur animal se comportant (Guillem and Ahmed, 2017; Lüscher *et al*, 2015; Owesson-White *et al*, 2008), on peut considérer qu'une étape importante est franchie par rapport à des approches *ex vivo* où il ne peut pas être fait de lien entre les altérations observées et l'expression du comportement (Kasanetz *et al*, 2010, 2013). Néanmoins, dans une même perspective de connectivité, il conviendrait de questionner séparément les deux types de processus (inhibiteur vs motivationnel) sur l'animal se comportant.

PERSPECTIVES.

Au vu des résultats obtenus, il nous semblerait intéressant de développer des procédures expérimentales permettant d'interroger ces circuits lorsque les rats sont engagés dans une tâche comportementale bien précise et notamment le contrôle inhibiteur du craving durant la ND. Nous souhaiterions en effet identifier le fonctionnement de ces réseaux à court terme en combinant à la fois des enregistrements électrophysiologiques multi-site et de l'optogénétique, sur animal se comportant. L'optogénétique nous permet dans ces conditions, de questionner en temps réel les neurones impliqués dans la réponse comportementale mesurée, tout en étudiant l'impact de ces manipulations à la fois sur le comportement et sur l'activité électrique des populations neuronales enregistrées. Une étude de la connectivité structurelle des réseaux potentiellement impliqués dans les comportements motivationnels et inhibiteurs nous semble être une étape indispensable à mettre en œuvre avec les nouvelles approches que nous avons à notre disposition ; des méthodes de traçage notamment sur cerveau entier, pour identifier avec précision les cibles potentielles à étudier (Chung *et al*, 2013), les réseaux impliqués, les voies ou même les neurones. Ces études sont fondamentales pour choisir les approches expérimentales les plus adaptées, notamment pour les stimulations optogénétiques.

Références Bibliographiques

- Ahmed SH (2010). Validation crisis in animal models of drug addiction: beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* **35**: 172–184.
- Ahmed SH (2012). The science of making drug-addicted animals. *Neuroscience* **211**: 107–125.
- Ahmed SH, Koob GF (1998). Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* **282**: 298–300.
- Ambroggi F, Ishikawa A, Fields HL, Nicola SM (2008). Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. *Neuron* **59**: 648.
- Anthony JC, Warner LA, Kessler RC (1994). Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National comorbidity Survey. **2**: 244–268.
- Baler RD, Volkow ND (2006). Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. *Trends Mol Med* **12**: 559–566.
- Belin D, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2009). Pattern of intake and drug craving predict the development of cocaine addiction-like behavior in rats. *Biol Psychiatry* **65**: 863–868.
- Belin D, Everitt BJ (2008). Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron* **57**: 432–441.
- Belin-Rauscent A, Everitt BJ, Belin D (2012). Intrastratial shifts mediate the transition from drug-seeking actions to habits. *Biol Psychiatry* **72**: 343–345.
- Belin-Rauscent A, Fouyssac M, Bonci A, Belin D (2016). How Preclinical Models Evolved to Resemble the Diagnostic Criteria of Drug Addiction. *Biol Psychiatry* **79**: 39–46.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**: 1263–1268.

- Brandon MP, Koenig J, Leutgeb JK, Leutgeb S (2014). New and distinct hippocampal place codes are generated in a new environment during septal inactivation. *Neuron* **82**: 789.
- Brown RM, Kupchik YM, Spencer S, Garcia-Keller C, Spanswick DC, Lawrence AJ, *et al* (2017). Addiction-like Synaptic Impairments in Diet-Induced Obesity. *Biol Psychiatry* **81**: 797–806.
- Burgos-Robles A, Kimchi EY, Izadmehr EM, Porzenheim MJ, Ramos-Guasp WA, Nieh EH, *et al* (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat Neurosci* **20**: 824–835.
- Butler CW, Wilson YM, Gunnersen JM, Murphy M (2015). Tracking the fear memory engram: discrete populations of neurons within amygdala, hypothalamus, and lateral septum are specifically activated by auditory fear conditioning. *Learn Mem* **22**: 370–384.
- Buzsáki G (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* **33**: 325–340.
- Cannella N, Cosa-Linan A, Büchler E, Falfan-Melgoza C, Weber-Fahr W, Spanagel R (2017). In vivo structural imaging in rats reveals neuroanatomical correlates of behavioral sub-dimensions of cocaine addiction. *Addict Biol* doi:10.1111/adb.12500.
- Cantou P, Platel H, Desgranges B, Groussard M (2017). How motor, cognitive and musical expertise shapes the brain: Focus on fMRI and EEG resting-state functional connectivity. *J Chem Neuroanat* doi:10.1016/j.jchemneu.2017.08.003.
- Caprioli D, Venniro M, Zeric T, Li X, Adhikary S, Madangopal R, *et al* (2015). Effect of the novel positive allosteric modulator of mGluR2 AZD8529 on incubation of methamphetamine craving after prolonged voluntary abstinence in a rat model. *Biol Psychiatry* **78**: 463.

- Chan RW, Leong ATL, Ho LC, Gao PP, Wong EC, Dong CM, *et al* (2017). Low-frequency hippocampal-cortical activity drives brain-wide resting-state functional MRI connectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E6972–E6981.
- Chen BT, Yau H-J, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW, *et al* (2013). Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature* **496**: 359–362.
- Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, *et al* (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* **497**: 332–337.
- Cooper A, Barnea-Ygael N, Levy D, Shaham Y, Zangen A (2007). A conflict rat model of cue-induced relapse to cocaine seeking. *Psychopharmacology (Berl)* **194**: 117–125.
- Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics* **14**: 687–697.
- Cruz FC, Koya E, Guez-Barber DH, Bossert JM, Lupica CR, Shaham Y, *et al* (2013). New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nat Rev Neurosci* **14**: nrn3597.
- Dejean C, Courtin J, Karalis N, Chaudun F, Wurtz H, Bienvenu TCM, *et al* (2016). Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. *Nature* **535**: 420–424.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**: 1014–1017.
- Deroche-Gamonet V, Piazza P vincenzo (2010). Transition to addiction. *Encycl Behav Neurosci* **3**: 422–428.

- Deroche-Gamonet V, Piazza PV (2014). Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. *Neuropharmacology* **76 Pt B**: 437–449.
- Di Ciano P, Everitt BJ (2004). Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **24**: 7167–7173.
- Du Y, Fryer SL, Fu Z, Lin D, Sui J, Chen J, *et al* (2017). Dynamic functional connectivity impairments in early schizophrenia and clinical high-risk for psychosis. *NeuroImage* doi:10.1016/j.neuroimage.2017.10.022.
- Ersche KD, Fletcher PC, Lewis SJG, Clark L, Stocks-Gee G, London M, *et al* (2005). Abnormal frontal activations related to decision-making in current and former amphetamine and opiate dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* **180**: 612–623.
- Ersche KD, Jones PS, Williams GB, Turton AJ, Robbins TW, Bullmore ET (2012). Abnormal brain structure implicated in stimulant drug addiction. *Science* **335**: 601–604.
- Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* **76**: 1057–1070.
- Everitt BJ (2014). Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories--indications for novel treatments of addiction. *Eur J Neurosci* **40**: 2163–2182.
- Fenton GE, Halliday DM, Mason R, Stevenson CW (2014). Medial prefrontal cortex circuit function during retrieval and extinction of associative learning under anesthesia. *Neuroscience* **265**: 204–216.

- Foltin RW, Haney M, Bedi G, Evans SM (2016). Modafinil decreases cocaine choice in human cocaine smokers only when the response requirement and the alternative reinforcer magnitude are large. *Pharmacol Biochem Behav* **150–151**: 8–13.
- Funk D, Coen K, Tamadon S, Hope BT, Shaham Y, Lê AD (2016). Role of Central Amygdala Neuronal Ensembles in Incubation of Nicotine Craving. *J Neurosci* **36**: 8612–8623.
- Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho JK, Sperry L, Ross TJ, *et al* (2000). Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *Am J Psychiatry* **157**: 1789–1798.
- Geng X, Hu Y, Gu H, Salmeron BJ, Adinoff B, Stein EA, *et al* (2017). Salience and default mode network dysregulation in chronic cocaine users predict treatment outcome. *Brain J Neurol* doi:10.1093/brain/awx036.
- Ginger M, Haberl M, Conzelmann K-K, Schwarz MK, Frick A (2013). Revealing the secrets of neuronal circuits with recombinant rabies virus technology. *Front Neural Circuits* **7**: .
- Golden SA, Heins C, Venniro M, Caprioli D, Zhang M, Epstein DH, *et al* (2017). Compulsive Addiction-like Aggressive Behavior in Mice. *Biol Psychiatry* **82**: 239–248.
- Goldstein RZ, Craig ADB, Bechara A, Garavan H, Childress AR, Paulus MP, *et al* (2009). The neurocircuitry of impaired insight in drug addiction. *Trends Cogn Sci* **13**: 372–380.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* **159**: 1642–1652.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* **12**: 652–669.

- Gompf HS, Budygin EA, Fuller PM, Bass CE (2015). Targeted genetic manipulations of neuronal subtypes using promoter-specific combinatorial AAVs in wild-type animals. *Front Behav Neurosci* **9**: 152.
- Gore BB, Soden ME, Zweifel LS (2013). Manipulating gene expression in projection-specific neuronal populations using combinatorial viral approaches. *Curr Protoc Neurosci* **65**: 4.35.1-20.
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, *et al* (2010). Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics. *Cell* **141**: 154–165.
- Guetin S, Charras K, Berard A, Arbus C, Berthelon P, Blanc F, *et al* (2013). An overview of the use of music therapy in the context of Alzheimer's disease: a report of a French expert group. *Dement Lond Engl* **12**: 619–634.
- Guillem K, Ahmed SH Preference for Cocaine is Represented in the Orbitofrontal Cortex by an Increased Proportion of Cocaine Use-Coding Neurons. *Cereb Cortex* 1–14doi:10.1093/cercor/bhw398.
- Haney M (2009). Self-administration of cocaine, cannabis and heroin in the human laboratory: benefits and pitfalls. *Addict Biol* **14**: 9–21.
- Harris AZ, Golder D, Likhtik E (2017). Multisite Electrophysiology Recordings in Mice to Study Cross-Regional Communication During Anxiety. *Curr Protoc Neurosci* **80**: 8.40.1-8.40.21.
- Hayen A, Meese-Tamuri S, Gates A, Ito R (2014). Opposing roles of prelimbic and infralimbic dopamine in conditioned cue and place preference. *Psychopharmacology (Berl)* **231**: 2483–2492.

- Honey CJ, Kötter R, Breakspear M, Sporns O (2007). Network structure of cerebral cortex shapes functional connectivity on multiple time scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10240–10245.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* **29**: 565–598.
- Jasinska AJ, Chen BT, Bonci A, Stein EA (2015). Dorsal MPFC circuitry in rodent models of cocaine use: Implications for drug-addiction therapies. *Addict Biol* **20**: 215–226.
- Jonckers E, Shah D, Hamaide J, Verhoye M, Van der Linden A (2015). The power of using functional fMRI on small rodents to study brain pharmacology and disease. *Front Pharmacol* **6**: 231.
- Kalivas PW, McFarland K (2003). Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **168**: 44–56.
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J (2005). Unmanageable Motivation in Addiction: A Pathology in Prefrontal-Accumbens Glutamate Transmission. *Neuron* **45**: 647–650.
- Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, *et al* (2016). 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci* **19**: 605–612.
- Karch S, Keeser D, Hümmer S, Paolini M, Kirsch V, Karali T, *et al* (2015). Modulation of Craving Related Brain Responses Using Real-Time fMRI in Patients with Alcohol Use Disorder. *PloS One* **10**: e0133034.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O, *et al* (2010). Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* **328**: 1709–1712.

- Kasanetz F, Lafourcade M, Deroche-Gamonet V, Revest J-M, Berson N, Balado E, *et al* (2013). Prefrontal synaptic markers of cocaine addiction-like behavior in rats. *Mol Psychiatry* **18**: 729–737.
- Keown CL, Datko MC, Chen CP, Maximo JO, Jahedi A, Müller R-A (2017). Network organization is globally atypical in autism: A graph theory study of intrinsic functional connectivity. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* **2**: 66–75.
- Keramati M, Ahmed SH, Gutkin BS (2017). Misdeed of the need: towards computational accounts of transition to addiction. *Curr Opin Neurobiol* **46**: 142–153.
- Kim D-Y, Yoo S-S, Tegethoff M, Meinlschmidt G, Lee J-H (2015). The inclusion of functional connectivity information into fMRI-based neurofeedback improves its efficacy in the reduction of cigarette cravings. *J Cogn Neurosci* **27**: 1552–1572.
- Kimura M, Tanaka K, Toyama K (1976). Interneuronal connectivity between visual cortical neurones of the cat as studied by cross-correlation analysis of their impulse discharges. *Brain Res* **118**: 329–333.
- Kober H, Mende-Siedlecki P, Kross EF, Weber J, Mischel W, Hart CL, *et al* (2010). Prefrontal-striatal pathway underlies cognitive regulation of craving. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14811–14816.
- Konopacki J, Bocian R, Kowalczyk T, Kłos-Wojtczak P (2014). The electrical coupling and the hippocampal formation theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* **107**: 1–17.
- Koob GF, Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **35**: 217–238.
- Koob GF, Volkow ND (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* **3**: 760–773.

- LaLumiere RT, Smith KC, Kalivas PW (2012). Neural circuit competition in cocaine-seeking: roles of the infralimbic cortex and nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci* **35**: 614–622.
- Lam S, Wang Z, Franklin T, O'Brien C, Magland J, Childress A (2013). Wavelet-transformed temporal cerebral blood flow signals during attempted inhibition of cue-induced cocaine craving distinguish prognostic phenotypes. *Drug Alcohol Depend* **128**: 140–147.
- Lenoir M, Augier E, Vouillac C, Ahmed SH (2013). A choice-based screening method for compulsive drug users in rats. *Curr Protoc Neurosci Editor Board Jacqueline N Crawley AI Chapter 9*: Unit 9.44.
- Levine C, Marcillo A (2008). Origin and Endpoint of the Olfactory Nerve Fibers: As Described by Santiago Ramón y Cajal. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* **291**: 741–750.
- Liang X, He Y, Salmeron BJ, Gu H, Stein EA, Yang Y (2015). Interactions between the salience and default-mode networks are disrupted in cocaine addiction. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **35**: 8081–8090.
- Limpens JHW, Damsteegt R, Broekhoven MH, Voorn P, Vanderschuren LJMJ (2015). Pharmacological inactivation of the prelimbic cortex emulates compulsive reward seeking in rats. *Brain Res* **1628**: 210–218.
- Lisman J, Buzsáki G (2008). A Neural Coding Scheme Formed by the Combined Function of Gamma and Theta Oscillations. *Schizophr Bull* **34**: 974–980.
- López-Vázquez MÁ, López-Loeza E, Lajud Ávila N, Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, Reyes YE, *et al* (2014). Septal serotonin depletion in rats facilitates working memory in the radial arm maze and increases hippocampal high-frequency theta activity. *Eur J Pharmacol* **734**: 105–113.

- Lu H, Zou Q, Chefer S, Ross TJ, Vaupel DB, Guillem K, *et al* (2014). Abstinence from cocaine and sucrose self-administration reveals altered mesocorticolimbic circuit connectivity by resting state MRI. *Brain Connect* **4**: 499–510.
- Lüscher C, Malenka RC (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* **69**: 650–663.
- Lüscher C, Pascoli V, Creed M (2015). Optogenetic dissection of neural circuitry: from synaptic causalities to blue prints for novel treatments of behavioral diseases. *Curr Opin Neurobiol* **35**: 95–100.
- Mak LE, Minuzzi L, MacQueen G, Hall G, Kennedy SH, Milev R (2017). The Default Mode Network in Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Connect* **7**: 25–33.
- Martín-García E, Courtin J, Renault P, Fiancette J-F, Wurtz H, Simonnet A, *et al* (2014). Frequency of cocaine self-administration influences drug seeking in the rat: optogenetic evidence for a role of the prelimbic cortex. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **39**: 2317–2330.
- McCracken CB, Hamby SM, Patel KM, Morgan D, Vrana KE, Roberts DCS (2005). Extended cocaine self-administration and deprivation produces region-specific and time-dependent changes in connexin36 expression in rat brain. *Synapse* **58**: 141–150.
- McGinty VB, Grace AA (2008). Selective Activation of Medial Prefrontal-to-Accumbens Projection Neurons by Amygdala Stimulation and Pavlovian Conditioned Stimuli. *Cereb Cortex N Y NY* **18**: 1961–1972.
- McGlinchey EM, James MH, Mahler SV, Pantazis C, Aston-Jones G (2016). Prelimbic to Accumbens Core Pathway Is Recruited in a Dopamine-Dependent Manner to Drive Cued Reinstatement of Cocaine Seeking. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **36**: 8700–8711.

- McHugh MJ, Gu H, Yang Y, Adinoff B, Stein EA (2017). Executive control network connectivity strength protects against relapse to cocaine use. *Addict Biol* **22**: 1790–1801.
- McLellan AT, Luborsky L, Woody GE, O'Brien CP (1980). An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients. The Addiction Severity Index. *J Nerv Ment Dis* **168**: 26–33.
- Menon V, Uddin LQ (2010). Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. *Brain Struct Funct* **214**: 655–667.
- Mihindou C, Guillem K, Navailles S, Vouillac C, Ahmed SH (2013). Discriminative inhibitory control of cocaine seeking involves the prelimbic prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* **73**: 271–279.
- Miller G (2010). Psychiatry. Beyond DSM: seeking a brain-based classification of mental illness. *Science* **327**: 1437.
- Moorman DE, Aston-Jones G (2015). Prefrontal neurons encode context-based response execution and inhibition in reward seeking and extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 9472–9477.
- Moorman DE, James MH, McGlinchey EM, Aston-Jones G (2015). Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain Res* **1628**: 130–146.
- Murphy M, Greferath U, Wilson YM (2007). A method for detecting functional activity related expression in gross brain regions, specific brain nuclei and individual neuronal cell bodies and their projections. *Biol Proced Online* **9**: 1.
- Nadège Berson (2009). Facteurs neurobiologiques associés à l'addiction à la cocaïne : étude au moyen d'un modèle d'addiction chez le rat. .
- Navailles S, Guillem K, Vouillac-Mendoza C, Ahmed SH (2015). Coordinated Recruitment of Cortical-Subcortical Circuits and Ascending Dopamine and Serotonin Neurons During

- Inhibitory Control of Cocaine Seeking in Rats. *Cereb Cortex N Y N* 1991 **25**: 3167–3181.
- Nicolas C, Tauber C, Lepelletier F-X, Chalon S, Belujon P, Galineau L, *et al* (2017). Longitudinal Changes in Brain Metabolic Activity after Withdrawal from Escalation of Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **42**: 1981–1990.
- Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C (2007). Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* **369**: 1047–1053.
- O’Neill GC, Tewarie P, Vidaurre D, Liuzzi L, Woolrich MW, Brookes MJ (2017). Dynamics of large-scale electrophysiological networks: A technical review. *NeuroImage* doi:10.1016/j.neuroimage.2017.10.003.
- Owesson-White CA, Cheer JF, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2008). Dynamic changes in accumbens dopamine correlate with learning during intracranial self-stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11957–11962.
- Pascoli V, Terrier J, Hiver A, Lüscher C (2015). Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. *Neuron* **88**: 1054–1066.
- Paxinos G, Watson C (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. .
- Paz R, Pelletier JG, Bauer EP, Paré D (2006). Emotional enhancement of memory via amygdala-driven facilitation of rhinal interactions. *Nat Neurosci* **9**: 1321–1329.
- Peck JA, Wercberger R, Kariyeva E, Ranaldi R (2013). Cue-induced resumption of heroin and cocaine seeking in rats using a conflict model of abstinence and relapse. *Psychopharmacology (Berl)* **228**: 651–658.

- Peer K, Rennert L, Lynch KG, Farrer L, Gelernter J, Kranzler HR (2013). Prevalence of DSM-IV and DSM-5 alcohol, cocaine, opioid, and cannabis use disorders in a largely substance dependent sample. *Drug Alcohol Depend* **127**: 215–219.
- Pelloux Y, Everitt BJ, Dickinson A (2007). Compulsive drug seeking by rats under punishment: effects of drug taking history. *Psychopharmacology (Berl)* **194**: 127–137.
- Pelloux Y, Murray JE, Everitt BJ (2015). Differential vulnerability to the punishment of cocaine related behaviours: effects of locus of punishment, cocaine taking history and alternative reinforcer availability. *Psychopharmacology (Berl)* **232**: 125–134.
- Peters J, LaLumiere RT, Kalivas PW (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**: 6046–6053.
- Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2013). A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology (Berl)* **229**: 387–413.
- Ramot M, Kimmich S, Gonzalez-Castillo J, Roopchansingh V, Popal H, White E, *et al* (2017). Direct modulation of aberrant brain network connectivity through real-time NeuroFeedback. *eLife* **6**: .
- Ray S, Haney M, Hanson C, Biswal B, Hanson SJ (2015). Modeling Causal Relationship Between Brain Regions Within the Drug-Cue Processing Network in Chronic Cocaine Smokers. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **40**: 2960–2968.
- Richardson NR, Roberts DC (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* **66**: 1–11.

- Robinson SM, Adinoff B (2016). The Classification of Substance Use Disorders: Historical, Contextual, and Conceptual Considerations. *Behav Sci* **6**: .
- Robinson TE, Yager LM, Cogan ES, Saunders BT (2014). On the motivational properties of reward cues: Individual differences. *Neuropharmacology* **76 Pt B**: 450–459.
- Roth BL (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* **89**: 683–694.
- Schenk S, Horger BA, Peltier R, Shelton K (1991). Supersensitivity to the reinforcing effects of cocaine following 6-hydroxydopamine lesions to the medial prefrontal cortex in rats. *Brain Res* **543**: 227–235.
- Schjetnan AGP, Luczak A (2011). Recording Large-scale Neuronal Ensembles with Silicon Probes in the Anesthetized Rat. *J Vis Exp JoVE* doi:10.3791/3282.
- Schnitzler A, Gross J (2005). Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nat Rev Neurosci* **6**: 285–296.
- Shorter D, Domingo CB, Kosten TR (2015). Emerging drugs for the treatment of cocaine use disorder: a review of neurobiological targets and pharmacotherapy. *Expert Opin Emerg Drugs* **20**: 15–29.
- SIDES (2017). SIDES. *SIDES* at <http://wiki.side-sante.fr/doku.php?id=sides:ref:psy:item_64:trouble_obsessionnel_compulsif>.
- Sinha R (2013). Modeling Relapse Situations in the Human Laboratory. *Curr Top Behav Neurosci* **13**: 379–402.
- Sinha R, O'Malley SS (1999). Craving for alcohol: findings from the clinic and the laboratory. *Alcohol Alcohol Oxf* **34**: 223–230.
- Sjulson L, Cassataro D, DasGupta S, Miesenböck G (2016). Cell-Specific Targeting of Genetically Encoded Tools for Neuroscience. *Annu Rev Genet* **50**: 571–594.

- Skinner MD, Aubin H-J (2010). Craving's place in addiction theory: Contributions of the major models. *Neurosci Biobehav Rev* **34**: 606–623.
- Stefanik MT, Kupchik YM, Kalivas PW (2016). Optogenetic inhibition of cortical afferents in the nucleus accumbens simultaneously prevents cue-induced transient synaptic potentiation and cocaine-seeking behavior. *Brain Struct Funct* **221**: 1681–1689.
- Stefanik MT, Moussawi K, Kupchik YM, Smith KC, Miller RL, Huff ML, *et al* (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addict Biol* **18**: 50–53.
- Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, Leeuwen WA van, Hardjoprajitno JE, Cho S, *et al* (2011). Amygdala to nucleus accumbens excitatory transmission facilitates reward seeking. *Nature* **475**: 377–380.
- Sutherland MT, McHugh MJ, Pariyadath V, Stein EA (2012). Resting state functional connectivity in addiction: Lessons learned and a road ahead. *NeuroImage* **62**: 2281–2295.
- Teicher MH, Samson JA, Anderson CM, Ohashi K (2016). The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat Rev Neurosci* **17**: 652–666.
- Thibault RT, Lifshitz M, Raz A (2016). The self-regulating brain and neurofeedback: Experimental science and clinical promise. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav* **74**: 247–261.
- Thibault RT, Raz A (2016). When can neurofeedback join the clinical armamentarium? *Lancet Psychiatry* **3**: 497–498.
- Thomsen M, Caine SB (2005). Chronic intravenous drug self-administration in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 9**: Unit 9.20.

- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, *et al* (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* **6**: 875–881.
- Treserras S (2008). Etudes sur la connectivité cérébrale: aspects méthodologiques et applications au cerveau au repos, à la motricité et à la lecture. .
- Trouche S, Perestenko PV, Ven GM van de, Bratley CT, McNamara CG, Campo-Urriza N, *et al* (2016). Recoding a cocaine-place memory engram to a neutral engram in the hippocampus. *Nat Neurosci* **19**: 564–567.
- Vanderschuren LJM, Ahmed SH (2013). Animal studies of addictive behavior. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a011932.
- Vanderschuren LJM, Everitt BJ (2004). Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* **305**: 1017–1019.
- Venniro M, Caprioli D, Shaham Y (2016). Animal models of drug relapse and craving: From drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence. *Prog Brain Res* **224**: 25–52.
- Venniro M, Caprioli D, Zhang M, Whitaker LR, Zhang S, Warren BL, *et al* (2017). The Anterior Insular Cortex→Central Amygdala Glutamatergic Pathway Is Critical to Relapse after Contingency Management. *Neuron* **96**: 414–427.e8.
- Vertes RP (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* **142**: 1–20.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J, Telang F, Logan J, Jayne M, *et al* (2010). Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. *NeuroImage* **49**: 2536–2543.

- Vouimba R-M, Maroun M (2011). Learning-Induced Changes in mPFC–BLA Connections After Fear Conditioning, Extinction, and Reinstatement of Fear. *Neuropsychopharmacology* **36**: 2276–2285.
- Wang L, Liu Q, Shen H, Li H, Hu D (2015). Large-scale functional brain network changes in taxi drivers: evidence from resting-state fMRI. *Hum Brain Mapp* **36**: 862–871.
- Warren BL, Suto N, Hope BT (2017). Mechanistic Resolution Required to Mediate Operant Learned Behaviors: Insights from Neuronal Ensemble-Specific Inactivation. *Front Neural Circuits* **11**: 28.
- Watanabe T, Sasaki Y, Shibata K, Kawato M (2017). Advances in fMRI Real-Time Neurofeedback. *Trends Cogn Sci* doi:10.1016/j.tics.2017.09.010.
- Wilson Y, Nag N, Davern P, Oldfield BJ, McKinley MJ, Greferath U, *et al* (2002). Visualization of functionally activated circuitry in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3252–3257.
- Wolffgramm J (1991). An ethopharmacological approach to the development of drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* **15**: 515–519.
- Yamashita A, Hayasaka S, Kawato M, Imamizu H (2017). Connectivity Neurofeedback Training Can Differentially Change Functional Connectivity and Cognitive Performance. *Cereb Cortex N Y N 1991* **27**: 4960–4970.
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K (2011). Optogenetics in Neural Systems. *Neuron* **71**: 9–34.
- Zalocusky K, Deisseroth K (2013). Optogenetics in the behaving rat: integration of diverse new technologies in a vital animal model. *Optogenetics* 1–17doi:10.2478/optog-2013-0001.

- Zhao S, Rangaprakash D, Venkataraman A, Liang P, Deshpande G (2017). Investigating Focal Connectivity Deficits in Alzheimer's Disease Using Directional Brain Networks Derived from Resting-State fMRI. *Front Aging Neurosci* **9**: 211.
- Zlebnik NE, Hedges VL, Carroll ME, Meisel RL (2014). Chronic wheel running affects cocaine-induced c-Fos expression in brain reward areas in rats. *Behav Brain Res* **261**: 71–78.