

Université de Montréal

**L'amygdale et la réponse aux stimuli associés aux récompenses :  
rôle des récepteurs glutamatergiques  
métabotropes du groupe II**

Par  
Caroline Garceau

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en pharmacologie

Août 2021

© Caroline Garceau, 2021

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

---

*Ce mémoire intitulé :*

**L'amygdale et la réponse aux stimuli associés aux récompenses : rôle des récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe II**

*Présenté par :*

**Caroline Garceau**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :*

**Dr Jonathan Brouillette**

Président-rapporteur

**Dre Anne-Noël Samaha**

Directrice de recherche

**Dre Marie-France Marin**

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les stimuli conditionnés (CS) guident les animaux vers des récompenses essentielles à leur survie, telle que la quête de nourriture et d'eau. Ils peuvent également promouvoir la poursuite excessive de récompense, comme dans l'addiction. La transmission glutamatergique dans l'amygdale basolatérale (BLA) régule les effets des CS. Cependant, le rôle des récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe II (mGlu<sub>2/3</sub>) de la BLA est inconnu. Les mGlu<sub>2/3</sub> sont principalement localisés au niveau extrasynaptique sur les terminaisons neuronales. L'activation de ces récepteurs diminue la libération synaptique de glutamate. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> dans la BLA diminue la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense via la réduction de la libération de glutamate. La méthode de transfert Pavlovien-à-instrumental (PIT) a été utilisée pour tester cette hypothèse. Nous avons d'abord confirmé un effet PIT chez des rats mâles. Les rats ont initialement appris à appuyer sur un levier pour obtenir de l'eau comme récompense. Ils ont ensuite appris qu'un stimulus auditif (CS+) prédit la livraison non-contingente d'eau, tandis qu'un stimulus auditif différent (CS-) ne signale aucune récompense. Le jour du test PIT, les rats ont pu appuyer sur le levier sous extinction (eau omise) et nous avons évalué l'influence des CS+ et CS- sur ce comportement. Les rats ont appuyé davantage sur le levier pendant le CS+ comparé au CS-, indiquant que le CS+ incite les rats à rechercher la récompense. Chez un nouveau groupe de rats mâles, les mêmes méthodes ont été appliquées avec un agoniste des mGlu<sub>2/3</sub>, le LY379268 (0, 3 ou 6 µg/hémisphère) injecté dans la BLA avant le test PIT. Le LY379268 a diminué la capacité du CS+ à inciter l'appui sur le levier. Dans une dernière étude, nous avons examiné l'influence d'une administration systémique de LY379268 (0, 0.3 ou 1 mg/kg, sous-cutanée) sur l'effet PIT chez un groupe de rats mâles et femelles. Les effets motivationnels du CS+ sur la recherche de récompense étaient similaires entre les rats mâles et femelles. De plus, l'injection systémique de LY379268 a diminué ces effets chez les deux sexes. Ces résultats indiquent que les mGlu<sub>2/3</sub> régulent les propriétés motivationnelles des CS chez les deux sexes.

**Mots-clés:** Conditionnement instrumental, conditionnement Pavlovien, transfert Pavlovien-à-instrumental, amygdale basolatérale, glutamate, récepteurs mGlu<sub>2/3</sub>, dévaluation, différences sexuelles

## **ABSTRACT**

Conditioned stimuli (CS) guide animals towards rewards needed for survival, such as food and water. In parallel, they can also promote maladaptive reward seeking, as in addiction. Glutamate signaling within the basolateral amygdala (BLA) modulates the effects of cues. However, the role of metabotropic group II glutamate (mGlu<sub>2/3</sub>) receptors in the BLA is unknown. mGlu<sub>2/3</sub> are localized predominantly extrasynaptically on presynaptic terminals. The activation of these receptors suppresses synaptic glutamate release. Thus, we hypothesized that activating BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors would attenuate cue-triggered increases in incentive motivation for reward, via reduced glutamate release. The Pavlovian-to-Instrumental transfer (PIT) method was used to test this hypothesis. We first confirmed a PIT effect in a cohort of male rats. Rats initially learned to press a lever to obtain a water reward. Then, they learned that one auditory cue predicts non-contingent delivery of water (CS+), while a second different auditory cue does not (CS-). On PIT test day, the rats could lever press under extinction (water deliveries omitted), and we assessed changes in lever pressing in response to CS+ and CS-. The rats pressed more on the lever during CS+ versus CS-, indicating cue-triggered potentiation of incentive motivation. In a separate cohort of male rats, the methods were repeated with the mGlu<sub>2/3</sub> agonist LY379268 (0, 3 or 6 µg/hemisphere) infused into the BLA prior to PIT testing. LY379268 abolished CS+ potentiated pressing on the water-associated lever. In a last study, we examined the influence of systemic administration of LY379268 (0, 0.3 or 1 mg/kg, subcutaneous) on PIT, in a cohort of female and male rats. We found that cue-triggered increases in incentive motivation was similar across sexes, and that systemic injection of LY379268 decreased this effect in both sexes. These results indicate that mGlu<sub>2/3</sub> receptors mediate the motivational effects of cues in both sexes.

**Keywords:** Instrumental conditioning, Pavlovian conditioning, Pavlovian-to-instrumental transfer, basolateral amygdala, glutamate, mGlu<sub>2/3</sub> receptors, devaluation, sex differences



# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>5</b>
<b>SIGLES &amp; ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>7</b>
<b>CHAPITRE I: INTRODUCTION</b> .....	<b>8</b>
<b>LE GLUTAMATE, L'AMYGDALÉ ET LA MOTIVATION</b> .....	<b>9</b>
<b>1. La motivation et le conditionnement</b> .....	<b>9</b>
1.1 Principe de conditionnement instrumental.....	9
1.2 Principe de conditionnement Pavlovien.....	10
1.3 Transfert Pavlovien-à-instrumental .....	11
1.4 Les différences sexuelles dans la réponse aux CS.....	14
<b>2. Les régions neuronales impliquées dans le PIT</b> .....	<b>15</b>
2.1 L'aire tegmentaire ventrale et le noyau accumbens .....	15
2.2 L'amygdale et ses projections .....	15
<b>3. Le système glutamatergique</b> .....	<b>17</b>
3.1 Le glutamate.....	17
3.2 Les récepteurs glutamatergiques .....	18
3.3 L'homéostasie glutamatergique.....	19
<b>DONNÉES RÉCENTES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE</b> .....	<b>22</b>
<b>CHAPITRE II: ARTICLE 1</b> .....	<b>23</b>
<b>CHAPITRE III: ARTICLE 2</b> .....	<b>54</b>
<b>CHAPITRE IV: DISCUSSION</b> .....	<b>86</b>
<b>4. Résumé et implications des résultats</b> .....	<b>87</b>
4.1 L'activation des mGlu <sub>2/3</sub> diminue la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense chez les deux sexes .....	87
4.2 La capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense est similaire entre les sexes.....	89
4.3 La dévaluation diminue la recherche de récompense chez les deux sexes.....	90
<b>5. Avantages et limites de l'étude</b> .....	<b>91</b>
5.1 Le PIT comme modèle comportemental.....	91
5.2 Le LY379268 comme agent pharmacologique ciblant les mGlu <sub>2/3</sub> .....	93
5.3 Les contrôles anatomiques .....	94
5.4 La considération du sexe comme variable biologique .....	95
<b>6. Implications pour l'addiction chez l'humain</b> .....	<b>96</b>
6.1 L'attribution pathologique d'une valeur motivationnelle à un stimulus .....	96
6.2 Les agents ciblant le système glutamatergique: traitement potentiel de l'addiction?.....	97
<b>7. Directions futures</b> .....	<b>98</b>
<b>8. Conclusion</b> .....	<b>98</b>

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

<b>Figure 1</b>	Schéma des régions neuronales impliquées dans le PIT.....	17
<b>Figure 2</b>	Homéostasie glutamatergique.....	21

## CHAPITRE II: ARTICLE 1

<b>Figure 1</b>	After instrumental and Pavlovian conditioning, rats show significant Pavlovian-to-Instrumental transfer.....	36
<b>Figure 2</b>	Responding during both instrumental and Pavlovian conditioning predicted later performance during a test for Pavlovian-to-instrumental Transfer.....	38
<b>Figure 3</b>	Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 2.....	39
<b>Figure 4</b>	Activation of basolateral amygdala (BLA) mGlu <sub>2/3</sub> receptors with LY379268 abolished CS+ triggered increases in both instrumental reward-seeking actions and conditioned approach behaviours.....	41
<b>Suppl. Fig. 1</b>	.....	53

## CHAPITRE III: ARTICLE 2

<b>Figure 1</b>	Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 1.....	64
<b>Figure 2</b>	Female and male rats showed similar Pavlovian-to-Instrumental transfer (PIT).....	67
<b>Figure 3</b>	Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 2.....	69
<b>Figure 4</b>	Systemic injection of the mGlu <sub>2/3</sub> receptor agonist, LY379268 attenuated cue-triggered increases in both instrumental responding for water reward and conditioned approach behaviours to the site of water delivery in male and female rats.....	72
<b>Figure 5</b>	Water reward devaluation attenuated both lever pressing for this reward and cue-triggered approach behaviours to the site of water delivery in male and female rats.....	74

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

<b>Tableau 1</b>	Résumé des types de conditionnement instrumental.....	9
<b>Tableau 2</b>	Résumé du conditionnement Pavlovien.....	10
<b>Tableau 3</b>	Design expérimental d'un modèle PIT simple à une récompense.....	13
<b>Tableau 4</b>	Design expérimental d'un modèle PIT spécifique.....	13
<b>Tableau 5</b>	Design expérimental d'un modèle PIT complet.....	14

## SIGLES & ABRÉVIATIONS

**AMPAR** : Récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionate

**BLA** : Complexe de l'amygdale basolatérale (*basolateral complex of the amygdala*)

**CeA** : Noyau central de l'amygdale (*central nucleus of the amygdala*)

**CS** : Stimulus conditionné (*conditioned stimulus*)

**EAATs** : Transporteurs d'acides aminés excitateurs (*excitatory amino acid transporters*)

**FR** : Ratio fixe (*fixed ratio*)

**HPC** : Hippocampe (*hippocampus*)

**iGluRs** : Récepteurs glutamatergiques ionotropes (*ionotropic glutamate receptors*)

**ITI** : Intervalle entre les stimuli (*inter-trial interval*)

**mGluRs** : Récepteurs glutamatergiques métabotropes (*metabotropic glutamate receptors*)

**mGlu<sub>1/5</sub>** : Récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe I (*metabotropic group I glutamate receptors*)

**mGlu<sub>2/3</sub>** : Récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe II (*metabotropic group II glutamate receptors*)

**mGlu<sub>4/6/7/8</sub>** : Récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe III (*metabotropic group III glutamate receptors*)

**NAc** : Noyau accumbens (*nucleus accumbens*)

**NMDAR** : Récepteurs *N*-méthyl-D-aspartic acid

**OFC** : Cortex orbitofrontal (*orbitofrontal cortex*)

**PFC** : Cortex préfrontal (*prefrontal cortex*)

**PIT** : Transfert Pavlovien-à-instrumental (*pavlovian-to-instrumental transfer*)

**US** : Stimulus non conditionné (*unconditioned stimulus*)

**VGluts** : Transporteurs de glutamate vésiculaire (*vesicular glutamate transporters*)

**VI** : Intervalle variable (*variable interval*)

**VTA** : Aire tegmentaire ventrale (*ventral tegmental area*)

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de maîtrise, Dre Anne-Noël Samaha, pour son accueil dans le laboratoire et sa confiance lors de l'accomplissement de mes expériences de Maîtrise. Elle a su transmettre ses connaissances et son intérêt pour le sujet de recherche. Je tiens également à remercier les membres de mon jury d'évaluation du mémoire, Dr Jonathan Brouillette et Dre Marie-France Marin, qui ont accepté d'évaluer mon travail, ainsi que les Drs Sébastien Talbot et Numa Dancause qui ont accepté d'être membres suppléants du jury d'évaluation du mémoire.

Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire : Dr Mike Robinson, Dre Alice Servonnet, Dr Shaun Khoo, Dr Pierre Sauton, Eric Borduas, Laurence Theroux, Hager Algallal et Aissatou Ndiaye pour le partage de connaissances durant ces deux dernières années. Merci à Alice, Shaun et Mike pour leurs implications dans nos projets communs. Merci à tous les stagiaires du laboratoire qui ont contribué à la création d'une ambiance de travail agréable au quotidien : Mathilde Legrix, Nicolas Boucher, Patrick Asselin, Maude Gelinias-Faucher, Qi Shan Bonmariage et Teodora Stanciu. Je tiens à remercier plus particulièrement mes deux stagiaires Thomas Cordahi et Justine Marsault qui m'ont aidé dans mes expériences lors de leur stage avec moi.

Un grand merci aussi à Dre Rebecca Derman, Dre Carrie Ferrario et Cameron Nobile de nous avoir généreusement partagé du matériel, des programmes d'ordinateur et des conseils précieux pour l'élaboration des tâches comportementales utilisées dans cette étude.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours supporté et encouragé dans mes études.

# **CHAPITRE I: INTRODUCTION**

# LE GLUTAMATE, L'AMYGDALE ET LA MOTIVATION

## 1. La motivation et le conditionnement

Les animaux sont confrontés à la nécessité de poursuivre des récompenses essentielles à la survie, telles que la nourriture et l'eau. Pourtant, une grande partie des comportements dirigés vers leur obtention ne sont pas sous l'influence directe de ces récompenses, mais plutôt sous celle des stimuli (e.g., sons, images ou odeurs) qui prédisent leur disponibilité dans l'environnement (Bindra, 1978; Bolles, 1972; Doya, 2008; Perks & Clifton, 1997). Ainsi, les stimuli de récompense jouent un rôle adaptatif important. Néanmoins, lorsqu'ils acquièrent une valeur motivationnelle trop élevée, les stimuli peuvent promouvoir la recherche excessive de récompense et la surconsommation, comme dans l'addiction (Everitt, Dickinson, & Robbins, 2001; Hogarth, Balleine, Corbit, & Killcross, 2013; Ludwig, Wikler, & Stark, 1974; O'Brien, Childress, Ehrman, & Robbins, 1998; Robinson & Berridge, 2008; Stewart, de Wit, & Eikelboom, 1984; Volkow, Wang, Fowler, & Telang, 2008). Les stimuli associés à des récompenses acquièrent la capacité d'influencer le comportement animal lors du conditionnement instrumental, du conditionnement pavlovien et de l'interaction entre ces deux types d'apprentissage associatif (Rescorla & Solomon, 1967).

### 1.1 Principe de conditionnement instrumental

Durant le conditionnement instrumental («opérant» ou «skinnerien»), une action est associée à une conséquence. Il existe quatre types de conditionnement instrumental (**tableau 1**). Les renforcements positif et négatif favorisent un comportement via l'ajout ou le retrait d'une conséquence, respectivement. À l'inverse, les punitions positive et négative défavorisent un comportement via l'ajout ou le retrait d'une conséquence, respectivement (Domjan, Grau, & Krause, 2010; Rudy, 2014).

RENFORCEMENT :	PUNITION :
Augmente la fréquence d'un comportement	Diminue la fréquence d'un comportement
1- Renforcement <b>positif</b> : <b>Ajouter</b> une conséquence agréable	3- Punition <b>positive</b> : <b>Ajouter</b> une conséquence désagréable
2- Renforcement <b>négatif</b> : <b>Retirer</b> une conséquence désagréable	4- Punition <b>négative</b> : <b>Retirer</b> une conséquence agréable

**Tableau 1. Résumé des types de conditionnement instrumental.** Durant ce conditionnement, une action est associée à une conséquence. Le résultat du conditionnement instrumental dépend de la procédure utilisée [adapté de Domjan et al. (2010)].

Lorsque les actions initialement dirigées vers un but sont répétées à de nombreuses reprises, elles peuvent graduellement devenir des habitudes (Rudy, 2014). Toutefois, contrairement aux actions dirigées vers un but, les habitudes sont peu influencées par leur conséquence (Balleine & Dickinson, 1998; Rudy, 2014). Il est possible de déterminer si une réponse instrumentale est davantage une habitude ou une action dirigée vers un but par la **déévaluation**. Durant la déévaluation, la valeur d'une récompense (comme la nourriture) est diminuée lorsqu'elle est consommée jusqu'à satiété, ou associée à une conséquence désagréable (e.g., maladie). Ainsi, un animal qui continue d'appuyer à la même fréquence sur un levier pour obtenir de la nourriture qui n'est plus autant désirable (e.g., parce qu'elle a été consommée jusqu'à satiété) suggère que cette réponse instrumentale est devenue plus habituelle et moins dirigée vers un but (Balleine & Dickinson, 1998; Rudy, 2014).

## 1.2 Principe de conditionnement Pavlovien

Lors du conditionnement Pavlovien (**tableau 2**), l'animal répond à une récompense primaire, telle que la nourriture; une réponse non conditionnée à un stimulus non conditionné (US). Dans ce cas, la présentation d'un stimulus neutre, comme le son d'une cloche, n'entraîne aucune réponse. En revanche, les appariements répétés du stimulus neutre avec l'US permettent l'acquisition d'une association entre le stimulus et l'US. Le stimulus initialement neutre devient ainsi un stimulus conditionné (CS). Une fois que l'association CS-US est bien établie, la présentation du CS à lui seul génère des réflexes ou des comportements conditionnés adaptés à la nature de l'US initial (Domjan et al., 2010).

1. Avant le conditionnement	2. Durant le conditionnement	3. Après le conditionnement
<b>a. Stimulus et réponse non conditionnés</b> Nourriture → Salive	<b>Association stimuli non conditionné et neutre</b> Nourriture + Cloche → Salive	<b>Stimulus et réponse conditionnés</b> Cloche seule → Salive
<b>b. Stimulus neutre sans réponse</b> Cloche seule → Rien		

**Tableau 2. Résumé du conditionnement Pavlovien.** Durant ce conditionnement, un stimulus neutre (le son d'une cloche) devient un stimulus conditionné, grâce à son appariement répété avec un stimulus non conditionné (la nourriture).

Les réflexes conditionnés incluent plusieurs changements physiologiques, tels que l'augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression sanguine et de la salivation (Childress, Ehrman, McLellan, & O'Brien, 1988; Ehrman, Robbins, Childress, & O'Brien, 1992; Robbins,



Ehrman, Childress, & O'Brien, 1999). Grâce à leurs **propriétés prédictives**, les CS peuvent aussi inciter l'animal à approcher le site de livraison prévue de la récompense. Enfin, les CS peuvent acquérir des **propriétés motivationnelles** à travers le conditionnement Pavlovien (Domjan et al., 2010). Ces propriétés motivationnelles leur confèrent la capacité de promouvoir l'apprentissage de nouveaux comportements (un effet appelé « renforcement conditionné ») (Mackintosh, 1974), ou de potentialiser des actions spécifiques en vue de l'obtention de la récompense associée (un effet appelé « transfert Pavlovien-à-instrumental (PIT) ») (Berridge & Robinson, 2003; Rescorla & Solomon, 1967). Ce dernier phénomène est détaillé à la section 1.3 suivante.

### **1.3 Transfert Pavlovien-à-instrumental**

Tel que mentionné précédemment, les CS influencent le comportement animal au quotidien, en potentialisant des actions qui visent l'obtention de récompense. Cet effet est connu sous le nom de « transfert Pavlovien-à-instrumental (PIT) ». Le PIT a également été adapté en un modèle comportemental pour étudier les propriétés motivationnelles des CS et les processus neurologiques sous-jacents en laboratoire. Le modèle PIT se déroule en trois étapes: deux phases successives d'apprentissage (i.e., les conditionnements instrumental et Pavlovien) et un test PIT (Cartoni, Balleine, & Baldassarre, 2016; Holmes, Marchand, & Coutureau, 2010). Lors du conditionnement Pavlovien, les sujets apprennent à associer un CS à la livraison d'une récompense. Dans un deuxième temps, les sujets apprennent lors du conditionnement instrumental à effectuer une réponse instrumentale pour obtenir cette récompense. Le jour du test PIT, les sujets ont la possibilité d'effectuer la même réponse instrumentale, mais sous extinction (i.e., la réponse n'est plus renforcée par la récompense) et l'influence de la présentation du CS sur ce comportement est évaluée. Les conditions d'extinction durant le test permettent d'isoler les propriétés motivationnelles du CS de celles de la récompense. **L'effet PIT** réfère à l'augmentation de la réponse instrumentale qui peut être observée lorsque le CS est présenté, indiquant que ce dernier a acquis des propriétés motivationnelles (Cartoni et al., 2016; Hogarth, Dickinson, Wright, Kouvaraki, & Duka, 2007; Kruse, Overmier, Konz, & Rokke, 1983; Lovibond, 1981; Rescorla & Solomon, 1967; Walker, 1942; Wyvell & Berridge, 2000). Durant le test PIT, la présentation du CS peut aussi augmenter l'approche des sujets vers le site de livraison prévue de la récompense, via ses propriétés prédictives (Robinson & Flagel, 2009).

#### **1.3.1 Les théories du PIT**

Le PIT résulte de l'interaction entre le conditionnement Pavlovien et le conditionnement instrumental. Balleine et Ostlund (2007) ont d'ailleurs proposé une théorie pour expliquer

plusieurs aspects du PIT. Selon cette théorie, le conditionnement instrumental permettrait d'abord la formation de deux associations soient: 1) la récompense comme une conséquence de l'action (action-US), et 2) la récompense comme un stimulus précédant la prochaine action (US-action). Lors du conditionnement Pavlovien, l'individu apprendrait l'association entre le stimulus et la récompense (CS-US). Puis, le jour du test PIT, la présentation du CS activerait un souvenir de la récompense, grâce à l'association CS-US, qui stimulerait ensuite l'initiation de la réponse instrumentale de recherche de cette récompense, via l'association US-action.

De plus, l'amplitude de l'effet PIT (i.e., la valeur motivationnelle du CS) pourrait dépendre de la force de l'association action-US, qui à son tour varierait en fonction de la désirabilité de la récompense (Balleine & Ostlund, 2007; Holmes et al., 2010). Par exemple, la valeur motivationnelle d'un CS associé à la nourriture serait plus faible chez un animal qui a consommé celle-ci jusqu'à satiété avant le test PIT (Aitken, Greenfield, & Wassum, 2016; Corbit, Janak, & Balleine, 2007).

### 1.3.2 Les types de PIT

Des études ont récemment découvert que le PIT peut émerger d'un processus sensoriel spécifique (PIT spécifique) ou d'un processus affectif général (PIT général). Ces deux types de PIT se distinguent sur le plan comportemental (Corbit & Balleine, 2005; Prevost, Liljeholm, Tyszka, & O'Doherty, 2012). En effet, le PIT spécifique se manifeste lorsqu'un CS favorise la production d'une action instrumentale qui a été associée avec la même récompense que ce CS. Il est donc guidé par la représentation de propriétés sensorielles détaillées d'une récompense spécifique. Le PIT général, quant à lui, s'observe lorsqu'un CS favorise la production d'une action instrumentale pour une récompense différente de celle prédite par ce CS. Ce dernier type est ainsi dirigé par la représentation de caractéristiques appétitives plus générales de la récompense (Cartoni et al., 2016; Corbit & Balleine, 2005). Par exemple, l'odeur (CS) de biscuits (US) peut inciter la recherche de cet aliment spécifique (PIT spécifique) ou bien motiver des comportements de recherche de nourriture en général (PIT général). Le PIT spécifique et le PIT général sont également régulés par différents substrats neuronaux, tels que décrits aux sections 2.1 et 2.2 du chapitre I.

### 1.3.3 Les modèles de PIT

Il existe aussi des différences au niveau des modèles pour étudier le PIT. Certaines études utilisent un **modèle PIT simple à une récompense (voir tableau 3)** (Hall, Parkinson, Connor,

Dickinson, & Everitt, 2001; Holland & Gallagher, 2003). Dans ce modèle, une seule action (e.g., appui sur le levier actif) délivre une récompense (US; e.g., biscuit) lors du conditionnement instrumental. Un levier inactif est également parfois disponible, mais son appui n'entraîne aucune conséquence. Durant le conditionnement Pavlovien, cette même récompense (biscuit) est associée à un CS (CS+), alors qu'un stimulus contrôle ne prédit aucune récompense (CS-). Durant le test, l'effet PIT est présent lorsque le nombre d'appuis sur le levier associé à l'US (levier actif) est plus élevé lors du CS+, comparé au CS- ou Pré-CS. La disponibilité d'une seule récompense dans ce modèle ne permet pas la distinction comportementale entre les deux types de PIT. En revanche, la littérature a tendance à associer ce modèle au PIT général, car l'association d'une seule action-récompense ne favoriserait pas la formation de représentations sensorielles détaillées de la récompense, mais plutôt la formation de représentations appétitives plus générales de la récompense (Cartoni et al., 2016; Holland, 2004).

Phase 1 : Conditionnement instrumental	Phase 2 : Conditionnement Pavlovien	Phase 3 : Test PIT
Levier 1 (actif) → US (biscuit) Levier 2 (inactif) → ∅	CS+ → US (biscuit) CS- → ∅	<b>Pré-CS, CS+, CS- :</b> Levier 1 → ∅ Levier 2 → ∅

**Tableau 3. Design expérimental d'un modèle PIT simple à une récompense.** ∅, pas de récompense délivrée; CS+, stimulus conditionné; CS-, stimulus contrôle (neutre); US, stimulus non conditionné; Pré-CS, période précédant les CS (baseline).

Le **modèle PIT spécifique (voir tableau 4)** utilise durant le conditionnement instrumental deux options d'actions, chacune délivrant une récompense différente (e.g., Levier 1 → biscuit, Levier 2 → noix). Lors du conditionnement Pavlovien, chaque récompense est associée à un CS différent (CS1 → biscuit, CS2 → noix) (Blundell, Hall, & Killcross, 2001; Cartoni et al., 2016; Holland, 2004). Durant le test, ce modèle mesure le PIT spécifique, où chacun des deux CS incite préférentiellement l'appui sur le levier avec lequel il partage une récompense (CS1 → Levier 1 > Levier 2; CS2 → Levier 2 > Levier 1).

Phase 1 : Conditionnement instrumental	Phase 2 : Conditionnement Pavlovien	Phase 3 : Test PIT
Levier 1 → US1 (biscuit) Levier 2 → US2 (noix)	CS1 → US1 (biscuit) CS2 → US2 (noix)	<b>Pré-CS, CS1, CS2 :</b> Levier 1 → ∅ Levier 2 → ∅

**Tableau 4. Design expérimental d'un modèle PIT spécifique.** ∅, pas de récompense délivrée; CS, stimulus conditionné; US, stimulus non conditionné; Pré-CS, période précédant les CS (baseline).

Enfin, certaines études utilisent un **modèle PIT complet (voir tableau 5)**. Durant le conditionnement instrumental, il y a deux options d'actions, chacune délivrant une récompense différente (e.g., Levier 1 → biscuit, Levier 2 → noix). Lors du conditionnement Pavlovien, trois CS sont présentés : deux CS sont associés avec les récompenses délivrées par les actions (CS1 → biscuit, CS2 → noix), tandis qu'un troisième CS est associé avec une récompense qui n'est partagée avec aucune action (CS3 → yogourt). Ce dernier modèle a pour avantage de permettre la distinction comportementale entre le PIT spécifique et le PIT général dans une seule expérience (Corbit & Balleine, 2005, 2011): le PIT général s'observe lorsque la présentation du CS3 augmente les appuis sur les leviers 1 ou 2 (CS3 → Leviers 1 ou 2 > Pré-CS); le PIT spécifique se reflète lorsque les CS1 et CS2 incitent préférentiellement les appuis sur les leviers avec lesquels ils partagent une récompense (CS1 → Levier 1 > Levier 2; CS2 → Levier 2 > Levier 1).

Phase 1 : Conditionnement instrumental	Phase 2 : Conditionnement Pavlovien	Phase 3 : Test PIT
Levier 1 → US1 (biscuit) Levier 2 → US2 (noix)	CS1 → US1 (biscuit) CS2 → US2 (noix) CS3 → US3 (yogourt)	<b>Pré-CS, CS1, CS2, CS3 :</b> Levier 1 → Ø Levier 2 → Ø

**Tableau 5. Design expérimental d'un modèle PIT complet.** Ø, pas de récompense délivrée; CS, stimulus conditionné; US, stimulus non conditionné; Pré-CS, période précédant les CS (baseline).

#### 1.4 Les différences sexuelles dans la réponse aux CS

La plupart des recherches sur les propriétés prédictives et motivationnelles des CS ont été conduites chez des rats mâles (Pitchers et al., 2015; Becker & Koob, 2016). Cependant, certaines études ont comparé les deux sexes dans leurs comportements conditionnés. Par exemple, Feltenstein, Henderson et See (2011) ont découvert que le sexe n'influence pas la capacité des CS à induire le rétablissement de la recherche de cocaïne chez des rats après extinction. De même, Pitchers et ses collègues (2015) n'ont pas observé de différences sexuelles notables dans la motivation des rats à appuyer sur un levier pour obtenir la présentation de CS associés à la nourriture. En revanche, des études de Delamater, Schneider et Derman (2017) ainsi que d'Hammerslag et Gulley (2014) suggèrent que les sexes diffèrent dans leur réponse à l'extinction Pavlovienne du PIT ou de l'approche conditionnée. En effet, lorsque les rats reçoivent des sessions d'extinction Pavlovienne (durant lesquelles la récompense n'est plus délivrée lors du CS), la recherche de la récompense en réponse au CS diminue lors du test PIT, mais de façon

plus importante chez les mâles versus les femelles (Delamater et al., 2017). Ainsi, l'effet PIT serait davantage résistant à l'extinction Pavlovienne chez les femelles.

## 2. Les régions neuronales impliquées dans le PIT

Depuis le début de ce siècle, de nombreuses études ont approfondi notre compréhension du réseau de régions neuronales régulant les effets des CS sur la recherche de récompense. Ces régions neuronales sont décrites aux sections 2.1 et 2.2 suivantes.

### 2.1 L'aire tegmentaire ventrale et le noyau accumbens

L'aire tegmentaire ventrale (VTA, *ventral tegmental area*) et le noyau accumbens (NAc, *nucleus accumbens*) (**voir figure 1**) sont impliqués dans la capacité des CS à stimuler le désir pour une récompense et potentialiser des actions instrumentales visant à l'obtenir. En effet, des lésions de la VTA diminuent la libération de dopamine dans le NAc et réduisent l'amplitude du PIT (Corbit et al., 2007). De même, l'injection d'un antagoniste dopaminergique dans le NAc diminue l'effet PIT (Lex & Hauber, 2008), tandis que l'injection d'un agoniste dopaminergique amplifie cet effet (Wyvell & Berridge, 2000, 2001). Par ailleurs, le NAc est divisé en deux régions distinctes, le cœur « core » et la coquille « shell », et une étude de lésions suggère que la coquille du NAc régule le PIT spécifique, tandis que le cœur du NAc module le PIT général (Corbit & Balleine, 2011).

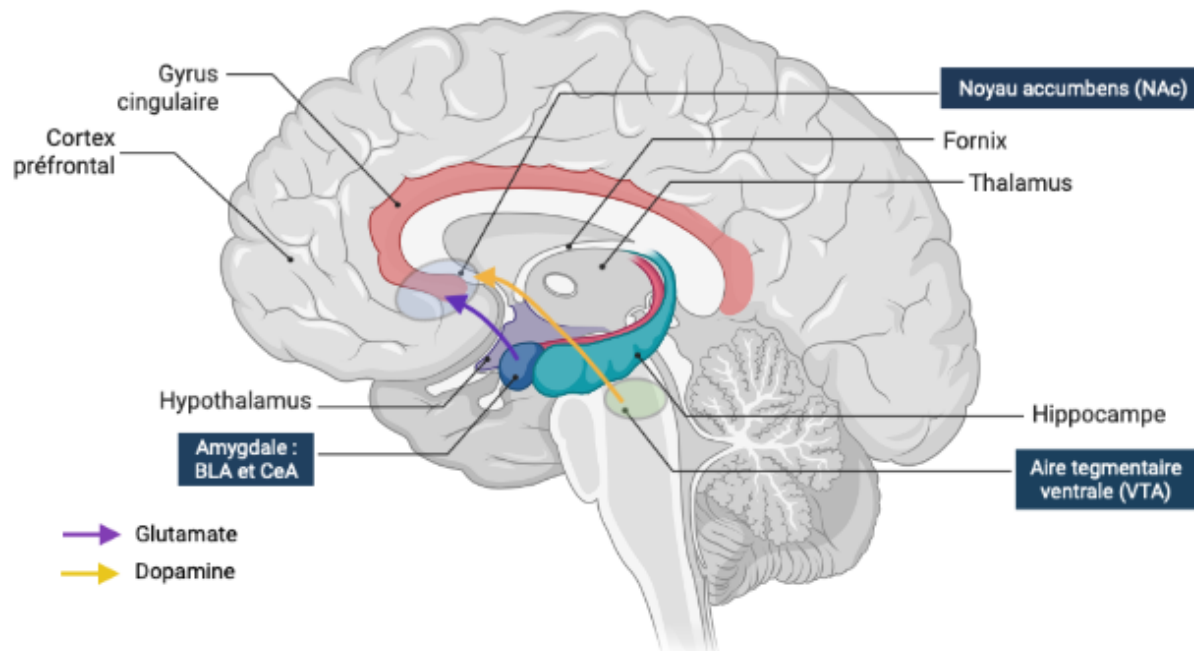
### 2.2 L'amygdale et ses projections

L'**amygdale** est une structure complexe située dans le lobe temporal (**voir figure 1**) et composée de multiples noyaux interconnectés. Le complexe de l'amygdale basolatérale (BLA, *basolateral complex of the amygdala*) se compose principalement de projections glutamatergiques (80–85%) et d'interneurones GABAergiques (15–20%) (Sah, Faber, Lopez De Armentia, & Power, 2003; Spampinato, Polepalli, & Sah, 2011), tandis que le noyau central de l'amygdale (CeA, *central nucleus of the amygdala*) comprend principalement des neurones GABAergiques (Janak & Tye, 2015). L'amygdale est traditionnellement connue pour son rôle dans le conditionnement et l'extinction de la peur (LeDoux, 2003; Marin, Camprodon, Dougherty, & Milad, 2014). Cependant, elle est également une région clé pour la recherche de récompense évoquée par un CS. Dans une étude chez le rat, les neurones de la BLA s'activent en réponse à la présentation d'un CS associé à une récompense. Cette activation déclenche un état motivationnel durant lequel les rats recherchent la récompense de façon plus intense (Tye & Janak, 2007). De plus, des études de lésions chez le rat (Corbit & Balleine, 2005) ou d'imagerie

par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) chez l'humain (Prevost et al., 2012) suggèrent que la BLA régule le PIT spécifique, alors que la CeA module le PIT général.

Les informations de l'environnement sont reçues par la BLA via des afférences provenant du thalamus et des cortex sensoriels. Des connexions réciproques lient également la BLA au cortex préfrontal, à l'hippocampe et aux aires sensorielles associatives (Janak & Tye, 2015; McDonald, 1998; Sah et al., 2003). De plus, la BLA émet des projections en direction du NAc, de la strie terminale et de la CeA. Ces trois régions permettraient quant à elles de traduire les informations de la BLA en comportements (Janak & Tye, 2015). Des études suggèrent que les projections de la BLA vers le NAc jouent un rôle particulièrement important dans la recherche de récompense évoquée par un CS. Par exemple, l'inactivation BLA → NAc prévient le rétablissement de la recherche de cocaïne évoquée par un CS après extinction (Stefanik & Kalivas, 2013). De même, Shiflett et Balleine (2010) ont démontré que l'inactivation BLA → NAc diminue l'expression du PIT. Enfin, les projections de la BLA vers le cortex orbitofrontal (OFC, *orbitofrontal cortex*) sont également critiques pour la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense, puisque l'inactivation BLA → OFC atténue l'expression du PIT (Lichtenberg et al., 2017).

D'autres études ont démontré que la **transmission glutamatergique au niveau de la BLA** est impliquée dans la régulation de la réponse comportementale aux CS. Ainsi, le système glutamatergique est présenté dans la prochaine section avec une emphase sur la BLA (voir section 3.3, chapitre I).



**Figure 1. Schéma des régions neuronales impliquées dans le PIT.** Le NAc reçoit de la dopamine de la VTA, ainsi que du glutamate provenant de la BLA [image créée sur biorender.com].

### 3. Le système glutamatergique

#### 3.1 Le glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur principal dans le système nerveux des mammifères (Takamori, 2006). Il joue un rôle dans presque toutes les fonctions nerveuses, notamment la cognition, la mémoire et l'apprentissage (Imre, 2007). La plupart du glutamate se retrouve dans les terminaisons axonales, où il est synthétisé par des enzymes glutaminases mitochondriales, particulièrement abondantes dans cette région des neurones (Aoki, Kaneko, Starr, & Pickel, 1991; Marquez et al., 2009). Le glutamate dans les terminaisons neuronales est concentré à l'intérieur de vésicules synaptiques par des transporteurs de glutamate vésiculaire (**VGluts**) (Takamori, 2006). En réponse à l'arrivée d'un potentiel d'action permettant l'ouverture de canaux calcium ( $Ca^{2+}$ ) voltage-dépendants et un taux accru de  $Ca^{2+}$  cytosolique, ces vésicules synaptiques fusionnent à la membrane plasmique des neurones, libérant le glutamate dans la fente synaptique. Ce dernier peut ensuite se lier à des récepteurs glutamatergiques de la membrane postsynaptique, complétant ainsi la transmission synaptique. Suite à sa libération par le neurone présynaptique, le glutamate peut également se lier à des récepteurs glutamatergiques

de la membrane présynaptique (transmission autocrine) ou se lier à des récepteurs glutamatergiques de cellules voisines (transmission paracrine) (Featherstone, 2010).

### 3.2 Les récepteurs glutamatergiques

Les récepteurs glutamatergiques se divisent en deux grandes catégories: les récepteurs ionotropes (**iGluRs**) et les récepteurs métabotropes (**mGluRs**) (Kew & Kemp, 2005; Ozawa, Kamiya, & Tsuzuki, 1998).

#### 3.2.1 Les récepteurs ionotropes

Les iGluRs sont des canaux ioniques ligand-dépendants. Ces récepteurs sont sous-divisés en trois principaux types: récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole-propionate (AMPA), récepteurs *N*-méthyl-D-aspartic acid (NMDA) et récepteurs Kainate (Kew & Kemp, 2005). En général, les iGluRs sont localisés sur la membrane postsynaptique. La liaison du glutamate synaptique au domaine extracellulaire des iGluRs déclenche l'ouverture de leur canal et l'influx des cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui mène normalement à la dépolarisation de la membrane postsynaptique (Kew & Kemp, 2005; Ozawa et al., 1998; Schoepp, 2001). L'activation des récepteurs AMPA permet la majorité de la **transmission excitatrice rapide du glutamate** dans le système nerveux (Derkach, Oh, Guire, & Soderling, 2007). Les récepteurs NMDA quant à eux ont la particularité de s'ouvrir plus longtemps permettant l'entrée d'une concentration importante de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'initiation de cascades de signalisation intracellulaire dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces cascades peuvent entraîner des changements dans l'expression de gènes, du nombre ou fonctionnement des synapses, modifiant ainsi l'efficacité synaptique (**plasticité synaptique**). Cette capacité est à la base de l'apprentissage et de la mémoire (Rudy, 2014; Whitlock, Heynen, Shuler, & Bear, 2006). Enfin, les récepteurs Kainate peuvent être postsynaptiques et participer à la transmission synaptique, mais ils peuvent aussi être présynaptiques, où ils exercent des fonctions régulatrices sur la libération du glutamate (Pinheiro & Mulle, 2006).

#### 3.2.2 Les récepteurs métabotropes

Les mGluRs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont sous-divisés en trois principaux types: groupe I (mGlu<sub>1/5</sub>), groupe II (mGlu<sub>2/3</sub>) et groupe III (mGlu<sub>4/6/7/8</sub>). La liaison du glutamate au domaine extracellulaire des mGluRs déclenche des changements de conformation du récepteur qui mènent à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire dépendante des protéines G (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010). Les mGluRs sont largement répartis dans l'ensemble du système



nerveux central, ce qui suggère que ces récepteurs jouent un rôle dans de nombreuses fonctions nerveuses. Leur localisation ainsi que leur fonction de **modulation positive ou négative de la transmission glutamatergique** varient selon le sous-type de mGluRs (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010; Schoepp, 2001). Par exemple, les mGluRs du groupe I sont principalement situés sur la membrane postsynaptique et leur activation mène souvent à la dépolarisation de la membrane et l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Au contraire, les mGluRs des groupes II ou III sont majoritairement localisés sur la membrane présynaptique, où ils inhibent la libération synaptique de neurotransmetteurs, comme le glutamate (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010). Un contrôle plus précis de l'excitation au sein du système nerveux est possible grâce à l'expression différentielle de ces sous-types de mGluRs à certaines synapses et régions du cerveau. Ainsi, un large éventail de pathologies neurologiques ou psychiatriques impliquant une altération de l'excitabilité des circuits neuronaux (par exemple, l'addiction) pourrait potentiellement être traité avec des agents pharmacologiques ciblant les différents sous-types de mGluRs (Imre, 2007; Schoepp, 2001).

### 3.3 L'homéostasie glutamatergique

La majorité du glutamate extracellulaire dans le système nerveux est extrasynaptique non-vésiculaire et a des fonctions importantes de signalisation paracrine (Featherstone, 2010). Le glutamate extrasynaptique est principalement libéré par l'échangeur cystine-glutamate en échange de molécules de cystine. Cet échangeur est surtout exprimé au niveau des cellules gliales (Baker, Xi, Shen, Swanson, & Kalivas, 2002). Dans le système nerveux, le glutamate extracellulaire se divise donc en deux ensembles: le glutamate synaptique et le glutamate extrasynaptique (Featherstone, 2010). **L'homéostasie glutamatergique** repose sur l'équilibre entre la libération et l'élimination du glutamate synaptique et extrasynaptique, et contrôle l'accès du glutamate aux récepteurs iGluRs et mGluRs (Kalivas, 2009) (**voir figure 2**). Cet équilibre empêche que des concentrations trop élevées de glutamate extracellulaire entraînent une surstimulation des NMDA, l'apoptose et la nécrose neuronale (appelée « excitotoxicité glutamatergique »), engendrée principalement par l'entrée massive de  $Ca^{2+}$  (Magi, Piccirillo, Amoroso, & Lariccia, 2019).

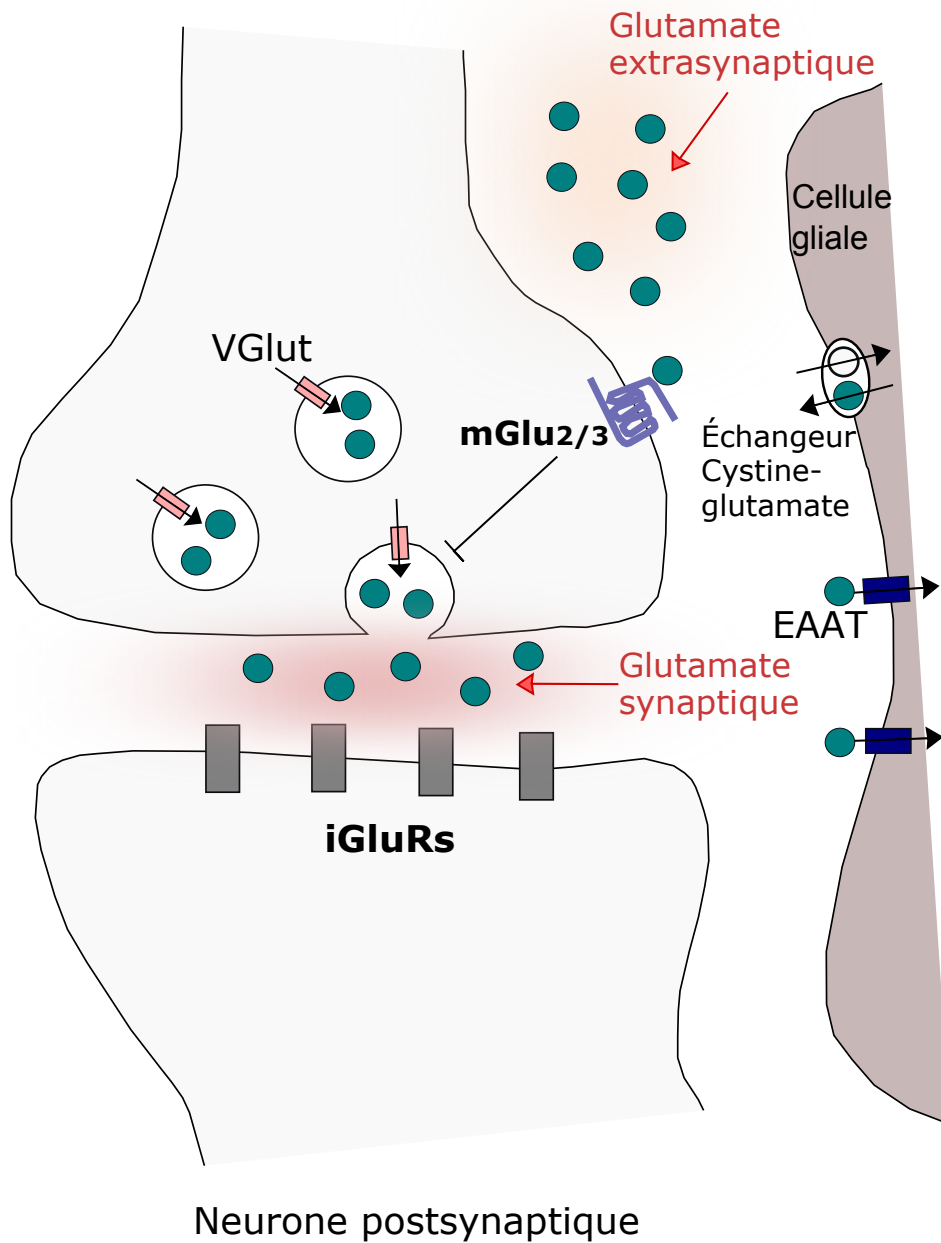
Le glutamate est éliminé des fluides extracellulaires grâce aux transporteurs d'acides aminés excitateurs (**EAATs**, *excitatory amino acid transporters*) majoritairement présents sur les cellules gliales (astrocytes) (Danbolt, 2001). Les astrocytes sont ainsi principalement responsables du recyclage du glutamate qui est converti en glutamine, puis libéré dans l'espace

extracellulaire, et finalement repris par les neurones pour être reconverti en glutamate. L'importation du glutamate via les EAATs est couplée au transport du sodium et potassium le long de leur gradient de concentration (Danbolt, 2001; Featherstone, 2010). En important le glutamate dans les astrocytes, les EAATs exercent trois fonctions: *i*) ils participent au maintien de concentrations non-toxiques de glutamate extracellulaire, *ii*) ils protègent les mGluRs extrasynaptiques de l'exposition au glutamate synaptique, et *iii*) inversement, ils réduisent l'influence du glutamate extrasynaptique sur les iGluRs de la fente synaptique (Kalivas, 2009).

Les récepteurs glutamatergiques métabotropes du groupe II (**mGlu<sub>2/3</sub>**) sont majoritairement situés sur les terminaisons de neurones glutamatergiques et extrasynaptiques vis-à-vis de l'échangeur cystine-glutamate. Cette localisation stratégique les expose à un tonus glutamatergique basal constant (Kalivas, 2009). Les mGlu<sub>2/3</sub> sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine Gi/o. Leur stimulation par le glutamate inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et la formation d'AMPc via l'ATP (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010). Par conséquent, leur activation diminue la libération synaptique de glutamate et l'excitabilité des neurones de projection. La libération synaptique de glutamate est ainsi hautement régulée par des mécanismes de rétroaction négative, lorsque les mGlu<sub>2/3</sub> sont activés par le glutamate extrasynaptique. Ces mécanismes participent eux-aussi à la protection contre l'hyperexcitabilité glutamatergique (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010; Schoepp, 2001).

Comme mentionné en section 2.2, les neurones glutamatergiques de la BLA jouent un rôle particulièrement important dans la modulation des propriétés motivationnelles des CS (Derman, Bass, & Ferrario, 2020). En effet, le glutamate est le signal principal entrant dans la BLA, et la réponse comportementale aux CS implique le renforcement des synapses glutamatergiques entre le thalamus et la BLA (Tye, Stuber, de Ridder, Bonci, & Janak, 2008). De plus, le blocage de récepteurs glutamatergiques ionotropes AMPA (Malvaez et al., 2015) et NMDA (Feltenstein & See, 2007) dans la BLA diminue la recherche de récompense évoquée par des CS. Enfin, Malvaez et ses collègues (2015) ont démontré que la fréquence de libération du glutamate dans la BLA est positivement corrélée aux actions instrumentales évoquées par des CS. Des altérations de l'homéostasie glutamatergique dans la BLA et ses projections pourraient ainsi être liées à l'attribution pathologique d'une valeur motivationnelle à un CS, comme dans l'addiction.

Neurone présynaptique  
Terminaison glutamatergique



**Figure 2. Homéostasie glutamatergique.** Le glutamate extracellulaire se divise en 2 compartiments fonctionnellement distincts et en équilibre (glutamate synaptique et extrasynaptique) [adapté de Featherstone (2010)].

## DONNÉES RÉCENTES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les sons, les images et les odeurs qui prédisent des récompenses peuvent acquérir des propriétés motivationnelles leur permettant d'influencer le comportement animal (Bindra, 1978; Bolles, 1972). Pour étudier ces propriétés, nous avons utilisé le « transfert pavlovien-à-instrumental (PIT) » comme modèle comportemental, puisque contrairement à d'autres tâches comportementales, les conditions d'extinction (i.e., récompense omise) lors du test PIT permettent l'évaluation des propriétés motivationnelles du CS, sans l'influence confondante du renforcement par la récompense primaire (Dickinson & Balleine, 1994; Rescorla & Solomon, 1967; Wyvell & Berridge, 2000, 2001). De plus, le PIT exclut l'influence confondante du renforcement par le CS (renforcement secondaire), puisque la présentation du CS est non-contingente (indépendante) de la réponse instrumentale (Wyller & Berridge, 2000). Dans une première étude, l'objectif était de sélectionner les paramètres de notre modèle et de confirmer un effet PIT dans des conditions de base chez un groupe de rats mâles, puisque cet effet peut être subtile chez le rat selon les paramètres sélectionnés (Delamater & Holland, 2008; Wyvell & Berridge, 2000). Pour notre étude, les rats sous restriction d'eau ont appris à appuyer sur un levier pour obtenir de l'eau (la récompense). Ils ont ensuite appris qu'un stimulus auditif (CS+) prédit la livraison d'eau, tandis qu'un stimulus auditif différent (CS-) ne signale aucune récompense. Le jour du test PIT, ils ont pu appuyer à nouveau sur le levier, mais sous extinction (i.e. sans eau), et nous avons évalué l'influence de la présentation non-contingente des CS+ et CS-. Par ailleurs, nous avons utilisé des CS d'une durée de 2 min chacun et des horaires de renforcement à intervalle variable (VI), puisque ces paramètres sont reconnus pour promouvoir l'expression du PIT (Holmes et al., 2010; Lovibond, 1983). Nous nous attendions à ce que les rats appuient davantage sur le levier pendant le CS+ comparé au CS-, indiquant un effet PIT.

La plupart des recherches sur les mécanismes neuronaux sous-jacents aux propriétés motivationnelles des CS se sont concentrées sur le système dopaminergique mésolimbique (Wyller & Berridge, 2000, 2001; Berridge and Robinson, 1998). La BLA quant à elle est une région neuronale moins connue dans le contexte des stimuli de récompense. Des études de lésions chez le rat (Blundell et al., 2001; Corbit & Balleine, 2005) et d'IRMf chez l'humain (Prevost et al., 2012; Talmi, Seymour, Dayan, & Dolan, 2008) suggèrent que la BLA régule les propriétés motivationnelles des CS. D'autres études ont démontré que la transmission excitatrice rapide du glutamate au niveau de **la BLA** joue un rôle dans la modulation des propriétés motivationnelles des CS. Par exemple, le blocage de **récepteurs glutamatergiques ionotropes AMPA/NMDA** dans la BLA diminue la recherche de récompense évoquée par des CS (Feltenstein & See, 2007;

Malvaez et al., 2015). Toutefois, les contributions des **mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA** sont inconnues. Pourtant, les mGlu<sub>2/3</sub> semblent jouer un rôle unique dans la réponse comportementale aux CS. En effet, des études ont démontré que l'administration systémique d'un agoniste des mGlu<sub>2/3</sub> diminue le rétablissement de la recherche de drogue évoquée par un CS après extinction (Backstrom & Hyytia, 2005; Baptista, Martin-Fardon, & Weiss, 2004; Bossert, Busch, & Gray, 2005; Bossert, Poles, Sheffler-Collins, & Ghitza, 2006; Zhao et al., 2006). De plus, les mGlu<sub>2/3</sub> sont exprimés à des niveaux élevés dans la BLA (Ohishi, Neki, & Mizuno, 1998; Petralia, Wang, Niedzielski, & Wenthold, 1996). Dans une deuxième étude, notre objectif était donc d'étudier les effets d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA sur la capacité d'un CS à potentialiser la recherche d'une récompense, telle que mesurée par le PIT. Puisque l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> diminue la libération synaptique de glutamate (Conn & Pin, 1997; Niswender & Conn, 2010; Schoepp, 2001), notre hypothèse était que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA diminue le PIT, dû à la réduction de la libération de glutamate. Ainsi, chez un nouveau groupe de rats mâles, les mêmes méthodes ont été appliquées avec un agoniste des mGlu<sub>2/3</sub>, le LY379268 (0, 3 ou 6 µg/0,5 µl/hémisphère) administré dans la BLA avant le test PIT.

Dans une troisième étude, nous avons inclus des rats femelles à notre protocole, puisque la majorité des recherches sur les effets des CS ont été conduites chez des rats mâles et qu'il y a des limites à la généralisation des résultats obtenus chez les mâles aux femelles (Becker & Koob, 2016; Prendergast, Onishi, & Zucker, 2014; Shansky, 2019; Shansky & Murphy, 2021). De plus, les données actuelles sur les différences sexuelles dans la réactivité aux CS chez l'humain sont mitigées, suggérant que les femmes sont plus (Perkins et al., 2001; Robbins et al., 1999), moins (Sterling, Dean, Weinstein, Murphy, & Gottheil, 2004) ou autant (Avants, Margolin, Kosten, & Cooney, 1995; Negrete & Emil, 1992; Rubonis et al., 1994; Waldrop et al., 2010) sensibles aux effets des CS associés aux drogues par rapport aux hommes. De même, des études chez le rat suggèrent que les femelles et les mâles montrent des comportements conditionnés similaires (Feltenstein et al., 2011; Pitchers et al., 2015) alors que d'autres suggèrent que les deux sexes peuvent différer dans leur réponse aux CS après extinction (Delamater et al., 2017; Hammerslag & Gulley, 2014). Cependant, la plupart de ces études utilisent des tâches comportementales qui n'excluent pas l'influence du renforcement secondaire puisque la présentation du CS est contingente à la réponse instrumentale, contrairement au modèle comportemental PIT (Wyvell & Berridge, 2000). Par conséquent, l'objectif de la troisième étude était d'examiner les similitudes et les différences dans la capacité d'un CS à potentialiser la recherche d'une récompense entre les rats mâles et femelles, en utilisant le modèle PIT. Puisque la littérature rapporte davantage

de similitudes que de différences sexuelles dans les comportements conditionnés, nous nous attendions à ce que le sexe n'influence pas l'effet PIT.

Certains mécanismes neuronaux sous-jacents aux propriétés motivationnelles des CS peuvent également différer entre les sexes. Par exemple, la recherche de cocaïne évoquée par un CS déclenche une plus grande expression de la protéine Fos, un marqueur d'activité neuronale, dans les régions mésocorticolimbiques de rats femelles par rapport aux mâles (Johnson et al., 2019; Zhou et al., 2014). En revanche, aucune étude n'a rapporté, à notre connaissance, les contributions des mGlu<sub>2/3</sub> dans les propriétés motivationnelles des CS chez les femelles. Ainsi, l'objectif de la dernière étude était de comparer les effets d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> sur l'expression du PIT entre les sexes. Des rats mâles et femelles ont reçu des injections sous-cutanées de LY379268 (0, 0.3 ou 1 mg/kg) 30 min avant le test PIT. Comme aucune différence sexuelle notable n'a été observée dans l'effet PIT lors de notre troisième étude, nous nous attendions à pouvoir mettre en commun les résultats des mâles et des femelles obtenus durant le test PIT. Cette étude permet de comparer le rôle adaptatif des CS dans la recherche quotidienne de récompenses essentielles (e.g., eau ou nourriture) entre les sexes, puisque les effets motivationnels du CS observés sur le comportement des rats étaient normaux (i.e., non pathologiques). Par ailleurs, étant donné que les CS peuvent aussi être des déclencheurs de la rechute chez les toxicomanes (Ehrman et al., 1992; O'Brien et al., 1998), une meilleure compréhension des différences et similitudes entre les sexes dans les effets des CS et les mécanismes sous-jacents est nécessaire pour fournir des informations sur la manière de concevoir un traitement et des ressources pour l'addiction qui seraient plus efficaces et adaptés au sexe.

## **CHAPITRE II: ARTICLE 1**

# METABOTROPIC GROUP II GLUTAMATE RECEPTORS IN THE BASOLATERAL AMYGDALA MEDIATE CUE-TRIGGERED INCREASES IN INCENTIVE MOTIVATION

Caroline Garceau<sup>1\*</sup>, Anne-Noël Samaha<sup>1, 3\*</sup>, Thomas Cordahi<sup>2</sup>, Alice Servonnet<sup>2</sup>, Shaun Yon-Seng Khoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada. <sup>2</sup> Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada. <sup>3</sup> CNS Research Group, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

\*These authors contributed equally to this work.

## Corresponding Author:

Anne-Noël Samaha, PhD  
Department of Pharmacology and Physiology  
Université de Montréal C.P. 6128, Succursale Centre-ville  
Montréal, Québec  
H3C 3J7  
Canada  
Tel: 514 343 6111 x. 32788  
Fax: 514 343 2291  
Anna.samaha@umontreal.ca



## **CONTRIBUTION DES CO-AUTEURS**

Avec le soutien de la Dre Alice Servonnet et du Dr Shaun Khoo, j'ai effectué les sessions d'entraînement et tests comportementaux, ainsi que la collecte et l'analyse de l'ensemble des données des 2 expériences. J'ai rédigé l'article avec ma directrice de recherche, Dre Anne-Noël Samaha, et mes collègues co-auteurs, Dr Shaun Khoo et Dre Alice Servonnet. Dr Shaun Khoo a effectué les chirurgies et microinjections intracérébrales requises pour la seconde expérience. Lors de son stage avec moi, Thomas Cordahi a participé aux procédures comportementales de la seconde expérience.

## **ACCORD DES CO-AUTEURS**

L'accord des co-auteurs a été obtenu pour inclure dans ce mémoire l'article intitulé « Metabotropic group II glutamate receptors in the basolateral amygdala mediate cue-triggered increases in incentive motivation », publié dans le journal *Psychopharmacology*.

## **Abstract**

*Rationale.* Reward-associated cues can trigger incentive motivation for reward and invigorate reward-seeking behaviour via Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT). Glutamate signaling within the basolateral amygdala (BLA) modulates cue-triggered increases in incentive motivation. However, the role of BLA metabotropic group II glutamate (mGlu<sub>2/3</sub>) receptors is largely unknown.

*Objectives.* In Experiment 1, we characterized cue-triggered increases in incentive motivation for water reward using the PIT paradigm. In Experiment 2, we assessed the influence of intra-BLA microinjections of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 on this effect.

*Methods.* Water-restricted male Sprague-Dawley rats learned to press a lever for water. Separately, they learned to associate one of two auditory cues with free water. On test days, rats could lever press under extinction conditions (no water), with intermittent, non-contingent CS+ and CS- presentations. In Experiment 1, rats were tested under baseline conditions. In Experiment 2, rats received intra-BLA microinjections of LY379268 (0, 3 and 6 µg/hemisphere) before testing.

*Results.* Across experiments, CS+, but not CS- presentations increased water-associated lever pressing during testing, even though responding was reinforced neither by water nor the CS+. Intra-BLA LY379268 abolished both CS+ potentiated pressing on the water-associated lever and CS+ evoked conditioned approach to the site of water delivery. LY379268 did not influence locomotion or instrumental and Pavlovian response rates during intervals between CS presentations or during the CS-, indicating no motor effects.

*Conclusions.* mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity in the BLA mediates CS-triggered potentiation of incentive motivation for reward, suppressing both CS-induced increases in instrumental pursuit of the reward and anticipatory approach behaviour.

**Keywords:** Instrumental conditioning, Pavlovian conditioning, Pavlovian-to-instrumental transfer, basolateral amygdala, glutamate, mGlu<sub>2/3</sub> receptors

## INTRODUCTION

Environmental cues that predict rewards can acquire incentive motivational properties, enabling these cues to trigger and energize pursuit of the associated rewards (Bindra, 1978; Bolles, 1972). Cue-triggered increases in incentive motivation can be adaptive, guiding animals towards rewards needed for survival, such as food, water and safety. However, too much conditioned incentive motivation can contribute to excessive reward seeking as in addiction or overeating, and conversely too little of it can contribute to low levels of reward seeking, as in depression and anxiety (Everitt, Dickinson, & Robbins, 2001; Ludwig, Wikler, & Stark, 1974; O'Brien, Childress, Ehrman, & Robbins, 1998; Olney, Warlow, Naffziger, & Berridge, 2018). It is therefore of interest to understand the neural mechanisms by which cues trigger incentive motivation to guide reward-seeking behaviour.

In both humans and laboratory animals, the amygdala and its basolateral complex (BLA) are involved in cue-triggered incentive motivation. For instance, activity in the amygdala increases during cue-evoked potentiation of reward seeking in humans (Prevost, Liljeholm, Tyszka, & O'Doherty, 2012; Talmi, Seymour, Dayan, & Dolan, 2008). Furthermore, findings in laboratory animals show that neural activity in the BLA mediates the response to reward cues. First, neural activity in the BLA and its projections is necessary for the expression of cue-induced incentive motivation. Lesioning the BLA, inactivating CamKII-containing BLA neurons or inactivating BLA projections to the orbitofrontal cortex or the nucleus accumbens disrupt cue-triggered potentiation of reward seeking (Blundell, Hall, & Killcross, 2001; Corbit & Balleine, 2005; Derman, Bass, & Ferrario, 2020; Lichtenberg et al., 2017; Shiflett & Balleine, 2010) (see also Gabriele & See, 2010; Puaud, Higuera-Matas, Brunault, Everitt, & Belin, 2021). Similarly, pharmacological disconnection of the BLA and insular cortex disrupts CS-evoked conditioned approach behaviours (Nasser, Lafferty, Lesser, Bacharach, & Calu, 2018). Second, neural activity within the BLA is sufficient to potentiate the incentive motivational properties of reward cues. For instance, optogenetic stimulation of BLA neurons both potentiates cue-evoked expectation of the primary reward during Pavlovian conditioning and also invigorates instrumental responding for reward-associated cues (Servonnet, Hernandez, El Hage, Rompre, & Samaha, 2020). Within the BLA, glutamate-mediated transmission influences the behavioral response to reward-associated cues. Intra-BLA injections of agents that block AMPA (Malvaez et al., 2015), NMDA (Feltenstein & See, 2007) or metabotropic glutamate type 5 receptors (Khoo, LeCocq, Deyab, & Chaudhri, 2019) disrupt cue-evoked appetitive responding.

In parallel, group II metabotropic glutamate receptors (mGlu<sub>2/3</sub>) are highly expressed in the BLA (Gu et al., 2008; Ohishi, Neki, & Mizuno, 1998; Petralia, Wang, Niedzielski, & Wenthold, 1996), and they may also have a role in cue-triggered incentive motivation for reward. These receptors are localized predominantly extrasynaptically on presynaptic terminals, and their activation suppresses both synaptic glutamate release and excitability of projection neurons (Conn & Pin, 1997; Imre, 2007; Schoepp, 2001). Intra-BLA injections of an mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist (LY379268) were found to have no effect on cue-induced reinstatement of extinguished cocaine-seeking behaviour (Lu, Uejima, Gray, Bossert, & Shaham, 2007), a response mediated at least in part by cue-triggered incentive motivation. This is in contrast to studies giving the agonist either systemically (Backstrom & Hyytia, 2005; Baptista, Martin-Fardon, & Weiss, 2004; Bossert, Poles, Sheffler-Collins, & Ghitza, 2006; Zhao et al., 2006) or into the central nucleus of the amygdala (Lu et al., 2007; Uejima, Bossert, Poles, & Lu, 2007), and showing reduced cue-induced reinstatement of extinguished reward-seeking behaviour. While these studies are informative, cue-induced reinstatement paradigms are not tests of pure cue-triggered incentive motivation, because instrumental responding at test is reinforced by cue presentation and thus also involves secondary reinforcement. As such, the contributions of BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors to cue-triggered incentive motivation remain to be examined.

Here, we sought to determine the extent to which activation of BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors modulates cue-triggered incentive motivation. To this end, we used Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT). PIT is a test of pure cue-triggered incentive motivation, because it measures this process without the confounding influences of primary or secondary reinforcement (Cartoni, Balleine, & Baldassarre, 2016; Rescorla & Solomon, 1967; Walker, 1942; Wyvell & Berridge, 2000). In PIT, subjects learn that a Pavlovian cue predicts a primary reward. Separately, they also learn to perform an instrumental response to obtain that reward. On test day, the subjects can perform the same instrumental response, but now under extinction conditions, where responding produces no reward and no cue. During testing, subjects receive free, intermittent presentations of the cue, and PIT is observed when cue presentation increases ongoing reward-seeking behaviour, indicating cue-triggered wanting of reward. Thus, in a first experiment, we characterized PIT under baseline conditions, because some studies in rats report that behavioural indices of PIT can be subtle (Delamater & Holland, 2008; Wyvell & Berridge, 2000). In a second experiment, we assessed the effects of intra-BLA microinjections of the mGlu<sub>2/3</sub> agonist LY379268 immediately prior to PIT tests.

## **METHODS**

### **Animals**

All procedures involving rats were *i)* approved by the animal ethics committee at the Université de Montréal, *ii)* followed 'Principles of laboratory animal care', and *iii)* adhered to Canadian Council on Animal Care guidelines. Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Montréal, Quebec, Canada) ordered at 200-225 g in Exp. 1 (N = 16) and 250-275 g in Exp. 2 (N = 16) on arrival, were housed 2 per cage in Exp. 1 or 1 per cage in Exp. 2, to avoid damage to intracerebral implants by conspecifics. The colony room was climate-controlled ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $30\pm 10\%$  humidity) and maintained on a reverse 12-hour light/dark cycle (lights off at 8:30 a.m.). Experiments were conducted during the dark phase. Upon arrival, rats had free access to food (Rodent 5075, Charles River Laboratories) and water. After 72 hours of acclimation to the animal colony, rats were handled daily for at least 3 days. Beginning at 4 days after their arrival in Exp. 1 or 7 days after intracerebral surgery in Exp. 2, rats had restricted water access to facilitate acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning, where water was the unconditioned stimulus (US). We used water as the US, because a water-paired cue has been shown to potentiate water-seeking behaviour in humans (i.e., a water-paired cue supports PIT) (De Tommaso, Mastropasqua, & Turatto, 2018). Rats first had 6 h/day of water access for 4 days, 4 h/day for the next 3 days, and then 2 h/day until the end of the experiments. Water was always given at least 1 hour after the end of testing, and at the same time each day.

### **Behavioural Apparatus**

Training and testing took place in standard operant chambers (31.8 x 25.4 x 26.7 cm; Med Associates, VT, USA) located in a testing room separate from the colony room. The operant chambers were placed in sound-attenuating boxes equipped with a fan that reduced external noise. Each chamber contained a tone generator located adjacent to the house light on the back wall, and a clicker located outside the chamber. On the opposite wall, there were two retractable levers (left active; right inactive) on either side of a water cup equipped with an infrared head entry detector. A liquid dispenser was calibrated to deliver 100  $\mu\text{L}$  drops of water into the cup. Locomotor activity was measured using 4 infrared photobeams spaced evenly at floor level. Chambers were connected to a PC running Med-PC IV.

## Exp. 1: Characterizing Pavlovian-to-Instrumental Transfer

*Instrumental conditioning.* All training and testing procedures for general (non-selective) PIT were adapted from Derman and Ferrario (2018). Figure 1a illustrates the training and testing timeline. Rats ( $n = 16$ ) first received instrumental conditioning where they learned to lever press for water. In the first session, water (100  $\mu$ L) was available on a fixed-ratio 1 reinforcement schedule (FR1). A second inactive lever was present throughout, but had no programmed consequences. Sessions ended after rats earned 50 water deliveries or 40 min. Rats received FR1 sessions until they earned 50 water deliveries within a session, before transitioning to a variable interval (VI) reinforcement schedule. Using interval schedules of reinforcement during instrumental training subsequently promotes the expression of PIT (Lovibond, 1983). The VI schedule was increased across 8 sessions (40 min/session), in the following sequence: two VI10 sessions (range: 5-15 sec), two VI30 sessions (range: 15-45 sec) and four VI60 sessions (range: 30-90 sec). Lever pressing was recorded throughout each training session.

*Pavlovian conditioning.* Next, rats received 8 Pavlovian conditioning sessions during which levers remained retracted, and rats now received presentations of two auditory stimuli, a 1800-Hz, 85-dB tone and a 10-Hz clicker (4 trials/CS). Each CS was presented for 2 min, because longer CSs (greater than 60 s) promote more robust PIT (Holmes, Marchand, & Coutureau, 2010). The mean inter-trial interval (ITI) was set at 180 s, ranging from 120-240 s, such that sessions were 44 min in total. One auditory stimulus was designated CS+ and concurrently paired with 4 US deliveries (100  $\mu$ L water) on a VI30 schedule (range: 15-45 s; first water delivery  $\geq 10$  s from CS onset), while the other auditory stimulus (CS-) was also presented 4 times, but was not paired with water. CS+ and CS- were presented in alternation during each session. Rats were assigned to receive the tone-CS+ or clicker-CS+ such that mean active lever presses across the last four VI60 sessions and the number of FR1 sessions required to earn 50 water deliveries/session were similar across the groups. Water cup entries were recorded throughout each session to determine the extent to which rats learned the CS-US association.

*Pavlovian-to-Instrumental transfer (PIT) testing.* After Pavlovian conditioning, rats received an instrumental reminder session identical to VI60 training described above. PIT testing began on the next day. During each 42-min PIT session, both levers were available throughout. We measured lever-pressing behaviour under extinction conditions (no water was delivered) to assess cue-triggered incentive motivation. After 10 minutes, each CS (CS+ and CS-) was

presented 4 times (2 min/presentation) in a counterbalanced order, with a fixed 2-min ITI. Lever responses, water cup entries and locomotion were recorded throughout the session.

## **Exp. 2: Effects of activating mGlu<sub>2/3</sub> receptors in the BLA on conditioned incentive motivation**

*Surgery.* Figure 3a illustrates the experimental timeline. A separate cohort of rats ( $n = 16$ ) weighing 325-375 g at the time of surgery was anesthetized with isoflurane (5% for induction, 2% for maintenance) and placed in a stereotaxic frame (Stoelting Co., IL, USA). Guide cannulae (26 GA, C315G, P1 Technologies, Roanoke, VA, USA) were implanted into the BLA at the following coordinates (in mm from bregma): AP -2.8, ML  $\pm$  5.0 and DV -6.2. Cannulae were occluded with dummies (C315CD) that were the same length as the cannulae. Injectors (33 GA, C315I, P1 Technologies) projected 2 mm beyond cannulae tips (final DV coordinate, -8.2 mm from Bregma). Four stainless steel screws were then anchored to the skull and cannulae were fixed with dental cement. Rats received preoperative carprofen (1.5 mg, s.c.) and penicillin (3000 IU, i.m.). Rats were given at least 7 days of recovery before beginning water restriction and behavioural training as described for Experiment 1.

*Microinjection Procedures.* After the instrumental reminder session, rats were habituated to the microinjection procedure with an intra-BLA microinjection of artificial cerebrospinal fluid (aCSF (1x); Cold Spring Harbor, 2011). Vehicle (0.5  $\mu$ l aCSF) was infused over 1 min through injectors connected to 5- $\mu$ L Hamilton syringes (7000 series, Hamilton Co., Reno, Nevada) controlled by a microsyringe pump (Harvard PhD 2000, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada). Injectors were left in place for 1 additional minute to allow diffusion. After this habituation microinjection, rats were returned to their home-cages.

Immediately prior to PIT tests, rats received bilateral infusions of aCSF, 3 or 6  $\mu$ g/hemisphere of LY379268 (Cat No.: 2453, Batch No.: 9B/232416, CAS No.: 191471-52-0, Tocris Bioscience, Oakville, Ontario), in a counterbalanced, within-subjects design. Between PIT tests, rats received 2 instrumental sessions and 1 Pavlovian session.

## **Histology**

Following the last PIT test, rats were deeply anesthetised with urethane (1.2 g/kg, i.p.) and decapitated. Brains were dissected and sectioned into 40  $\mu$ m-thick coronal slices at -20°C in a cryostat (Leica CM1850, Leica Biosystems, IL, USA). Coronal slices were then thaw-mounted on

glass slides, stained with thionin and examined according to a rat brain atlas (Paxinos & Watson, 1986) by an experimenter blind to data. Six rats were excluded following histology, because at least one of the two cannulae (1/hemisphere) was not in the BLA. Two of these 6 rats had unilateral BLA placements, while the remainder had heterogeneous placements dorsal, medial and/or lateral to the BLA. Behavioural data from these 6 rats are not shown due to heterogeneous cannula placements and the lack of sufficient statistical power to demonstrate a significant PIT effect in this group.

## **Statistical Analysis**

Data were analysed using SPSS 26 (IBM, Armonk, NY, USA). In Exp. 1, two-way repeated measures (RM) ANOVA was used to analyse active vs. inactive lever-pressing across instrumental conditioning sessions (Lever  $\times$  Session; both as within-subjects variables) and CS+ vs. CS- water cup entries across Pavlovian conditioning sessions (CS  $\times$  Session; both as within-subjects variables). During PIT tests, number of lever presses during CS+ vs. CS- were analysed using a two-way RM ANOVA (Lever  $\times$  CS; both as within-subjects variables). During PIT tests, number of water cup entries during CS+ vs. CS- were analysed using a two-tailed, paired *t*-test. We used Pearson's correlation coefficient to analyse the relationship between the rats' performance during Instrumental or Pavlovian conditioning and PIT testing and, because these analyses included CS+, CS- and ITI periods, unadjusted CS+, CS- and ITI response rates were used. In Exp. 2, two-way RM ANOVA was used to analyse Pavlovian (CS  $\times$  Session; as within-subjects variables) and instrumental conditioning (Lever  $\times$  Session; as within-subjects variables). Three-way RM ANOVA was also used to analyse LY379268 effects on lever pressing (LY379268  $\times$  CS  $\times$  Lever; all as within-subjects variables). Two-way RM ANOVA was used to analyse LY379268 effects on water cup entries/locomotion during PIT tests (LY379268  $\times$  CS; both as within-subjects variables). When interaction and/or main effects were significant, effects were analysed further using Bonferroni-adjusted multiple post-hoc comparisons. Where Mauchly's test of sphericity revealed a significant violation, the Greenhouse-Geisser correction was applied (for  $\epsilon < 0.75$ ). During PIT tests, lever-pressing rates during CS+ and CS- presentations, water cup entries and locomotion are presented as elevation scores over baseline responding, given by the 2-min ITI period immediately prior to each 2-min CS presentation (Corbit & Balleine, 2005; Derman & Ferrario, 2018; Khoo et al., 2019; Shiflett & Balleine, 2010). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The  $\alpha$  level was set at  $< 0.05$ . Underlying data and Med-PC code are available on Figshare (Garceau, Samaha, Cordahi, Servonnet, & Khoo, 2021).



## RESULTS

### Exp. 1: Characterization of Pavlovian-to-Instrumental Transfer

The rats increased their presses on the active lever across instrumental sessions (Fig. 1b; main effect of Session,  $F(2.16,32.34) = 15.29$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.27$ ). This is expected, as variable-interval schedules of reinforcement increase responding. In addition, across reinforcement schedules, rats pressed more on the active versus inactive lever (main effect of Lever,  $F(1,15) = 103.25$ ,  $p < 0.001$ ), and this difference increased across sessions (Lever  $\times$  Session interaction,  $F(2.23,33.46) = 16.74$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.28$ ). Thus, the rats learned the action-outcome contingency.

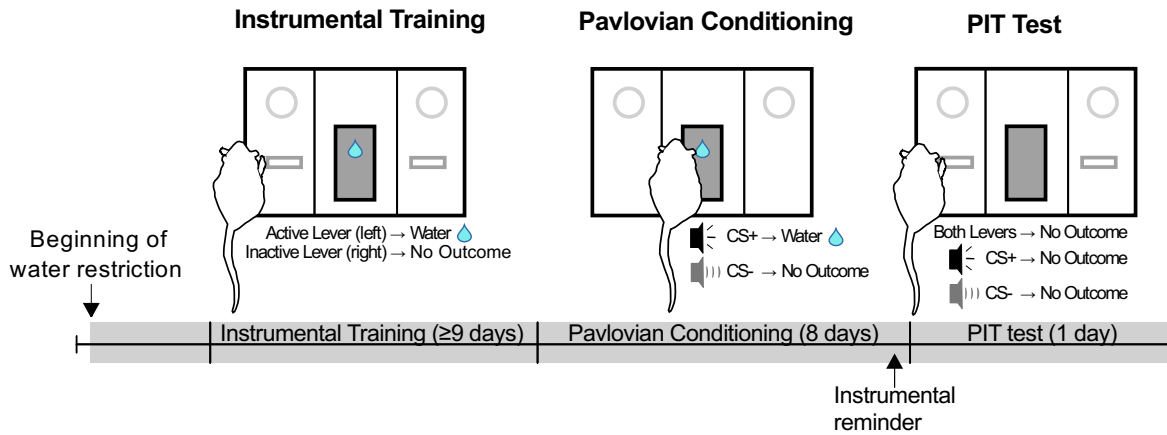
Rats next received Pavlovian conditioning. Fig. 1c shows average rates of water cup entries during the first 10 sec of CS+ and CS- presentation (i.e., prior to US delivery). Rats visited the water cup progressively more across sessions (main effect of Session,  $F(7,105) = 4.57$ ,  $p < 0.001$ ), in particular during CS+ compared to CS- presentations (Fig. 1c; main effect of CS,  $F(1,15) = 6.93$ ,  $p = 0.02$ ; CS  $\times$  Session interaction,  $F(7,105) = 2.81$ ,  $p = 0.01$ ). Thus, rats exhibited conditioned discrimination, indicating learning of the Pavlovian CS+/water association.

#### ***Cue-induced incentive motivation for water reward***

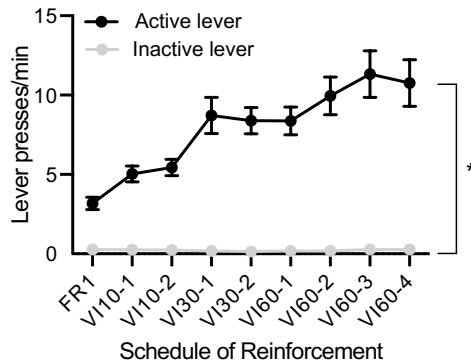
During PIT tests, rats could lever press, but this was not reinforced by water or the CS+ water cue. First, across the PIT test session, rats pressed more on the active than on the inactive lever (Fig. 1d; main effect of Lever,  $F(1, 5) = 24.96$ ,  $p < 0.001$ ), indicating significant water-seeking behaviour under extinction conditions, when no water was delivered. Second, the rats pressed more on the active lever during CS+ versus CS- presentations (main effect of CS  $F(1,15) = 17.51$ ; CS  $\times$  Lever interaction,  $F(1,15) = 26.33$ ; active lever pressing during CS+ > CS-; All  $P$ 's < 0.001). The rats also pressed *less* on the inactive lever during CS+ presentations than they did during CS- presentations ( $p = 0.03$ ). Thus, the CS+ both increased pressing on the water-associated lever and narrowed behavioural responding by decreasing pressing on the lever not associated with water. In contrast, a control cue (CS-) had no effect on lever-pressing behaviour.

Finally, rats exhibited cue-triggered discrimination of conditioned approach, preferentially visiting the water cup during CS+ versus CS- presentations (Fig. 1e; Paired t-test;  $t(15) = 4.61$ ,  $p < 0.001$ ). Together, these results indicate significant CS-triggered incentive motivation for water reward, as shown by PIT.

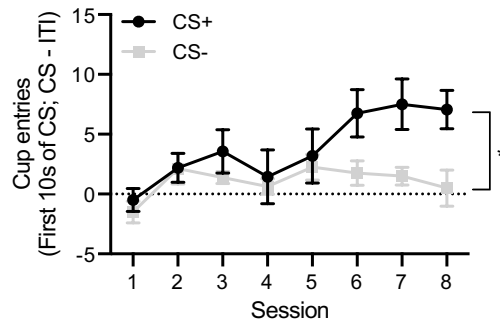
**a. Timeline and Behavioural Schematic**



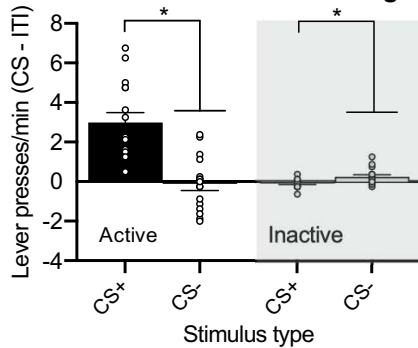
**b. Instrumental Training**



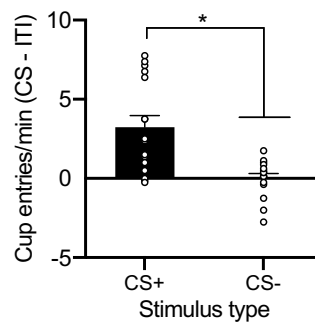
**c. Pavlovian Conditioning**



**d. PIT test: Lever Pressing**



**e. PIT test: Conditioned Discrimination**



**Fig. 1 After instrumental and Pavlovian conditioning, rats show significant Pavlovian-to-Instrumental transfer.** (a) Timeline and behavioural schematic for Experiment 1. (b) The rate of active lever presses increased over the daily 40-min instrumental training sessions. (c) The rate of water cup entries during the first 10 sec of each CS presentation was higher during CS+ relative to CS- presentations, and this difference increased over the daily 44-min Pavlovian conditioning sessions. (d) During a test for Pavlovian-to-instrumental transfer, CS+, but not CS- presentations invigorated lever pressing for water reward under extinction conditions. (e) During the test, rats also entered the water cup significantly more during CS+ compared to CS- presentations. In (c), water cup entries are shown as a difference score between responses during the first 10 sec of each CS presentation and during the last 10 sec of the inter-trial interval (ITI) immediately

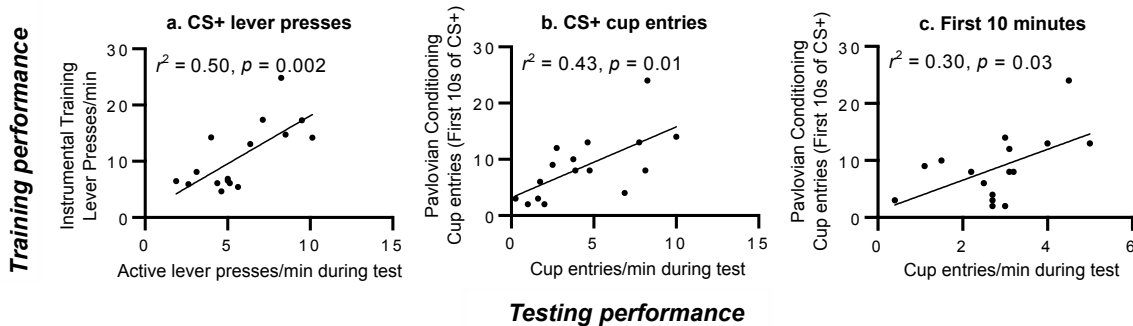
preceding each CS presentation. In (d-e), water cup entries/lever presses are shown as a difference score between responses during the 2-min CS and during the 2-min ITI immediately preceding each CS presentation. Data are presented as means  $\pm$  SEM (N = 16). \*  $p < 0.05$ . FR; fixed ratio. VI; variable interval. CS; conditioned stimulus.

### ***Behavioural performance during instrumental and Pavlovian conditioning predicts later cue-induced incentive motivation***

We examined whether responding during previous instrumental and Pavlovian conditioning predicted behaviour during tests for CS+ triggered incentive motivation. More active lever pressing during the final instrumental conditioning session (VI60-4 in Fig. 1b) predicted more active lever pressing at test, specifically during CS+ presentations (Fig. 2a;  $r(14) = 0.71$ ,  $r^2 = 0.50$ ,  $p = 0.002$ ). The level of active lever pressing during the final instrumental conditioning session did not significantly predict active lever pressing during either CS- presentations (Supplementary Fig. 1a;  $r(14) = 0.34$ ,  $r^2 = 0.12$ ,  $p = 0.20$ ) or during the ITI at test (Supplementary Fig. 1b;  $r(14) = 0.21$ ,  $r^2 = 0.05$ ,  $p = 0.43$ ). The level of active lever pressing during the final instrumental conditioning session also did not significantly predict water cup entries at test (Supplementary Fig. 1c;  $r(14) = 0.50$ ,  $r^2 = 0.25$ ,  $p = 0.051$ ; Supplementary Fig. 1d;  $r(14) = 0.092$ ,  $r^2 = 0.01$ ,  $p = 0.73$ ; Supplementary Fig. 1e;  $r(14) = -0.23$ ,  $r^2 = 0.05$ ,  $p = 0.40$ ). Thus, rats more sensitive to water reinforcement during prior instrumental conditioning later showed greater cue-induced incentive motivation for water reward, as shown specifically by more CS+ triggered presses on the previously water-associated lever.

Performance during Pavlovian sessions also predicted responding at test. More CS+ elicited water cup entries during the final Pavlovian conditioning session (session 8 in Fig. 1c) significantly predicted more water cup entries at test, specifically during CS+ presentations (Fig. 2b;  $r(14) = 0.65$ ,  $r^2 = 0.43$ ,  $p = 0.01$ ). There were no significant correlations during CS- presentations (Supplementary Fig. 1f;  $r(14) = 0.30$ ,  $r^2 = 0.09$ ,  $p = 0.27$ ) or during the ITI at test (Supplementary Fig. 1g;  $r(14) = 0.06$ ,  $r^2 = 0.003$ ,  $p = 0.83$ ). Thus, more robust CS+ triggered conditioned approach behaviour during Pavlovian conditioning predicted a greater CS+ triggered conditioned approach response at test. More CS+ elicited water cup entries during the final Pavlovian conditioning session also significantly predicted more water cup entries during the first 10 min of the PIT test session, when neither the CS+ nor water were presented (Fig. 2c;  $r(14) = 0.55$ ,  $r^2 = 0.30$ ,  $p = 0.03$ ). Thus, rats that showed more CS+ triggered conditioned approach behaviour during Pavlovian conditioning also later visited the water cup more frequently under extinction conditions. Finally, CS+ elicited water cup entries during the final Pavlovian session did

not significantly predict active lever pressing behaviour at test (Supplementary Fig. 1h, during CS+ presentations;  $r(14) = 0.18$ ,  $r^2 = 0.03$ ; Supplementary Fig. 1i, during CS- presentations;  $r(14) = -0.40$ ,  $r^2 = 0.15$ ; Supplementary Fig. 1j, during the ITI;  $r(14) = -0.41$ ,  $r^2 = 0.17$ ; All  $P$ 's > 0.05). Thus, CS+ triggered approach behaviour during Pavlovian conditioning is dissociable from later instrumental pursuit of the primary reward.



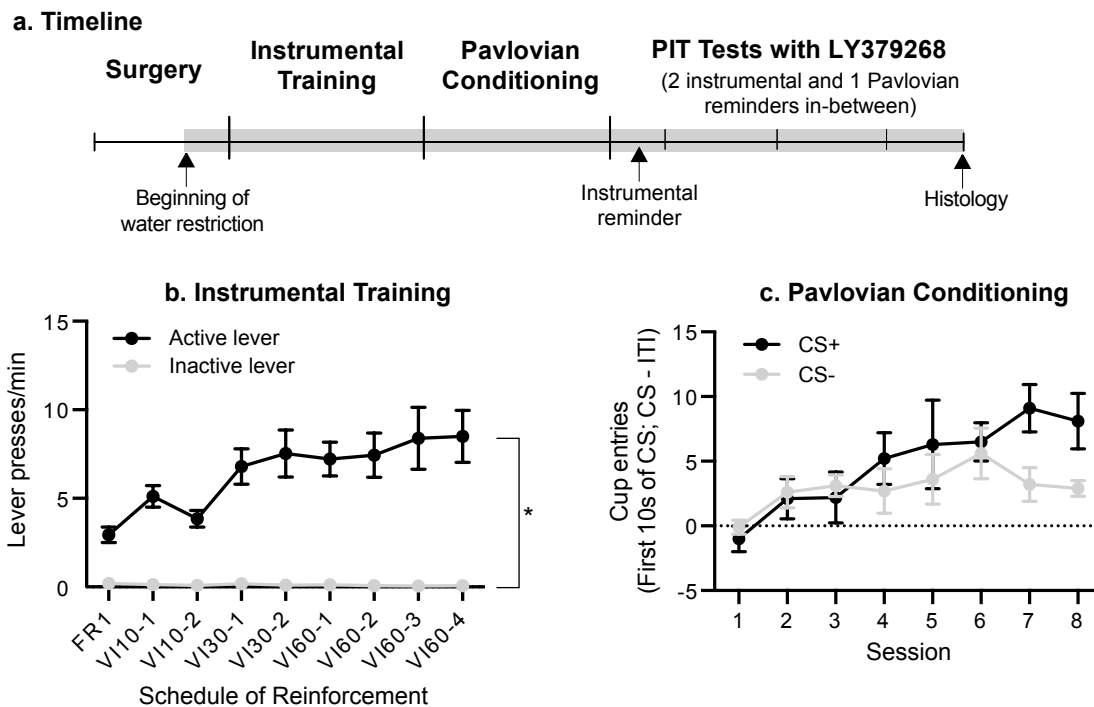
**Fig. 2 Responding during both instrumental and Pavlovian conditioning predicted later performance during a test for Pavlovian-to-instrumental Transfer.** (a) More active lever pressing during the final instrumental training session predicted more active lever pressing at test, specifically during presentations of the water-paired conditioned stimulus (CS+). (b) More water cup entries during CS+ presentation on the last Pavlovian session (session 8) predicted more water cup entries at test during the CS+. (c) More water cup entries during CS+ presentation on the last Pavlovian session also predicted more water cup entries during the first 10 min of the PIT test session, when neither the CS+ nor water were presented (i.e., under extinction conditions).  $N = 16$ . Response rates during the CS are unadjusted for baseline (i.e., during the inter-trial interval, or ITI). CS; conditioned stimulus.

## Exp. 2: Effects of activating mGlu<sub>2/3</sub> receptors in the BLA on conditioned incentive motivation

Six rats did not have bilateral cannulae in the BLA, and they were excluded from data analysis. Over the course of instrumental conditioning, rats increased active lever pressing (Fig. 3b; main effect of Session,  $F(2.189,19.705) = 6.58$ ,  $p = 0.005$ ,  $\epsilon = 0.27$ ). In addition, rats pressed more on the active than on the inactive lever (main effect of Lever,  $F(1,9) = 54.71$ ,  $p < 0.001$ ) and this difference increased across sessions (Lever  $\times$  Session interaction,  $F(2.128,19.153) = 6.94$ ,  $p = 0.005$ ,  $\epsilon = 0.27$ ). Thus, rats learned the action-outcome contingency, and reliably lever pressed for water.

Across Pavlovian conditioning sessions, rats increased their visits to the water cup during the first 10 sec of CS presentation (Fig. 3c; main effect of Session  $F(2.548,22.93) = 3.27$ ,  $p =$

0.046,  $\epsilon = 0.36$ ). CS+ water cup entries appeared higher than CS- water cup entries, though this was not statistically significant (main effect of CS,  $F(1,9) = 3.76$ ,  $p = 0.08$ ). There was also no significant change in conditioned discrimination across sessions (CS  $\times$  Session interaction,  $F(7,63) = 1.77$ ,  $p = 0.109$ ).



**Fig. 3 Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 2.** (a) After implantation of bilateral cannulae targeting the basolateral amygdala (BLA), rats ( $N = 10$ ) received instrumental and Pavlovian conditioning sessions. We then assessed the effects of LY379268 on Pavlovian-to-instrumental transfer. (b) The rate of active-lever presses increased over the daily 40-min instrumental training sessions. (c) The rate of water cup entries during the first 10 sec of each CS presentation increased over the daily 44-min Pavlovian conditioning sessions. Data are presented as means  $\pm$  SEM.  $*p < 0.05$ . FR; fixed ratio. VI; variable interval. CS; conditioned stimulus. ITI; inter-trial interval.

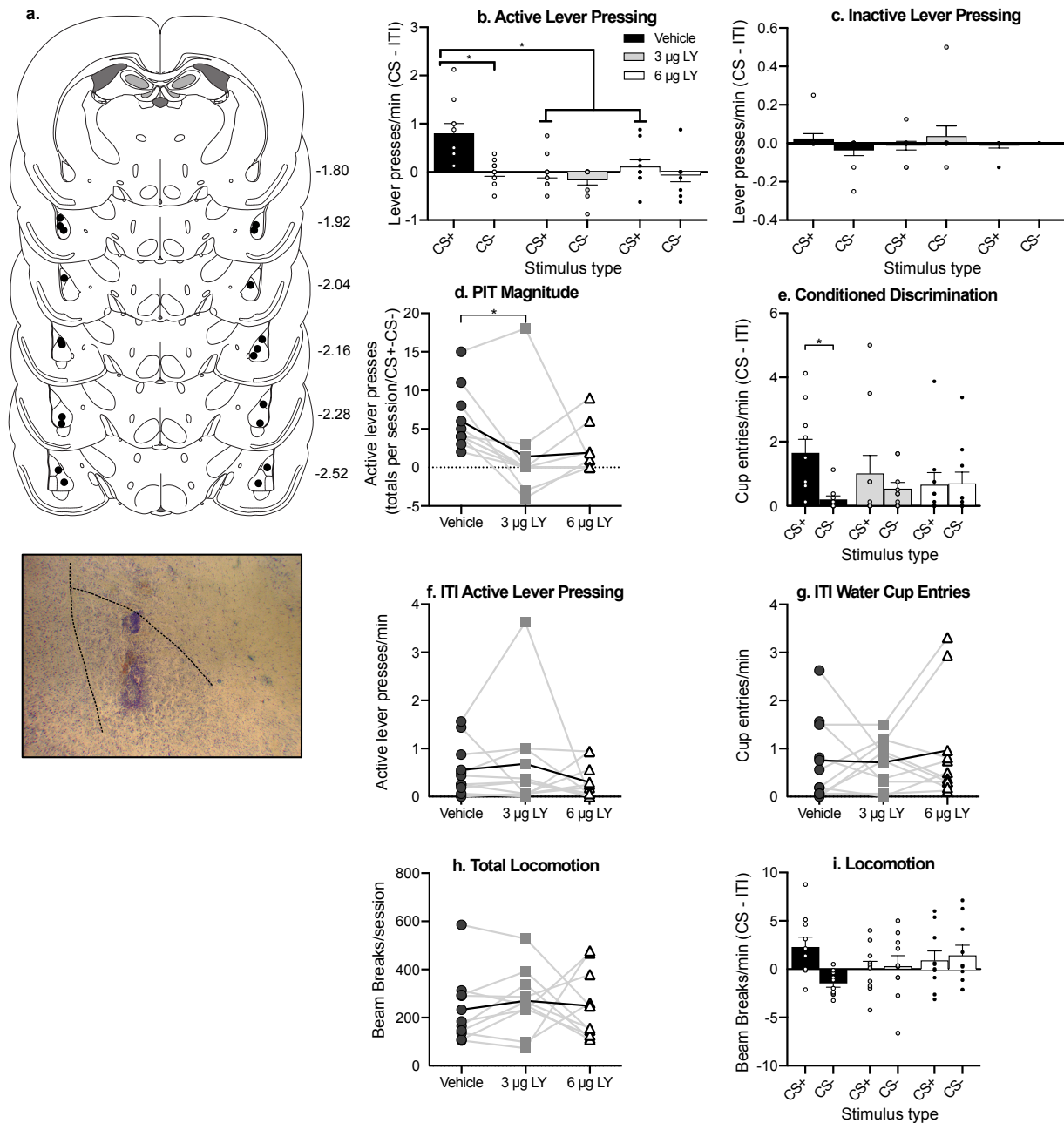
### Effects of intra-BLA LY379268 on lever pressing

Fig. 4a shows the placements of microinjector tips in the BLA ( $n = 10$ ). Presentation of the CS+, but not the CS-, increased active lever pressing (Figs. 4b-c; main effect of CS,  $F(1, 9) = 9.4$ ,  $p = 0.013$ ; CS  $\times$  Lever interaction ( $F(1, 9) = 8.61$ ,  $p = 0.02$ ; CS+  $>$  CS-,  $p = 0.02$ ), without affecting inactive lever pressing ( $p = 1$ ). Thus, the CS+ selectively increased pressing on the water-associated lever—indicating PIT—without increasing general lever-pressing behaviour indiscriminately. LY379268 microinjection influenced lever-pressing behaviour, preferentially

reducing active- versus inactive lever pressing (Figs. 4b-c; main effect of LY379268,  $F(2, 18) = 11.73$ ,  $p < 0.001$ ; LY379268  $\times$  Lever interaction,  $F(1.28, 11.48) = 12.73$ ,  $p < 0.003$ ,  $\epsilon = 0.64$ ). Compared to vehicle, 3 and 6  $\mu\text{g}$  LY379268 reduced total active lever presses (i.e., active lever presses during both CS+ and CS- presentations. Fig. 4b;  $p = 0.003$  and  $0.042$  respectively), with no significant effects on total inactive lever pressing (Fig. 4c; All  $P$ 's = 1). As Fig. 4c shows, pressing on the inactive lever was already low under baseline (intra-BLA vehicle) conditions, indicating a potential floor effect. Importantly, the effects of LY379268 on active lever pressing depended on CS type. LY379268 reduced active lever pressing during CS+, but not CS- presentations (Fig. 4b; CS  $\times$  LY379268 interaction,  $F(2, 18) = 4.20$ ,  $p = 0.03$ . Note that active lever pressing during CS- presentations was also already low at baseline). Compared to vehicle, 3 and 6  $\mu\text{g}$  LY379268 reduced active lever presses during CS+ presentations ( $p = 0.002$  and  $0.03$  respectively). Thus, LY379268 specifically attenuated CS+ triggered potentiation of water-seeking behaviour. This effect is further highlighted by analysing the influence of LY379268 on average PIT magnitude, indicated by the difference in active lever pressing during CS+ vs. CS- presentations. LY379268 reduced PIT magnitude (Fig. 4d; main effect of LY379268,  $F(2, 18) = 4.41$ ,  $p = 0.03$ ; 3  $\mu\text{g}$  vs. vehicle,  $p = 0.03$ ; 6  $\mu\text{g}$  vs. vehicle,  $p = 0.07$ ; 6  $\mu\text{g}$  vs. 3  $\mu\text{g}$ ,  $p = 1$ ). Thus, the CS+ enhanced responding on the water-associated lever, indicating cue-triggered potentiation of incentive motivation for water, and activating BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors with LY379268 suppressed this effect.

Fig. 4e shows that under baseline conditions ('vehicle'), the rats visited the water cup more frequently during CS+ versus CS- presentations, indicating significant conditioned discrimination (LY379268  $\times$  CS interaction, ( $F(2, 18) = 5.57$ ,  $p = 0.01$ ; under Vehicle, CS+ > CS-,  $p = 0.004$ ). Intra-BLA LY379268 injections abolished this conditioned discrimination (All  $P$ 's > 0.05). Thus, the CS+ water cue triggered more visits to the water cup than the control cue did, and LY379268 prevented this conditioned discrimination effect.

Intra-BLA LY379268 did not produce significant motor suppressive effects. Compared to vehicle microinjections, LY379268 microinjections did not influence active lever pressing (Fig. 4f;  $F(1.26, 11.37) = 0.84$ ,  $p = 0.41$ ,  $\epsilon = 0.63$ ) or water cup entries during the ITI (Fig. 4g;  $F(2, 18) = 0.30$ ,  $p = 0.75$ ). LY379268 microinjections also had no influence on either total locomotor activity during testing (Fig. 4h;  $F(1.22, 10.99) = 0.195$ ,  $p = 0.72$ ,  $\epsilon = 0.61$ ), or on locomotor activity during CS presentations (Fig. 4i; Main effect of Dose,  $F(2, 18) = 0.59$ ,  $p = 0.56$ ; Dose  $\times$  CS interaction  $F(2, 18) = 3.27$ ,  $p = 0.06$ ). As such, the observed effects of intra-BLA LY379268 on cue-triggered potentiation of water-seeking behaviour cannot be attributed to motor suppressive effects.



**Fig. 4 Activation of basolateral amygdala (BLA) mGlu<sub>2/3</sub> receptors with LY379268 abolished CS+ triggered increases in both instrumental reward-seeking actions and conditioned approach behaviours.** (a) Estimated placements of microinjector tips mapped to Rat brain atlas coordinates (Paxinos & Watson, 2007). An example photomicrograph is shown below. (b) At baseline ('Vehicle'), presentation of the Pavlovian water cue (CS+) triggered increased responding on the water-associated lever compared to CS- presentation, and intra-BLA LY379268 (3 or 6 µg/hemisphere) abolished this effect. (c) LY379268 had no effect on inactive lever presses. (d) At 3 µg/hemisphere, LY379268 significantly reduced the magnitude of Pavlovian-to-instrumental transfer. (e) At baseline ('Vehicle'), rats entered the water cup significantly more often during CS+ versus CS- presentations, and intra-BLA LY379268 (3 or 6

µg/hemisphere) abolished this Pavlovian conditioned approach behaviour. (f-g) LY379268 had no effect on active lever presses or water cup entries during inter-trial intervals (ITI). (h) LY379268 did not influence total locomotor activity, or (i) locomotor activity during CS presentations at test. In (d), and (f-h), thicker curve in each panel represents group means. Bar graphs present data as means  $\pm$  SEM (n= 10). \* p < 0.05. CS; conditioned stimulus.

## DISCUSSION

Here we characterized the ability of a Pavlovian water cue to trigger increases in instrumental pursuit of water reward, when responding involved neither primary reinforcement by water nor conditioned reinforcement by the water cue. We then assessed the effects of intra-BLA microinjections of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 on this effect. Rats initially received instrumental conditioning sessions, where they learned to press a lever for water reward. The rats also received separate Pavlovian conditioning sessions, where they learned that a cue (CS+) predicts free water deliveries, and a second cue does not (CS-). We then used PIT procedures to assess cue-triggered increases in water-seeking behaviour where responding was reinforced neither by the cue nor by water reward. We report three key findings. First, during PIT testing, rats responded more for water during CS+ versus CS- presentations, indicating cue-triggered potentiation of incentive motivation for water reward. Second, responding during both the previous instrumental and Pavlovian conditioning phases significantly predicted later performance in the PIT test. Third, activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors in the BLA impaired cue-triggered increases in reward seeking, without influencing general motor behaviour. Thus, increased mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity in the BLA attenuates the ability of reward-predictive cues to invigorate reward-seeking actions.

### **Performance during previous instrumental and Pavlovian conditioning influences later cue-triggered responses**

Performance during training selectively predicted behaviours triggered by the water-associated cue at test, demonstrating how acquired instrumental and Pavlovian associations shape later behaviour. First, responding during initial instrumental conditioning predicted behaviour at test. Higher rates of lever-pressing for water during instrumental conditioning predicted more robust instrumental responding for water reward at test, but only during presentations of the water-associated CS+. Performance during previous instrumental conditioning did not predict water-seeking behaviour during CS- presentations or during the time intervals in between CS presentations (ITI) at test. One possibility is that when rats attribute more reinforcing properties to a primary reward such as water, they will later show more vigorous cue-



induced incentive motivation for that reward. In parallel, such rats might also be more susceptible to the response-*suppressing* effects of stimuli that do not predict the pursued reward (the CS- here). Indeed, CS+ triggered increases in reward-seeking actions may reflect both a facilitation of responding by the CS+ and a suppression of responding by the CS- (Holmes et al., 2010). Whatever the underlying mechanisms, our findings extend previous work showing that when instrumental training precedes Pavlovian conditioning—as used here—, more instrumental training predicts more cue-triggered reward pursuit later on (Holmes et al., 2010).

Performance during initial Pavlovian conditioning also predicted behaviour at test. More CS+ triggered water cup entries during Pavlovian conditioning predicted more CS+ triggered water cup visits at test. This effect was selective, as there were no such predictive relationships for water cup entries during CS- presentations or during the ITI at test. Because no water is delivered at test, our findings therefore suggest that rats in which a reward cue becomes a more important elicitor of approach responses could also be more resistant to extinction when the cue no longer predicts water. This provides a testable hypothesis to explore individual differences in conditioned appetitive responding.

### **Activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors in the BLA suppresses cue-triggered increases in incentive motivation: Behavioural specificity**

Our findings support the idea that activation of BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors reduces the expression of cue-triggered “wanting” for water, presumably by suppressing the incentive salience of the cue-evoked neural representation of water reward (see Wyvell & Berridge, 2000). The mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist, LY379268 abolished cue-triggered potentiation of incentive motivation for reward, as measured by *i*) the rate of pressing on the water-associated lever when the CS+ cue is presented, *ii*) PIT magnitude (the difference between active lever pressing during CS+ vs CS- presentation), and *iii*) CS+ triggered conditioned approach behaviour to the site of water delivery.

The suppressive effects of intra-BLA LY379268 injections on cue-induced increases in water cup entries could also reflect attenuation of the cue’s predictive value. Indeed, cue-elicited water cup entries are goal-tracking responses, and such responses are thought to preferentially reflect a cue’s predictive value (Flagel, Watson, Robinson, & Akil, 2007; Robinson & Flagel, 2009). In parallel, sign-tracking behaviours (i.e., where rats approach and interact with reward-associated cues) are thought to preferentially reflect a cue’s incentive motivational value (Berridge

& Robinson, 2003; Flagel et al., 2011). However, the present study was not designed to distinguish goal- versus sign-tracking responses. Indeed, we used an auditory conditioned cue. Such cues are non-localizable, and are therefore less amenable to approach-like, sign-tracking behaviours. In comparison, studies designed to detect goal- versus sign-tracking phenotypes generally use tactile, localizable cues. This being said, the Pavlovian-to-Instrumental transfer paradigm we used permits simultaneous measurement of cue-induced Pavlovian and instrumental responses, thus allowing us to study the effects of intra-BLA LY379268 injections on both types of conditioned behaviours.

Intra-BLA injections of LY379268 influenced the behavioural response to the CS+ without producing significant motor-suppressing effects. Indeed, LY379268 had no effect on lever pressing behaviour or water cup entries during inter-trial intervals (i.e., in the absence of the CS+), or on locomotor activity. This is consistent with previous findings showing that at doses similar to those used here, intra-BLA LY379268 injections do not impair motor behaviour (Cannady, Grondin, Fisher, Hodge, & Besheer, 2011). Thus, together our findings suggest that activating BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors, which can suppress both local synaptic glutamate release and excitability of BLA projection neurons (Conn & Pin, 1997; Imre, 2007; Schoepp, 2001), decreases the incentive salience of reward-associated stimuli, causing animals to reduce their instrumental pursuit of the reward in a pure conditioned incentive paradigm.

The question now is how activation of BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors suppresses cue-triggered potentiation of reward seeking actions. When activated, mGlu<sub>2/3</sub> receptors provide negative feedback to decrease evoked glutamate release (Conn & Pin, 1997; Imre, 2007; Schoepp, 2001). We did not measure extracellular glutamate here. However, we hypothesize that synaptic glutamate is necessary for cue-triggered increases in incentive motivation, and that mGlu<sub>2/3</sub> activation suppresses this conditioned effect by reducing synaptic glutamate release. This interpretation would be in agreement with Malvaez et al. (2015), who found that BLA glutamate release frequency correlates with lever-pressing actions that are selectively invigorated by a reward-associated CS, and that blockade of BLA AMPA glutamate receptors disrupts the conditioned incentive impact of that CS.

Malvaez et al. (2015) found that intra-BLA AMPA receptor blockade suppressed CS-triggered increases in the instrumental pursuit of reward, but that neither intra-BLA AMPA nor NMDA receptor blockade changed CS-triggered Pavlovian conditioned approach behaviour. We further extend these findings by showing that activation of intra-BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors attenuates

CS-triggered Pavlovian conditioned approach behaviour. In contrast to AMPA and NMDA receptor blockade, activating mGlu<sub>2/3</sub> receptors suppresses synaptic glutamate release, thus presumably decreasing signaling at all local glutamate receptors, both metabotropic and ionotropic. Thus, our findings combined with those of Malvaez et al. (2015) suggest that activity at non-ionotropic glutamate receptors in the BLA mediate conditioned approach to reward-associated cues. This could involve metabotropic glutamate type 5 receptors (Khoo et al., 2019). We also note that Malvaez et al. (2015) studied the role of BLA glutamate signaling in an outcome-specific PIT procedure, employing two reinforcers and two instrumental response options. Here, we used single-outcome PIT, where a single instrumental response led to a single outcome. This is important, because a procedure using multiple reinforcers can stimulate different forms of learning (i.e., the formation of more detailed and sensory-specific neural representations of each reinforcer) compared to procedures using a single reinforcer (Blundell et al., 2001; Corbit & Balleine, 2005; Holland, 2004). Previous studies have also shown that different PIT paradigms can rely on different neural substrates. For example, the BLA can play different roles in outcome-specific versus general PIT (Corbit & Balleine, 2005). This being said, our results and those of Malvaez et al. (2015) combined suggest that glutamate signaling in the BLA is important across these PIT paradigms.

One consideration of the single-outcome PIT design used in our study is that both general and specific mechanisms might have contributed to the observed effects (Cartoni et al., 2016; Mahlberg et al., 2019). PIT designs that use a single outcome tend to be associated with general PIT, where the Pavlovian CS+ produces a general appetitive effect that can also potentiate instrumental responses for other outcomes (Cartoni et al., 2016). These single-outcome studies follow a general protocol almost identical to the present study, with the exception that here a second (inactive) lever was provided during instrumental training (Hall, Parkinson, Connor, Dickinson, & Everitt, 2001). Based on lesion studies by Blundell et al. (2001) and Corbit and Balleine (2005), the BLA is thought to mediate *specific transfer* rather than *general transfer*, so our findings may challenge this conclusion by demonstrating a role for BLA glutamate function in a PIT design biased towards general transfer. However, this is not conclusive as we do not have direct evidence that our design produces general transfer. A full transfer paradigm using two levers, each delivering a different outcome and three CSs (two paired with the outcomes delivered by the lever, and one paired with a third outcome) would be required to distinguish specific from general transfer effects (Cartoni et al., 2016; Corbit & Balleine, 2005). Nonetheless, our findings

suggest that in animals with an intact BLA, glutamate-dependent processes within the BLA may indeed mediate general transfer, and this provides an avenue for further research.

## **Limitations**

Only male rats were studied in our experiments. Some studies suggest that female and male rats can differ in how they respond to reward-paired cues (Johnson et al., 2019; Nicolas et al., 2019; Zhou et al., 2014). Other studies suggest that female and male rats show similar cue-motivated behaviours (Collins et al., 2019). Nonetheless, there are limitations in generalizing findings obtained with males to females (Becker & Koob, 2016; Shansky, 2019; Shansky & Murphy, 2021), and so research should include animals of both sexes. In this regard, in ongoing work, we are examining potential similarities and differences between the sexes in PIT and in the effects of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activation.

## **Conclusions**

Activation of BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptors decreased the ability of a water-associated cue to goad both conditioned anticipation of water reward and water-seeking actions. We observed these effects under extinction conditions, in a pure conditioned incentive motivation paradigm that precluded the respective influences of primary or conditioned reinforcement on behaviour. The ability of increased BLA mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity to suppress the expression of conditioned incentive motivation did not involve general effects on motor behavior. We conclude that signaling via mGlu<sub>2/3</sub> receptors within the BLA mediates the ability of reward cues to potentiate the incentive salience of their associated rewards.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge Rifka (Rebecca) C. Derman, Carrie R. Ferrario and Cameron Nobile for generously sharing equipment, computer programs and advice in setting up the behavioural tasks used in this work.

## **FUNDING AND DISCLOSURE**

This work was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (grant 355923) and the Canada Foundation for Innovation to ANS (grant 24326). ANS holds a salary award from the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (Grant #28988). SYK was supported by a postdoctoral fellowship from the Fonds de la Recherche du Québec – Santé (Grant

#270051). CG was supported by a Master's scholarship (B1X) from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (Grant #275340).

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Backstrom, P., & Hyttia, P. (2005). Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. *European Journal of Pharmacology*, 528(1-3), 110-118. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.051
- Baptista, M. A. S., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2004). Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4723-4727. doi:10.1523/JNEUROSCI.0176-04.2004
- Becker, J. B., & Koob, G. F. (2016). Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 242-263. doi:10.1124/pr.115.011163
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2003). Parsing reward. *Trends in Neurosciences*, 26(9), 507-513. doi:10.1016/S0166-2236(03)00233-9
- Bindra, D. (1978). How adaptive behavior is produced: A perceptual-motivational alternative to response-reinforcement. *Behavioral and Brain Sciences*, 1(1), 41-91. doi:10.1017/S0140525X00059380
- Blundell, P., Hall, G., & Killcross, S. (2001). Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *Journal of Neuroscience*, 21(22), 9018-9026. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-22-09018.2001
- Bolles, R. C. (1972). Reinforcement, expectancy, and learning. *Psychological Review*, 79(5), 394-409. doi:10.1037/h0033120
- Bossert, J. M., Poles, G. C., Sheffler-Collins, S. I., & Ghitza, U. E. (2006). The mGluR2/3 agonist LY379268 attenuates context- and discrete cue-induced reinstatement of sucrose seeking but not sucrose self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 173(1), 148-152. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.008
- Cannady, R., Grondin, J. J., Fisher, K. R., Hodge, C. W., & Besheer, J. (2011). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits the discriminative stimulus effects of alcohol

- via selective activity within the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2328-2338. doi:10.1038/npp.2011.121
- Cartoni, E., Balleine, B., & Baldassarre, G. (2016). Appetitive Pavlovian-instrumental Transfer: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 71, 829-848. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.09.020
- Collins, A. L., Aitken, T. J., Huang, I. W., Shieh, C., Greenfield, V. Y., Monbouquette, H. G., . . . Wassum, K. M. (2019). Nucleus Accumbens Cholinergic Interneurons Oppose Cue-Motivated Behavior. *Biological Psychiatry*, 86(5), 388-396. doi:10.1016/j.biopsych.2019.02.014
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 205-237. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2005). Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of pavlovian-instrumental transfer. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 962-970. doi:10.1523/JNEUROSCI.4507-04.2005
- De Tommaso, M., Mastropasqua, T., & Turatto, M. (2018). Working for beverages without being thirsty: Human Pavlovian-instrumental transfer despite outcome devaluation. *Learning and Motivation*, 63, 37-48. doi:10.1016/j.lmot.2018.01.001
- Delamater, A. R., & Holland, P. C. (2008). The influence of CS-US interval on several different indices of learning in appetitive conditioning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 34(2), 202-222. doi:10.1037/0097-7403.34.2.202
- Derman, R. C., Bass, C. E., & Ferrario, C. R. (2020). Effects of hM4Di activation in CamKII basolateral amygdala neurons and CNO treatment on sensory-specific vs. general PIT: refining PIT circuits and considerations for using CNO. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(5), 1249-1266. doi:10.1007/s00213-020-05453-8
- Derman, R. C., & Ferrario, C. R. (2018). Enhanced incentive motivation in obesity-prone rats is mediated by NAc core CP-AMPA receptors. *Neuropharmacology*, 131, 326-336. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.12.039
- Everitt, B. J., Dickinson, A., & Robbins, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Research Reviews*, 36(2-3), 129-138. doi:10.1016/s0165-0173(01)00088-1
- Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2007). NMDA receptor blockade in the basolateral amygdala disrupts consolidation of stimulus-reward memory and extinction learning during

- reinstatement of cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(4), 435-444. doi:10.1016/j.nlm.2007.05.006
- Flagel, S. B., Clark, J. J., Robinson, T. E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., . . . Akil, H. (2011). A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature*, 469(7328), 53-57. doi:10.1038/nature09588
- Flagel, S. B., Watson, S. J., Robinson, T. E., & Akil, H. (2007). Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(3), 599-607. doi:10.1007/s00213-006-0535-8
- Gabriele, A., & See, R. E. (2010). Reversible inactivation of the basolateral amygdala, but not the dorsolateral caudate putamen, attenuates consolidation of cocaine-cue associative learning in a reinstatement model of drug-seeking. *European Journal of Neuroscience*, 32(6), 1024-1029. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07394.x
- Garceau, C., Samaha, A. N., Cordahi, T., Servonnet, A., & Khoo, S. Y.-S. (2021). Dataset: Role of basolateral amygdala metabotropic group II glutamate receptors in the response to reward-associated cues. *Figshare*. doi:10.6084/m9.figshare.13251125
- Gu, G., Lorrain, D. S., Wei, H., Cole, R. L., Zhang, X., Daggett, L. P., . . . Lechner, S. M. (2008). Distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors in the rat forebrain: Implication in emotional responses and central disinhibition. *Brain Research*, 1197, 47-62. doi:10.1016/j.brainres.2007.12.057
- Hall, J., Parkinson, J. A., Connor, T. M., Dickinson, A., & Everitt, B. J. (2001). Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 13(10), 1984-1992. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01577.x
- Holland, P. C. (2004). Relations between Pavlovian-instrumental transfer and reinforcer devaluation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 30(2), 104-117. doi:10.1037/0097-7403.30.2.104
- Holmes, N. M., Marchand, A. R., & Coutureau, E. (2010). Pavlovian to instrumental transfer: a neurobehavioural perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1277-1295. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.03.007
- Imre, G. (2007). The preclinical properties of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *CNS Drug Reviews*, 13(4), 444-464. doi:10.1111/j.1527-3458.2007.00024.x

- Johnson, A. R., Thibeault, K. C., Lopez, A. J., Peck, E. G., Sands, L. P., Sanders, C. M., . . . Calipari, E. S. (2019). Cues play a critical role in estrous cycle-dependent enhancement of cocaine reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, *44*(7), 1189-1197. doi:10.1038/s41386-019-0320-0
- Khoo, S. Y.-S., LeCocq, M. R., Deyab, G. E., & Chaudhri, N. (2019). Context and topography determine the role of basolateral amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in appetitive Pavlovian responding. *Neuropsychopharmacology*, *44*(9), 1524-1533. doi:10.1038/s41386-019-0335-6
- Lichtenberg, N. T., Pennington, Z. T., Holley, S. M., Greenfield, V. Y., Cepeda, C., Levine, M. S., & Wassum, K. M. (2017). Basolateral Amygdala to Orbitofrontal Cortex Projections Enable Cue-Triggered Reward Expectations. *Journal of Neuroscience*, *37*(35), 8374-8384. doi:10.1523/JNEUROSCI.0486-17.2017
- Lovibond, P. F. (1983). Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *9*(3), 225-247. doi: 10.1037/0097-7403.9.3.225
- Lu, L., Uejima, J. L., Gray, S. M., Bossert, J. M., & Shaham, Y. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR(2/3) agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of cocaine craving. *Biological Psychiatry*, *61*(5), 591-598. doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.011
- Ludwig, A. M., Wikler, A., & Stark, L. H. (1974). The first drink: psychobiological aspects of craving. *Archives of General Psychiatry*, *30*(4), 539-547. doi:10.1001/archpsyc.1974.01760100093015
- Mahlberg, J., Seabrooke, T., Weidemann, G., Hogarth, L., Mitchell, C. J., & Moustafa, A. A. (2019). Human appetitive Pavlovian-to-instrumental transfer: a goal-directed account. *Psychological Research*. doi:10.1007/s00426-019-01266-3
- Malvaez, M., Greenfield, V. Y., Wang, A. S., Yorita, A. M., Feng, L., Linker, K. E., . . . Wassum, K. M. (2015). Basolateral amygdala rapid glutamate release encodes an outcome-specific representation vital for reward-predictive cues to selectively invigorate reward-seeking actions. *Scientific Reports*, *5*, 12511. doi:10.1038/srep12511
- Nasser, H. M., Lafferty, D. S., Lesser, E. N., Bacharach, S. Z., & Calu, D. J. (2018). Disconnection of basolateral amygdala and insular cortex disrupts conditioned approach in Pavlovian lever autoshaping. *Neurobiology of Learning and Memory*, *147*, 35-45. doi:10.1016/j.nlm.2017.11.010

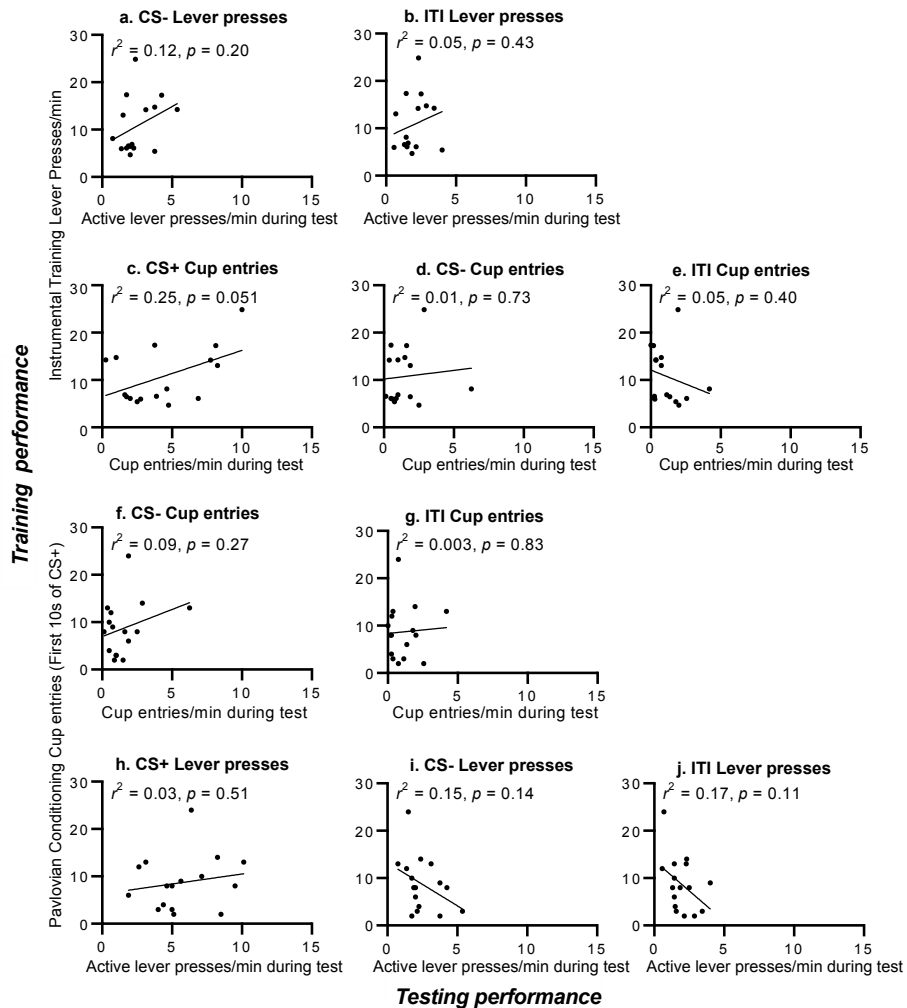


- Nicolas, C., Russell, T. I., Pierce, A. F., Maldera, S., Holley, A., You, Z. B., . . . Ikemoto, S. (2019). Incubation of Cocaine Craving After Intermittent-Access Self-administration: Sex Differences and Estrous Cycle. *Biological Psychiatry*, *85*(11), 915-924. doi:10.1016/j.biopsych.2019.01.015
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., Ehrman, R., & Robbins, S. J. (1998). Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, *12*(1), 15-22. doi:10.1177/026988119801200103
- Ohishi, H., Neki, A., & Mizuno, N. (1998). Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neuroscience Research*, *30*(1), 65-82. doi:10.1016/s0168-0102(97)00120-x
- Olney, J. J., Warlow, S. M., Naffziger, E. E., & Berridge, K. C. (2018). Current perspectives on incentive salience and applications to clinical disorders. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *22*, 59-69. doi:10.1016/j.cobeha.2018.01.007
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). Sydney ; Orlando: Academic Press.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., Niedzielski, A. S., & Wenthold, R. J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, *71*(4), 949-976. doi:10.1016/0306-4522(95)00533-1
- Prevost, C., Liljeholm, M., Tyszka, J. M., & O'Doherty, J. P. (2012). Neural correlates of specific and general Pavlovian-to-Instrumental Transfer within human amygdalar subregions: a high-resolution fMRI study. *Journal of Neuroscience*, *32*(24), 8383-8390. doi:10.1523/JNEUROSCI.6237-11.2012
- Puad, M., Higuera-Matas, A., Brunault, P., Everitt, B. J., & Belin, D. (2021). The Basolateral Amygdala to Nucleus Accumbens Core Circuit Mediates the Conditioned Reinforcing Effects of Cocaine-Paired Cues on Cocaine Seeking. *Biological Psychiatry*, *89*(4), 356-365. doi:10.1016/j.biopsych.2020.07.022
- Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological Review*, *74*(3), 151-182. doi:10.1037/h0024475
- Robinson, T. E., & Flagel, S. B. (2009). Dissociating the predictive and incentive motivational properties of reward-related cues through the study of individual differences. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 869-873. doi:10.1016/j.biopsych.2008.09.006

- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(1), 12-20.
- Servonnet, A., Hernandez, G., El Hage, C., Rompre, P. P., & Samaha, A. N. (2020). Optogenetic Activation of the Basolateral Amygdala Promotes Both Appetitive Conditioning and the Instrumental Pursuit of Reward Cues. *Journal of Neuroscience*, 40(8), 1732-1743. doi:10.1523/JNEUROSCI.2196-19.2020
- Shansky, R. M. (2019). Are hormones a "female problem" for animal research? *Science*, 364(6443), 825-826. doi:10.1126/science.aaw7570
- Shansky, R. M., & Murphy, A. Z. (2021). Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. *Nature Neuroscience*, 24(4), 457-464. doi:10.1038/s41593-021-00806-8
- Shiflett, M. W., & Balleine, B. W. (2010). At the limbic-motor interface: disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. *European Journal of Neuroscience*, 32(10), 1735-1743. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07439.x
- Talmi, D., Seymour, B., Dayan, P., & Dolan, R. J. (2008). Human pavlovian-instrumental transfer. *Journal of Neuroscience*, 28(2), 360-368. doi:10.1523/JNEUROSCI.4028-07.2008
- Uejima, J. L., Bossert, J. M., Poles, G. C., & Lu, L. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR2/3 agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of sucrose craving in rats. *Behavioural Brain Research*, 181(2), 292-296. doi:10.1016/j.bbr.2007.04.019
- Walker, K. C. (1942). The effect of a discriminative stimulus transferred to a previously unassociated response. *Journal of Experimental Psychology*, 31(4), 312-321. doi:10.1037/h0062929
- Wyvell, C. L., & Berridge, K. C. (2000). Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 8122-8130. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-21-08122.2000
- Zhao, Y., Dayas, C. V., Aujla, H., Baptista, M. A., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26(39), 9967-9974. doi:10.1523/JNEUROSCI.2384-06.2006

Zhou, L., Pruitt, C., Shin, C. B., Garcia, A. D., Zavala, A. R., & See, R. E. (2014). Fos expression induced by cocaine-conditioned cues in male and female rats. *Brain Structure and Function*, 219(5), 1831-1840. doi:10.1007/s00429-013-0605-8

## Supplementary Figures



**Supplementary Fig. 1** (a) More active lever pressing during the final instrumental training session did not significantly predict more active lever pressing at test during presentations of the CS-, (b) or the inter-trial interval. (c) Rates of active lever pressing during the final instrumental session also did not significantly predict water cup entries at test during the CS+, (d) during the CS- (e) or during the inter-trial interval (ITI). (f) Rates of water cup entries during the first 10 sec of CS+ presentation on the final Pavlovian session did not significantly predict water cup entries at test during the CS- (g) or inter-trial interval. (h) Water cup entries during the last Pavlovian conditioning session did not significantly predict active lever pressing at test during the CS+, (i) the CS- (j) or inter-trial interval. N = 16. Response rates during the CS+ and CS- are unadjusted for baseline (i.e., during the ITI). CS; conditioned stimulus.

## **CHAPITRE III: ARTICLE 2**

**METABOTROPIC GROUP II GLUTAMATE RECEPTORS MEDIATE CUE-TRIGGERED  
INCREASES IN INCENTIVE MOTIVATION FOR REWARD**

Caroline Garceau<sup>1</sup>, Justine Marsault<sup>2</sup>, Mike J F Robinson<sup>1</sup>, Anne-Noël Samaha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada. <sup>2</sup> Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada. <sup>3</sup> CNS Research Group, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

**Corresponding Author:**

Anne-Noël Samaha, PhD  
Department of Pharmacology and Physiology  
Université de Montréal C.P. 6128, Succursale Centre-ville  
Montréal, Québec  
H3C 3J7  
Canada  
Tel: 514 343 6111 x. 32788  
Fax: 514 343 2291  
Anna.samaha@umontreal.ca

## **CONTRIBUTION DES CO-AUTEURS**

J'ai effectué les sessions d'entraînement et tests comportementaux, une partie des injections sous-cutanées, ainsi que la collecte et l'analyse de l'ensemble des données des 2 expériences. Dr Mike Robinson a effectué une partie des injections sous-cutanées. J'ai rédigé l'article avec ma directrice de recherche, Dre Anne-Noël Samaha, et mon collègue co-auteur, Dr Mike Robinson. Lors de son stage avec moi, Justine Marsault a participé aux procédures comportementales de la dernière expérience.

## **ACCORD DES CO-AUTEURS**

L'accord des co-auteurs a été obtenu pour inclure dans ce mémoire le manuscrit de l'article intitulé « Metabotropic group II glutamate receptors mediate cue-triggered increases in incentive motivation for reward », soumis au journal *Psychopharmacology*.

## **Abstract**

*Rationale.* Reward-associated cues can acquire incentive motivational properties and invigorate reward-seeking actions via Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT). Glutamatergic neurotransmission mediates the appetitive effects of reward-associated cues. We characterized the expression of PIT and its mediation by metabotropic group II glutamate (mGlu<sub>2/3</sub>) receptor activity in female and male rats.

*Objectives.* Across the sexes, we used PIT procedures to determine *i)* cue-triggered increases in incentive motivation for water reward (Experiment 1), *ii)* the respective influences of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 and reward devaluation by satiation on this effect (Experiment 2).

*Methods.* Water-restricted male and female Sprague-Dawley rats learned to lever press for water. Separately, they learned that one of two auditory stimuli predicts free water (CS+ vs CS-). On PIT test days, the CS+ and CS- were presented non-contingently, and we measured effects on lever pressing under extinction (no water). In Experiment 1, we characterized PIT across the sexes. In Experiment 2, we measured PIT after systemic LY379268 administration (0, 0.3 and 1 mg/kg), and water satiation, respectively.

*Results.* Female and male rats showed similar PIT, with CS+ but not CS- presentations potentiating water-seeking behaviour. LY379268 (1 mg/kg) attenuated CS+ evoked increases in both water-associated lever pressing and conditioned approach to the water port. Reward devaluation attenuated both water-seeking and CS+ evoked conditioned approach behaviour.

*Conclusions.* The sexes show similar cue-triggered increases in reward 'wanting', and water devaluation suppresses both water seeking and cue-triggered anticipation of water reward. Finally, across the sexes, mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity mediates cue-triggered increases in reward 'wanting'.

**Keywords:** Instrumental conditioning, Pavlovian conditioning, Pavlovian-to-instrumental transfer, glutamate, mGlu<sub>2/3</sub> receptors, devaluation, sex differences

## INTRODUCTION

Sights, sounds and smells in the environment that signal the occurrence of rewards can acquire incentive motivational properties, enabling such cues to trigger 'wanting' for both the cues and the rewards they predict. This motivational state in turn guides animals towards rewards such as food, water, shelter, and safety. Control over behaviour by reward cues is required for survival. For example, when animals are hungry or thirsty, they must be responsive to environmental cues signaling food or water. In parallel, when reward cues are attributed with too little or too much incentive motivational value, this can contribute to disorders such as depression and addiction, respectively. Thus, understanding the neurobiological mechanisms underlying cue-triggered incentive motivation is relevant to both adaptive and maladaptive reward-seeking behaviours.

Glutamatergic neurotransmission mediates the behavioral response to reward-associated cues (Di Ciano, Cardinal, Cowell, Little, & Everitt, 2001), and growing evidence suggests that this involves activity at mGlu<sub>2/3</sub> receptors. These receptors are mainly presynaptic and are coupled to G<sub>i</sub> signaling, such that their stimulation decreases synaptic glutamate release (Conn & Pin, 1997; Imre, 2007; Schoepp, 2001). Injecting the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 either into the central nucleus of the amygdala (Lu, Uejima, Gray, Bossert, & Shaham, 2007; Uejima, Bossert, Poles, & Lu, 2007), into the nucleus accumbens core (Bossert, Gray, Lu, & Shaham, 2006) or systemically (Backstrom & Hyttia, 2005; Baptista, Martin-Fardon, & Weiss, 2004; Bossert, Poles, Sheffler-Collins, & Ghitza, 2006; Zhao et al., 2006) suppresses cue-induced reinstatement of reward-seeking behaviour. These studies highlight the contributions of mGlu<sub>2/3</sub> receptors to reward seeking, but cue-induced reinstatement procedures are not pure cue-triggered incentive motivation tests. Indeed, cue-induced reinstatement procedures also involve secondary reinforcement, as instrumental responding at test is reinforced by cue presentation (Shaham, Shalev, Lu, de Wit, & Stewart, 2003).

In contrast, Pavlovian-to-Instrumental transfer or (PIT) is a pure conditioned incentive paradigm that measures the ability of a cue to increase motivation for a reward (Cartoni, Balleine, & Baldassarre, 2016; Rescorla & Solomon, 1967; Walker, 1942; Wyvell & Berridge, 2000). In PIT, subjects learn to perform an instrumental response for a primary reward. Separately, they learn that one Pavlovian cue predicts non-contingent delivery of that reward (CS+), and a second, distinct cue does not (CS-). On the PIT test day, the rats can perform the same instrumental response, but no reward is given, and both the CS+ and CS- are presented non-contingently throughout this test. PIT is seen when CS+ presentations trigger increases in ongoing



instrumental responding, indicating cue-triggered increases in incentive motivation for the reward. PIT avoids primary reinforcement effects, because subjects are tested under extinction conditions, so that no primary reward is delivered. PIT also avoids secondary reinforcement, because instrumental responding at test is not reinforced by the reward cue.

Using PIT, we found previously that injecting the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 into the BLA suppressed cue-triggered increases in 'wanting' for the associated water reward (Garceau, Samaha, Cordahi, Servonnet, & Khoo, 2021). This work identifies potential neural circuits within which activation of these receptors mediates cue-triggered increases in reward 'wanting'. However, unlike systemic drug administration, intracerebral administration leads to the inevitable question of translational potential to humans.

In addition, to our knowledge, no published study [including Garceau et al. (2021)] has reported on the contributions of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity to cue-triggered increases in incentive motivation in female animals. There are limitations to generalizing findings obtained with males to females (Becker & Koob, 2016; Prendergast, Onishi, & Zucker, 2014; Shansky, 2019; Shansky & Murphy, 2021), and there are both similarities and differences in how the sexes respond to reward cues. Studies comparing the sexes on cue reactivity report mixed results, with some studies showing more (Perkins et al., 2001; Robbins, Ehrman, Childress, & O'Brien, 1999), less (Sterling, Dean, Weinstein, Murphy, & Gottheil, 2004) or comparable (Avants, Margolin, Kosten, & Cooney, 1995; Negrete & Emil, 1992; Rubonis et al., 1994; Waldrop et al., 2010) effects of drug-associated cues in drug-using women relative to men. Female and male rats can also show both similarities and differences in how they respond to appetitive cues, as measured using cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behaviour (Feltenstein, Henderson, & See, 2011) or Pavlovian extinction of PIT (Delamater, Schneider, & Derman, 2017).

Thus, here, we compared female and male rats on both cue-triggered increases in incentive motivation for a water reward, and the influence of systemic administration of a mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist on this effect.

## **METHODS**

### **Animals**

Adult male (200-225 g) and female (150-175 g) Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Montréal, Quebec, Canada) were housed 2 per cage in a climate-controlled

( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $30\pm 10\%$  humidity) colony room, under a reverse 12-hour light/dark cycle (lights off at 8:30 a.m.). We trained and tested rats during the dark phase of the circadian cycle. Upon arrival, food (Rodent 5075, Charles River Laboratories) and water were freely available in the home cage. Rats were handled daily after 72 hours of acclimation to the animal colony. Since we used water as the unconditioned stimulus (US), rats had restricted access to water beginning at 4 days after their arrival to facilitate acquisition of Pavlovian and Instrumental conditioning. Rats initially had 6 h/day of access to water for the first 4 days, 4 h/day for the next 3 days, and then 2 h/day until the end of each experiment. We gave water at least 1 hour after the end of testing and removed water bottles at the same time each day. Daily water consumption during each two-hour water restriction period was measured throughout Experiment 2. The Université de Montréal approved all procedures involving rats and procedures followed the 'Principles of laboratory animal care' and the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### **Behavioural Apparatus**

Rats were trained and tested in standard operant chambers (31.8 x 25.4 x 26.7 cm; Med Associates, VT, USA) located in a testing room separate from the rats' housing room. The operant chambers were placed within light and sound-attenuating boxes equipped with a ventilation fan that masked external noise. Each chamber was equipped with a tone generator located adjacent to the house light on the back wall, and a clicker located outside the chamber. On the opposite wall, two retractable levers (left active; right inactive) were located on either side of a water cup equipped with an infrared head entry detector. A liquid dispenser was set to deliver 100- $\mu\text{L}$  drops of water into the cup. Each chamber also contained 4 infrared photobeams spaced evenly at floor level to measure locomotor activity. A computer running Med-PC IV was connected to chambers and collected data.

### **Exp. 1: Cue-triggered increases in incentive motivation for water reward in female and male rats**

*Instrumental conditioning.* Behavioral procedures for general PIT were adapted from Derman and Ferrario (2018) and Garceau et al. (2021). Figure 1a shows the training and testing timeline. Female and male rats ( $n = 16/\text{sex}$ ) first underwent instrumental conditioning, during which they were trained to lever press for water reward. In the first session, water (100  $\mu\text{L}$ ) was delivered on a fixed-ratio 1 reinforcement schedule (FR1). Pressing a second lever (inactive) produced neither the reward nor any other programmed consequence. Sessions ended after 40

min or when rats earned 50 water deliveries. Rats were required to earn 50 water deliveries within a session to transition from FR1 to a variable interval (VI) reinforcement schedule. We increased the VI schedule across 8 sessions (40 min/session), in the following order: two VI10 sessions (range: 5-15 sec), two VI30 sessions (range: 15-45 sec) and four VI60 sessions (range: 30-90 sec). To determine the extent to which rats learned the response-water association, we recorded lever pressing and number of water rewards earned throughout each training session.

*Pavlovian conditioning.* Next, rats underwent 8 Pavlovian conditioning sessions during which they received eight, 2-minute presentations of two distinct auditory stimuli (4 presentations each); either a 1800-Hz, 85-dB tone or a 10-Hz clicker. One stimulus (CS+) was paired with 4 water deliveries (100  $\mu$ L each) per CS presentation on a VI30 schedule (range: 15-45 s; first water delivery  $\geq$  10 s from CS onset), while the other stimulus (CS-) was presented an equal number of times, but had no programmed consequences. Rats were allocated to the tone-CS+ or clicker-CS+ conditions such that mean active lever presses across the last four VI60 sessions and the number of FR1 sessions required to earn 50 water deliveries/session were comparable across the two CS+ conditions. On average, each inter-trial interval (ITI) separating CS presentations lasted 180 s (range: 120-240 s), such that each Pavlovian session lasted 44 min. The CS+ and CS- were presented in alternation during each session. During Pavlovian conditioning, levers were always retracted, such that rats could not interact with them. To determine the extent to which rats learned the CS+-water association, we recorded water cup entries during CS presentations and during the ITI.

*Pavlovian-to-Instrumental transfer (PIT) testing.* To compare the sexes on the expression and persistence of cue-triggered increases in incentive motivation for water reward, rats were tested for PIT following Pavlovian conditioning ('Day 1') and then again three to four weeks later ('Days 21-27'). On the day prior to each PIT test, rats received an instrumental reminder session identical to VI60 training described above. Levers were available throughout each PIT test session (42 min). PIT tests were conducted under extinction conditions, such that lever pressing never produced water. This enables assessment of cue-triggered increases in incentive motivation for the primary reward, without the confounding influence of primary reinforcement. After an initial 10 minutes, each CS (CS+ and CS-) was presented 4 times (2 min/presentation) in a counterbalanced order, with a fixed 2-min ITI. The CS were presented non-contingently, and never in response to lever pressing. This avoids the confounding influence of secondary reinforcement. We measured lever responses, water cup entries and locomotion throughout the session.

## **Exp. 2: Effects of systemic injection of an mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist on cue-triggered increases in incentive motivation for water reward**

Figure 3a illustrates the experimental timeline for Experiment 2. A new cohort of male and female rats ( $n = 16/\text{sex}$ ) were water restricted, trained, and tested as described for Experiment 1. PIT testing began two weeks after the end of Pavlovian conditioning.

### **LY379268 administration**

Rats received a subcutaneous injection of saline, 0.3 or 1 mg/kg of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist LY379268 (Cat No.: 2453, Batch No.: 9B/232416, CAS No.: 191471-52-0, Tocris Bioscience, Oakville, Ontario; in a volume of 1 ml/kg), 30 min before the start of PIT testing. We used a within-subjects design, with doses given in counterbalanced order (1 dose/day). LY379268 was dissolved in 0.9% saline, and the solution was then briefly heated and sonicated. The pH was adjusted to  $\sim 7$  with  $\sim 0.5 \mu\text{l}$  of 10N NaOH *per* 1 mg of LY379268 (Allain, Roberts, Levesque, & Samaha, 2017; Imre et al., 2006). Between PIT tests, rats received 1 instrumental and 1 Pavlovian reminder session.

### **Effects of reinforcer devaluation on cue-triggered incentive motivation**

In Experiment 1, female and male rats were compared on the expression and persistence of PIT. Here we also wished to compare the sexes on their response to the water-associated cue, following water devaluation. Thus, using the rats in Experiment 2, we assessed the effects of prior water devaluation on cue-triggered increases in instrumental responding for water reward across the sexes. To this end, all rats were given a final PIT test session (42 min). Half of the male and half of the female rats ( $n = 8/\text{sex}$ ) received free water access for 1 hour immediately before the start of this final PIT test session, while the other half ( $n = 8/\text{sex}$ ) did not. We measured lever responses and water cup entries throughout the PIT session.

### **Statistical Analysis**

Data were analysed using Graph Pad Prism. In Exps. 1 & 2, three-way mixed model ANOVA was used to analyse both active vs. inactive lever-pressing across instrumental conditioning sessions (Lever  $\times$  Session  $\times$  Sex; 'Lever' and 'Session' as within-subjects variables), and CS+ vs. CS- water cup entries across Pavlovian conditioning sessions (CS  $\times$  Session  $\times$  Sex; 'CS' and 'Session' as within-subjects variables). During PIT tests in Exp. 1, lever presses during CS+ vs. CS- were analysed using a three-way mixed model ANOVA (Lever  $\times$  CS  $\times$  Sex; 'Lever'

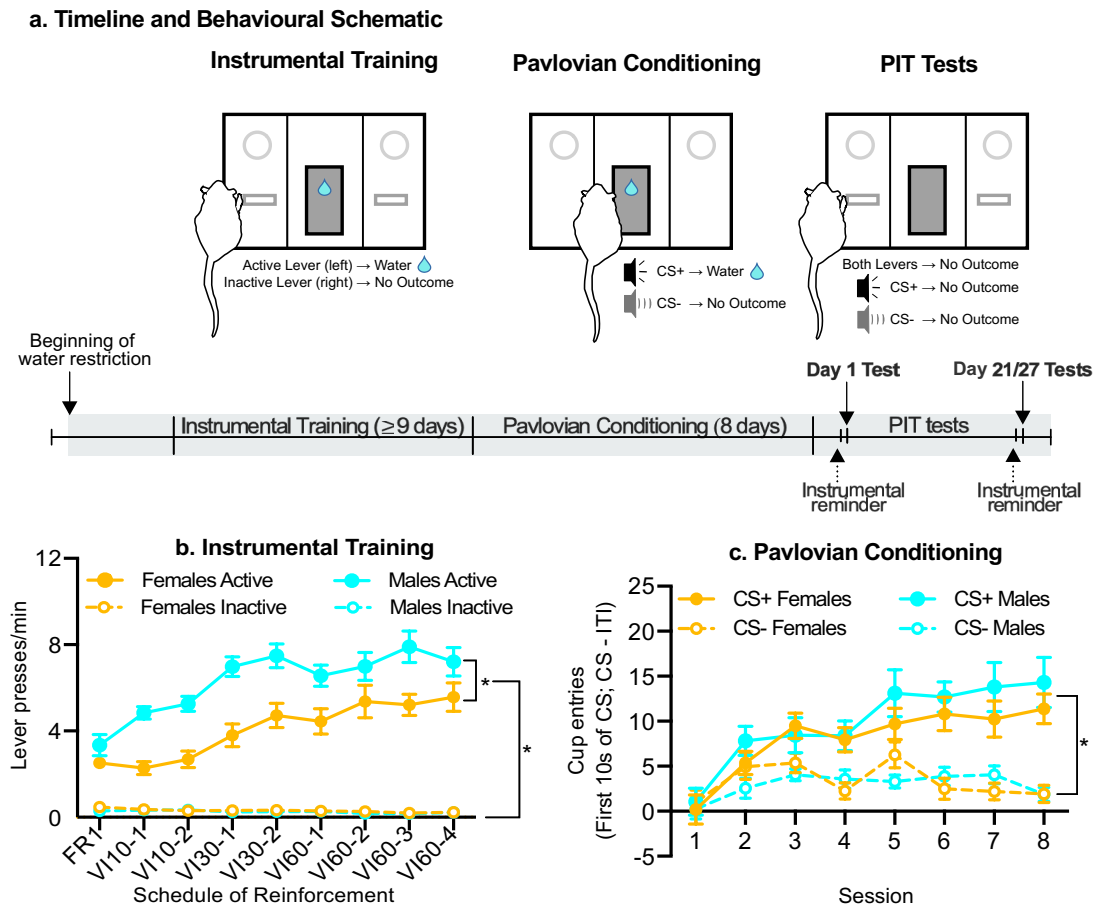
and 'Session' as within-subjects variables), and the number of water cup entries and locomotor activity during CS+ vs. CS- presentations were analysed using a two-way mixed model ANOVA (CS × Sex; 'CS' as a within-subjects variable). During PIT tests in Exp. 2, a two-way repeated measures ANOVA was used to analyse LY379268 effects on lever pressing, water cup entries and locomotion (LY379268 × CS; all as within-subjects variables). A two-way mixed model ANOVA was used to analyse devaluation effects on lever pressing and water cup entries (Devaluation × CS; 'CS' as a within-subjects variable). When interaction and/or main effects were significant, Bonferroni-adjusted multiple post-hoc comparisons were used to analyse further effects. When Mauchly's test of sphericity revealed a significant violation, the Greenhouse-Geisser correction was applied (for  $\epsilon < 0.75$ ). Across experiments, during PIT tests, we present lever pressing, water cup entries and locomotion rates during each CS (CS+ and CS-) presentations as elevation scores over baseline responding, given by the 2-min ITI period immediately prior to each 2-min CS presentation. Data are expressed as mean ± SEM. The  $\alpha$  level was set at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Exp. 1: Cue-triggered increases in incentive motivation for water reward in female and male rats

Rats received instrumental and then Pavlovian conditioning, before being tested for PIT (Fig. 1a). Rats increased their active lever pressing across instrumental training sessions (Fig. 1b; ANOVA; main effect of Session,  $F(8,240) = 18.58, p < 0.001$ ). Rats also pressed more on the active versus inactive lever (main effect of Lever,  $F(0.6279, 18.84) = 42.6, p < 0.001, \epsilon = 0.63$ ), and this difference increased across sessions (Lever × Session interaction,  $F(4.844, 145.3) = 23.14, p < 0.001, \epsilon = 0.61$ ). This indicates that female and male rats effectively learned to lever press for water. Furthermore, males pressed more on the active lever than females did during instrumental training (Sex × Lever × Session interaction,  $F(8,240) = 1.46, p = 0.17$ ; main effect of Sex,  $F(1, 30) = 15.25, p < 0.001$ ; Sex × Lever,  $F(1, 30) = 22.51, p < 0.001$ ; Sex × Session,  $F(8,240) = 1.66, p = 0.11$ ), earning on average 35% more water than females did per session (note that males also weighed 31% more than females did; data not shown). Thus, all rats learned to lever press for water reward, and male rats responded more for water than female rats did, likely due to their larger size.

Rats next underwent Pavlovian conditioning. Fig. 1c shows that across Pavlovian conditioning sessions, rats increased their average rates of water cup entries during the first 10 sec of CS presentation (main effect of Session,  $F(7,210) = 14.34, p < 0.001$ ). Rats also entered the water cup at a greater rate during CS+ compared to CS- presentations (Fig. 1c; main effect of CS,  $F(0.57,17.11) = 38.64, < 0.001, \epsilon = 0.57$ ), with this difference increasing across sessions (CS  $\times$  Session interaction,  $F(5.075, 152.2) = 9.45, p < 0.001, \epsilon = 0.72$ ). This conditioned discrimination between CS+ and CS- was similar between female and male rats (main effect of Sex,  $F(1,30) = 0.43, p = 0.52$ ; Sex  $\times$  CS,  $F(1,30) = 1.30, p = 0.26$ ; Sex  $\times$  Session,  $F(7,210) = 0.88, p = 0.53$ ; Sex  $\times$  CS  $\times$  Session interaction,  $F(7, 210) = 1.10, p = 0.36$ ). Thus, across the sexes, rats learned the CS+/water contingency, and this Pavlovian conditioning was similar in female and male rats.



**Fig. 1 Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 1.** (a) Female and male rats received instrumental (lever pressing for water reward) and Pavlovian (CS+/water and CS-/no water conditioning) sessions. We then measured cue-triggered increases in incentive motivation for water reward using Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT)

procedures. (b) Rats rapidly learned to discriminate between active and inactive levers, and the rate of active-lever presses increased over the daily 40-min instrumental training sessions, with the males pressing more often on the active lever than females did. (c) The rate of water cup entries during the first 10 sec of each CS presentation increased over the daily 44-min Pavlovian conditioning sessions, and there were no sex differences in this response. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 16/\text{sex}$ ). \*  $p < 0.05$ . FR; fixed ratio. VI; variable interval. CS; conditioned stimulus. ITI; inter-trial interval.

### ***Cue-triggered increases in incentive motivation for water reward***

During PIT tests, rats had access to both levers, but lever pressing was not reinforced by water or the CS+. Across CS types, rats pressed significantly more on the active than on the inactive lever, and did so when PIT tests were given both early (Day 1; Figs. 2a and c; main effect of Lever,  $F(1,30) = 17.77$ ,  $p < 0.001$ ) and late (Days 21/27; Fig. 2b and d;  $F(1,30) = 28.30$ ,  $p < 0.001$ ) after initial instrumental/Pavlovian conditioning. Thus, rats sought water during PIT testing and did so for up to 4 weeks after initial conditioning.

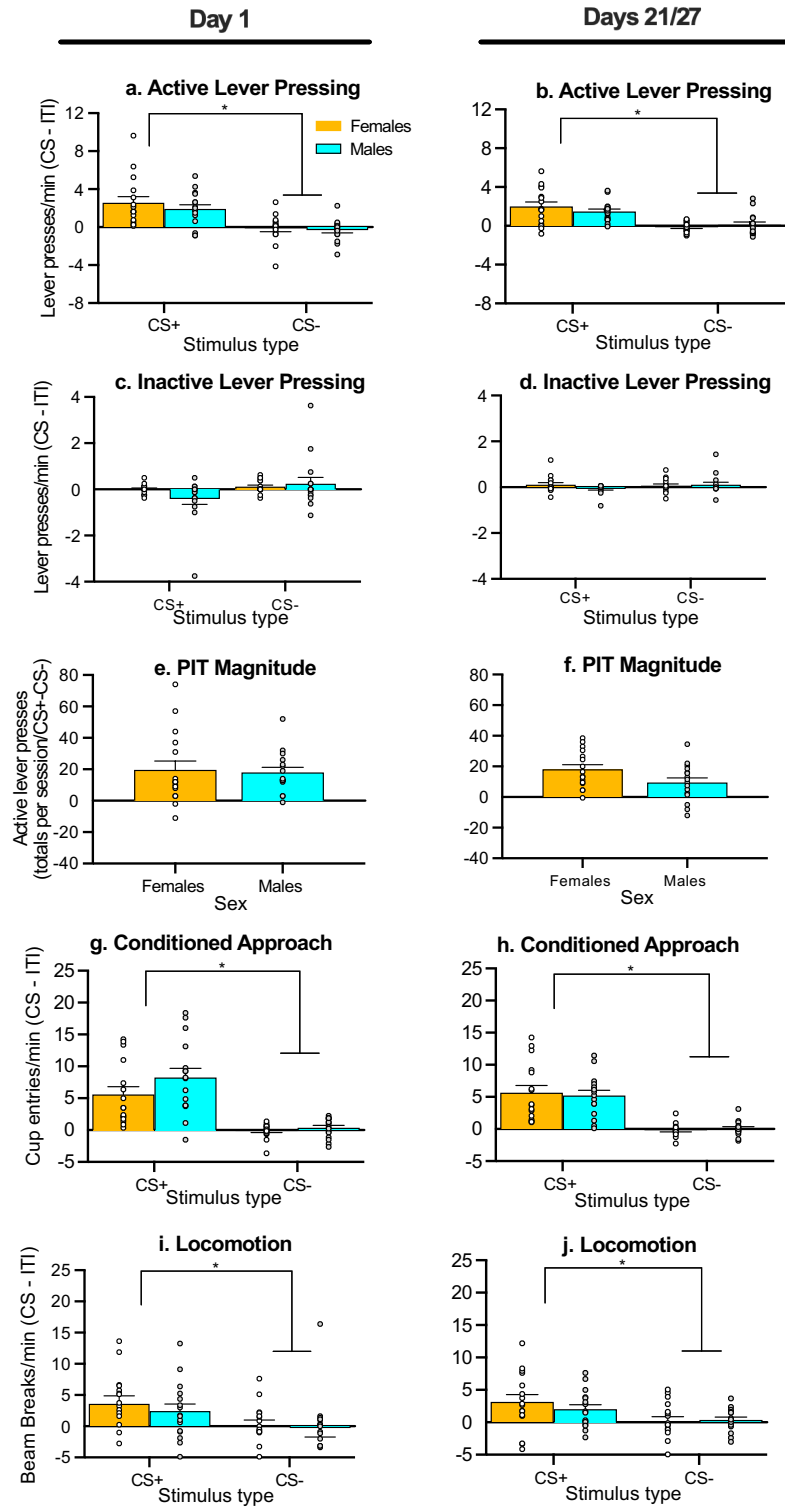
Across the sexes, rats pressed more on the active lever during CS+ versus CS- presentations, and did so during tests given both early (Day 1; Figs. 2a and c; main effect of CS,  $F(1,30) = 19.62$ ,  $p < 0.001$ ; CS  $\times$  Lever interaction,  $F(1,30) = 37.02$ ,  $p < 0.001$ ; active lever pressing during CS+  $>$  CS-,  $p < 0.001$ ) and late after initial instrumental/Pavlovian conditioning (Days 21-27; Figs. 2b and d; main effect of CS,  $F(1,30) = 24.95$ ,  $p < 0.001$ ; CS  $\times$  Lever interaction,  $F(1,30) = 36.36$ ,  $p < 0.001$ ; active lever pressing during CS+  $>$  CS-,  $p < 0.001$ ). There were no sex differences in this effect (Day 1, Figs. 2a and c; main effect of Sex,  $F(1,30) = 1.07$ ,  $p = 0.31$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,30) = 1.11$ ,  $p = 0.30$ ; Sex  $\times$  Lever interaction,  $F(1,30) = 0.34$ ,  $p = 0.57$ ; Days 21-27, Figs. 2b and d; main effect of Sex,  $F(1,30) = 0.39$ ,  $p = 0.54$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,30) = 2.18$ ,  $p = 0.15$ ; Sex  $\times$  Lever interaction,  $F(1,30) = 0.05$ ; All  $P$ 's  $>$  0.05). Across the 2 test timepoints, females and males also showed similar PIT magnitude, (Figs. 2e-f; main effect of Sex,  $F(1,30) = 1.09$ ,  $p = 0.31$ ; Sex  $\times$  Day interaction,  $F(1,30) = 1.77$ ,  $p = 0.19$ ). Thus, for up to 4 weeks after initial conditioning, presentation of the water-paired cue (CS+), but not the control cue (CS-) potentiated the operant pursuit of water reward, and this effect was comparable between female and male rats.

Rats entered the water cup more often during CS+ versus CS- presentations, and this was the case both early (Day 1; Fig. 2g; main effect of CS,  $F(1,60) = 48.18$ ,  $p < 0.001$ ) and later after initial instrumental/Pavlovian conditioning (Days 21-27; Fig. 2h; main effect of CS,  $F(1,60) = 58.23$ ,  $p < 0.001$ ). This conditioned approach response was similar between females and males

(Fig. 2g; main effect of Sex,  $F(1,60) = 2.59$ ,  $p = 0.11$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,60) = 1.26$ ,  $p = 0.27$ ; Fig. 2h; main effect of Sex,  $F(1,60) = 0.01$ ,  $p = 0.91$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,60) = 0.25$ ,  $p = 0.62$ ). Thus, rats showed significant cue-triggered discrimination of conditioned approach to the site of water delivery for up to 4 weeks after initial conditioning, and this response was similar in female and male rats.

Finally, female and male rats significantly increased their locomotor activity when the CS+ versus CS- was presented, and this was observed at both testing time points (Day 1; Fig. 2i; main effect of CS,  $F(1,30) = 7.88$ ,  $p = 0.01$ ; Days 21-27; Fig. 2j; main effect of CS,  $F(1,60) = 8.40$ ,  $p = 0.01$ ). This locomotor response was similar across the sexes (Day 1; Fig. 2i; main effect of Sex,  $F(1,30) = 0.36$ ,  $p = 0.55$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,30) = 0.13$ ,  $p = 0.72$ ; Days 21-27; Fig. 2j; main effect of Sex,  $F(1,60) = 0.25$ ,  $p = 0.62$ ; Sex  $\times$  CS interaction,  $F(1,60) = 0.79$ ,  $p = 0.38$ ). Thus, rats showed enhanced locomotor activity during CS+ vs. CS- presentations for up to 4 weeks after initial conditioning, and this effect was comparable in female and male rats.





**Fig. 2 Female and male rats showed similar Pavlovian-to-Instrumental transfer (PIT).** (a) Female and male rats pressed more on the previously water-associated lever when presented with the CS+ vs. the CS-, and this effect was observed both early, (b) and late after initial conditioning. (c-d) Across the sexes, CS+ and CS- presentations had similar effects on inactive

lever presses. (e) PIT magnitude was similar between females and males tested for PIT early, (f) and late after initial conditioning. (g) Female and male rats showed significant cue-triggered discrimination of conditioned approach behaviour, visiting the water cup more often during CS+ compared to CS- presentations, and this effect was seen both early, (h) and late after initial conditioning. (i) Female and male rats showed similar increases in locomotion when the CS+ vs. CS- was presented, and this was the case both early (j) and late after initial conditioning. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 16/\text{sex}$ ). \*  $p < 0.05$ . CS; conditioned stimulus. ITI; inter-trial interval.

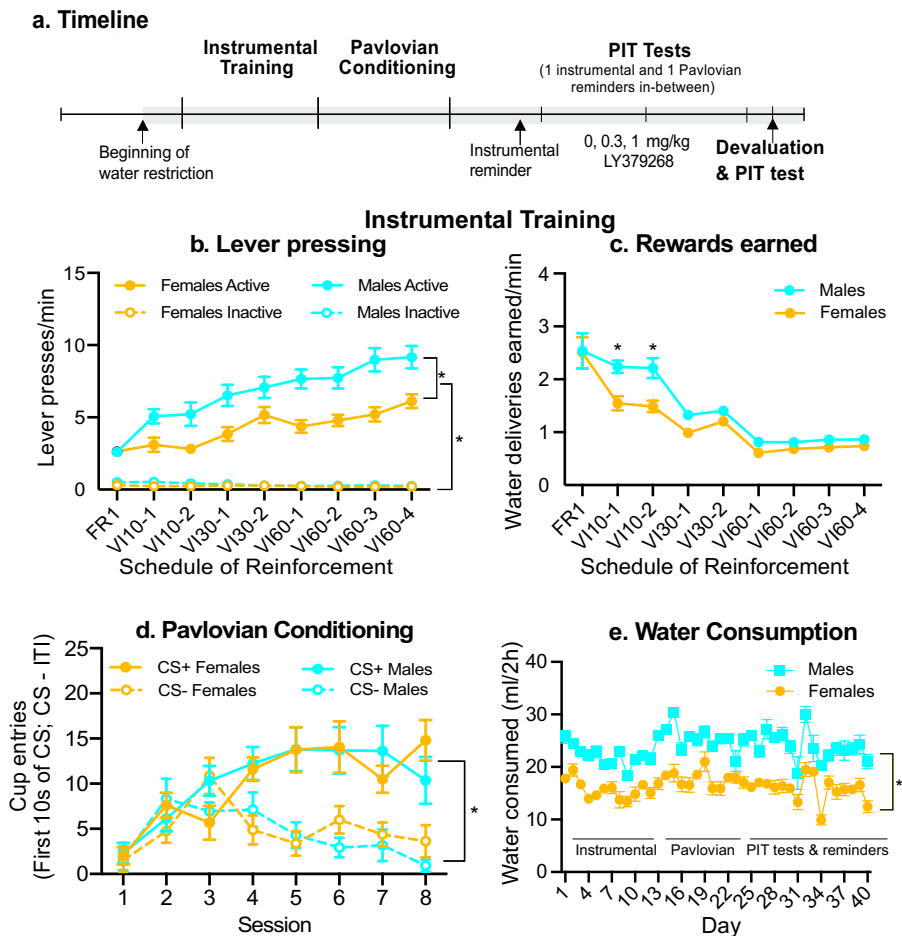
## **Exp. 2: Effects of systemic injection of an mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist on cue-triggered increases in incentive motivation for water reward**

Rats first received instrumental and Pavlovian conditioning, then, two weeks later, we assessed the effects of systemic injections of the mGlu<sub>2/3</sub> agonist, LY379268 on cue-elicited increases in instrumental responding for water reward (i.e., PIT; Fig. 3a). Across instrumental training sessions, rats increased their rates of lever pressing (Fig. 3b; main effect of Session,  $F(8,240) = 29.55$ ,  $p < 0.001$ ), and they pressed more on the active vs. inactive lever across sessions (main effect of Lever,  $F(0.6174, 18.52) = 257.5$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.62$ ; Lever  $\times$  Session interaction,  $F(4.821, 144.6) = 38.69$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.60$ ). Compared to females, males pressed more on the active lever, and also showed a greater increase in active lever pressing across sessions (Fig. 3b; Sex  $\times$  Lever  $\times$  Session interaction,  $F(8,240) = 4.59$ ,  $p < 0.001$ ; main effect of Sex,  $F(1,30) = 15.53$ ,  $p < 0.001$ ; Sex  $\times$  Lever,  $F(1,30) = 13.28$ ,  $p = 0.001$ ; Sex  $\times$  Session,  $F(8,240) = 3.46$ ,  $p < 0.001$ ; active lever pressing, males  $>$  females,  $p < 0.001$ ). Consequently, males earned more water than female rats did, specifically during the first two days of responding under a variable interval schedule of water reinforcement (Fig. 3c; main effect of Sex,  $F(1,30) = 11.63$ ,  $p = 0.002$ ; Sex  $\times$  Session interaction,  $F(8,240) = 2.16$ ,  $p = 0.03$ ; during VI10-1 and VI10-2 sessions, males  $>$  females,  $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ , respectively. No other comparisons were statistically significant). Female and male rats earned progressively fewer water deliveries/session over time (Fig. 3c; main effect of Session,  $F(1.85, 55.62) = 56.11$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.23$ ), due to the increasing VI schedules of reinforcement used. Thus, as in Experiment 1, all rats learned to lever press for water reward, and while male rats lever pressed more for water than female rats did, the two sexes earned a similar amount of water on the last 6 out of 8 instrumental conditioning sessions.

Over the course of Pavlovian conditioning, rats increased their average rates of water cup entries during the first 10 sec of CS presentation (Fig. 3d; main effect of Session,  $F(7,210) = 7.69$ ,  $p < 0.001$ ). Rats also visited the water cup more frequently during CS+ compared to CS- presentations (main effect of CS,  $F(0.5645, 16.93) = 53.96$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.56$ ), and this conditioned discrimination increased across sessions (CS  $\times$  Session interaction,  $F(4.205, 126.1)$

= 8.74,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.60$ ). There were no sex differences in this response (main effect of Sex,  $F(1, 30) = 0.01$ ,  $p = 0.93$ ; Sex  $\times$  CS,  $F(1,30) = 0.28$ ,  $p = 0.60$ ; Sex  $\times$  Session,  $F(7,210) = 0.97$ ,  $p = 0.45$ ; Sex  $\times$  CS  $\times$  Session interaction,  $F(7, 210) = 1.74$ ,  $p = 0.10$ ). Thus, rats showed CS+ triggered conditioned approach to the site of water delivery, and females and males did so to a comparable degree.

As Fig. 3e shows, in Experiment 2, we measured daily water consumption in females and males during the 2-h/day access periods. Male rats consumed more water than female rats did (main effect of Sex,  $F(1,14) = 68.77$ ,  $p < 0.001$ ; Sex  $\times$  Day interaction,  $F(39, 546) = 1.92$ ,  $p = 0.001$ ).



**Fig. 3 Timeline and acquisition of instrumental and Pavlovian conditioning in Experiment 2.** (a) Female and male rats underwent instrumental and Pavlovian conditioning. Two weeks after the last conditioning session, we assessed the influence of subcutaneous injections of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist, LY379268 (0, 0.3 and 1 mg/kg) on cue-triggered increases in incentive motivation for water, using Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT) procedures. One day after the

last LY379268 injections test, we assessed the influence of reward devaluation on the expression of PIT. (b) The rate of active lever presses increased over the daily 40-min instrumental training sessions, and males pressed more often on the active lever than females did. (c) During instrumental training, males also earned more water than females did. (d) The rate of water cup entries during the first 10 sec of each CS presentation increased over the daily 44-min Pavlovian conditioning sessions, and there were no sex differences in this effect. (e) Males consumed more water than females did during the 2-h daily water access periods. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 16/\text{sex}$ ). \* $p < 0.05$ . FR; fixed ratio. VI; variable interval. CS; conditioned stimulus. ITI; inter-trial interval.

### ***Effects of systemic LY379268 on lever pressing***

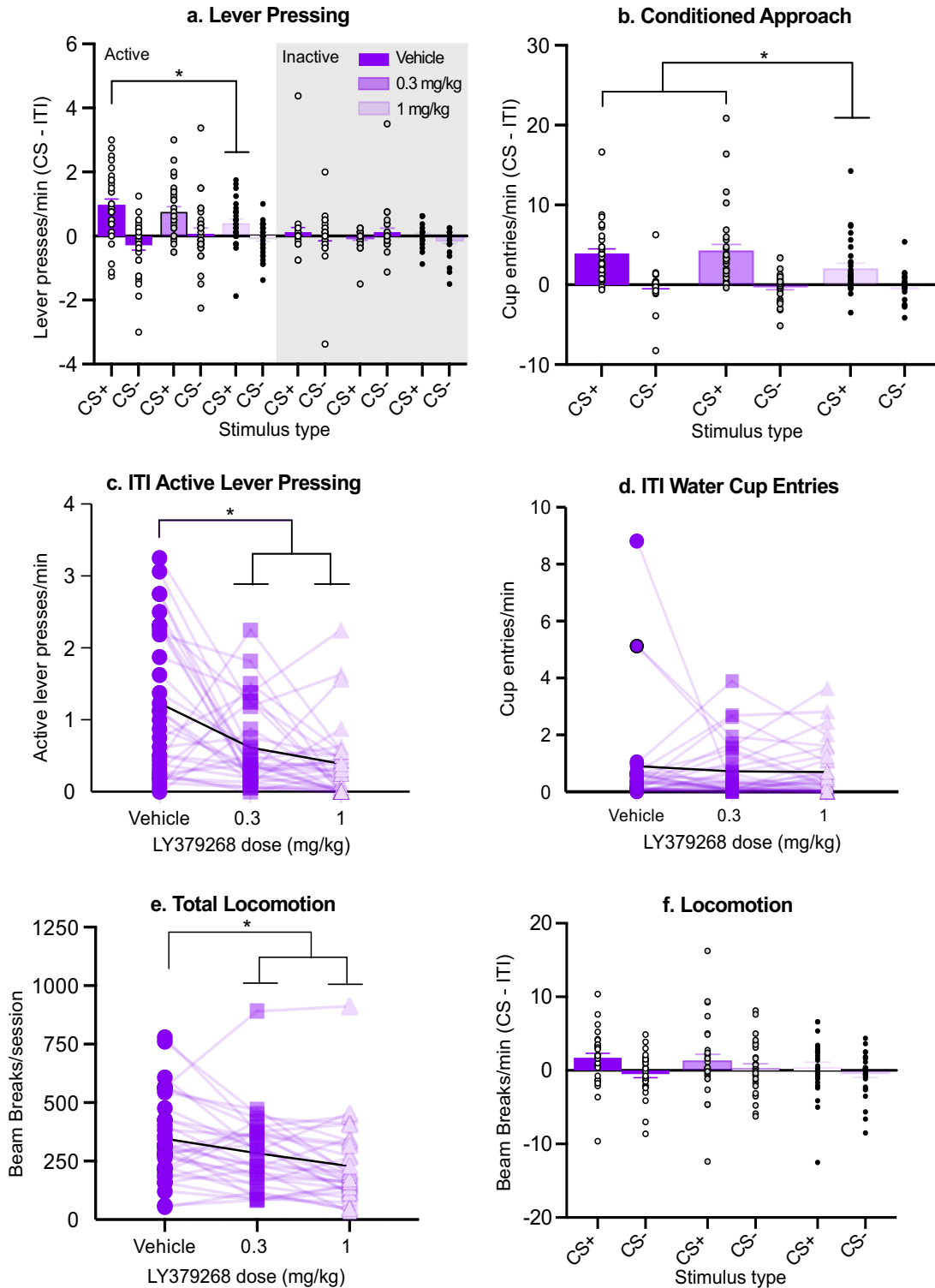
Rats received systemic injections of LY379268 (0, 0.3 and 1 mg/kg, s.c.) 30 min before being tested for PIT. As in Exp. 1, females and males showed similar behavioural responses during baseline PIT testing (i.e., when injected with vehicle; All  $P$ 's  $> 0.05$ ). The sexes also responded similarly to LY379268 during PIT tests (All  $P$ 's  $> 0.05$ ). Thus, all PIT data were collapsed across the sexes.

An initial analysis across all PIT test sessions showed that rats pressed more often on the previously water-associated (active) lever during CS+ water cue vs. CS- presentations (Fig. 4a; main effect of CS,  $F(1,179) = 41.95$ ,  $p < 0.001$ ). In contrast, rates of inactive lever pressing were similar during CS+ and CS- (Fig. 4a;  $p = 0.65$ ). Thus, CS+ presentation selectively increased pressing on the previously water-associated lever, without increasing lever-pressing behaviour indiscriminately.

The effects of LY379268 on lever pressing during PIT tests depended upon CS type, such that LY379268 dose-dependently attenuated active lever pressing during CS+, but not during CS- presentations (Fig. 4a, active lever; CS  $\times$  LY379268 interaction,  $F(2,179) = 3.53$ ,  $p = 0.03$ ; during CS+ presentations, 1 mg/kg LY379268  $<$  Vehicle;  $p = 0.026$ . No other comparisons were statistically significant). LY379268 did not influence responding on the inactive lever (Fig. 4a, inactive lever; All  $P$ 's  $> 0.05$ ). This suggests that the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist selectively decreased lever pressing for water reward, without influencing lever-pressing behaviour indiscriminately. However, rates of inactive lever pressing were already low under baseline (vehicle) conditions, indicating a potential floor effect. This being said, the data indicate that activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors attenuated CS+ triggered potentiation of water-seeking behaviour, suggesting suppressed cue-triggered increases in incentive motivation for water.

Fig. 4b shows that analysis of water cup approach data during PIT tests, a measure that reflects the conditioned anticipation of water reward. Rats visited the water cup more often during CS+ vs. CS- presentations (Fig. 4b; main effect of CS,  $F(1,31) = 38.99$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, the rats showed cue-triggered discrimination of approach to the site of water delivery. LY379268 dose-dependently reduced water cup entries, and did so specifically during CS+ presentations (main effect of LY379268,  $F(2,62) = 3.10$ ,  $p = 0.052$ ; LY379268  $\times$  CS interaction,  $F(2,62) = 4.07$ ,  $p = 0.02$ ; during CS+, Vehicle  $>$  1 mg,  $p = 0.01$ ; 0.3 mg  $>$  1 mg,  $p = 0.002$ ; during CS-, all  $P$ 's  $>$  0.05. Note however that rats rarely entered the water cup during CS- presentations, indicating a potential floor effect). Thus, the CS+, but not the CS- increased the frequency of visits to the water cup, and activating mGlu<sub>2/3</sub> receptors reduced this CS+-induced conditioned approach behaviour.

During PIT tests, LY379268 suppressed some general motor behaviours and left others unchanged. Fig. 4c shows that compared to vehicle, LY379268 reduced rates of active lever pressing during intervals between CS+/CS- presentations (inter-trial intervals or ITI;  $F(2,62) = 12.94$ ,  $p < 0.001$ ; Vehicle  $>$  0.3 mg,  $p = 0.002$ ; Vehicle  $>$  1 mg,  $p < 0.001$ ). However, Fig. 4d shows that LY379268 did not influence the rates of water cup entries during the ITI ( $F(1.267, 39.28) = 0.29$ ,  $p = 0.64$ ,  $\epsilon = 0.63$ ). LY379268 also reduced total locomotor activity counts (Fig. 4e;  $F(2,62) = 11.65$ ,  $p < 0.001$ ; Vehicle  $>$  1 mg,  $p < 0.001$ ; Vehicle  $>$  0.3 mg,  $p = 0.04$ ), but not locomotor activity during CS presentations (Fig. 4f; Main effect of LY379268,  $F(2,62) = 1.37$ ,  $p = 0.26$ ; LY379268  $\times$  CS interaction,  $F(2,62) = 0.63$ ,  $p = 0.54$ ). In summary, LY379268 attenuated lever pressing for water reward during inter-trial intervals and total locomotion levels, but LY379268 left both water cup entries during inter-trial intervals and locomotion during CS presentations unaffected.



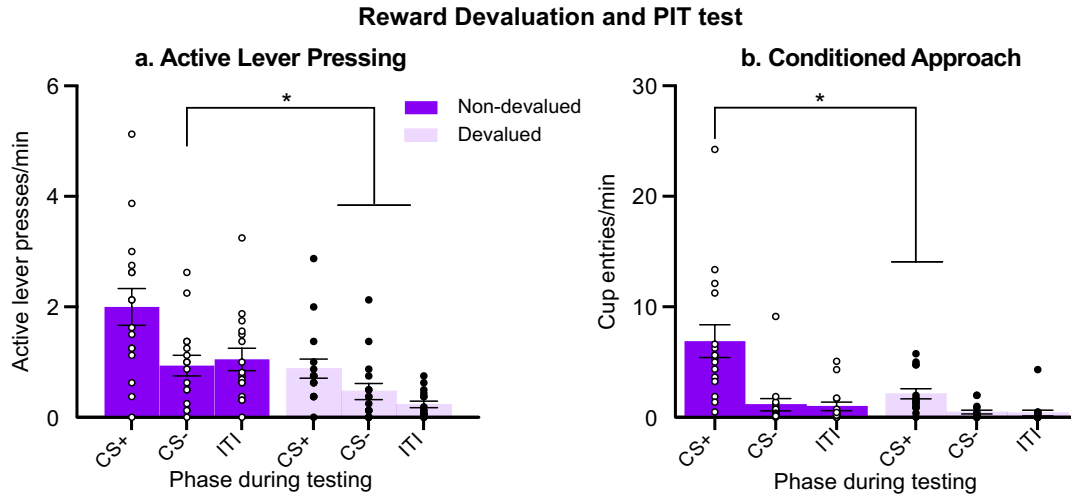
**Fig. 4 Systemic injection of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist, LY379268 attenuated cue-triggered increases in both instrumental responding for water reward and conditioned approach behaviours to the site of water delivery in male and female rats. (a) During Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT) tests, CS<sup>+</sup> presentations invigorated lever pressing for**

water reward, and LY379268 (1 mg/kg) reduced this effect. LY379268 had no effect on inactive lever presses. (b) During PIT testing, the rate of water cup entries was significantly higher during CS+ versus CS- presentations, and LY379268 (1 mg/kg) reduced this Pavlovian conditioned approach behaviour. (c) During inter-trial intervals (ITI), LY379268 suppressed active lever presses, (d) but had no effect on water cup entries. (e) Similarly, LY379268 reduced total locomotor activity, (f) but not locomotor activity during CS presentations. There were no sex differences in any of these responses. In Panels (c), (d), and (e), the black curve represents group averages. Bar graphs present data as means  $\pm$  SEM (N = 32; half female, half male). \*  $p < 0.05$ . CS; conditioned stimulus.

### ***Effects of prior water devaluation on lever pressing***

Finally, after quantifying LY379268 effects on cue-triggered responding for water reward, we gave all rats a final PIT test (without LY379268 injections). Immediately before this test, half of the rats of each sex received water access for 1 h, to examine the influence of reward devaluation on PIT. Despite prior reward devaluation, rats pressed more often on the previously water-associated (active) lever during CS+ versus CS-presentation (Fig. 5a; main effect of CS,  $F(2,60) = 17.49$ ,  $p < 0.001$ ). However, reward devaluation produced an overall reduction of the incentive motivation for water, seen as reduced responding on the previously water-associated lever across CS+, CS- and ITI periods (Fig. 5a; main effect of Devaluation,  $F(1,30) = 12.77$ ,  $p = 0.001$ ; Devaluation  $\times$  CS interaction,  $F(2,60) = 2.33$ ,  $p = 0.11$ ).

The rats visited the water cup more frequently during CS+ presentations vs. during CS- presentations or the ITI (Fig. 5b; main effect of CS,  $F(1,110, 33.29) = 26.03$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon = 0.55$ ), and devaluation reduced this cue-triggered discrimination of conditioned approach response (Fig. 5b; main effect of Devaluation,  $F(1,30) = 8.09$ ,  $p = 0.01$ ; Devaluation  $\times$  CS interaction,  $F(2,60) = 7.81$ ,  $p < 0.001$ ; CS+ Non-devaluation  $>$  CS+ Devaluation,  $p = 0.02$ . No other comparisons were statistically significant). Thus, letting rats drink water before testing (i.e., devaluing water reward) reduces both responding on the previously water-associated lever and CS+ triggered increases in conditioned anticipation of water reward. This suggests that under our conditions, CS+ evoked potentiation of responding for water reward remains a deliberate, goal-directed behaviour, rather than a habitual response that relies exclusively on past instrumental/Pavlovian experience.



**Fig. 5 Water reward devaluation attenuated both lever pressing for this reward and cue-triggered approach behaviours to the site of water delivery in male and female rats.** (a) During tests for Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT), CS+ presentations increased ongoing lever pressing for water reward, and prior water devaluation reduced this instrumental response. (b) During PIT testing, rats entered the water cup significantly more often during CS+ versus CS- presentations, and prior devaluation of water reward decreased this Pavlovian conditioned approach response. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 16$ /condition, half female, half male). \*  $p < 0.05$ . CS; conditioned stimulus.

## DISCUSSION

Here we compared the sexes on cue-triggered potentiation of water reward-seeking behaviours. We report three key findings. First, female and male rats show comparable expression and persistence of PIT, responding more for water during CS+ versus CS- presentations, and doing so both early (Day 1) and later (Days 21-27) after initial conditioning. This indicates that the sexes show similar cue-triggered potentiation of incentive motivation for water reward. Second, in female and male rats, water devaluation reduced both water-seeking behaviour and cue-triggered conditioned approach to the water port. Finally, activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors with a selective agonist suppressed cue-triggered increases in both water reward seeking and water anticipation, and this effect was comparable in females and males.

### Biological sex influences performance during instrumental training, but not during Pavlovian conditioning or PIT tests

Male rats showed higher rates of lever-pressing for water during instrumental training relative to females, and they also earned more water during initial instrumental conditioning



sessions. However, this effect was short-lived, such that on the last 6 of 8 instrumental sessions, males and females earned similar amounts of water. The schedule of reinforcement became progressively more demanding across training sessions. It is possible that male rats earned more water on the first few sessions because response requirements were lower during these earlier sessions, and the males' larger bodies require more water (see Fig. 3e). Females and males showed similar performance during Pavlovian conditioning. The acquisition of CS+ triggered conditioned approach behaviour was similar between the sexes. Finally, even though males consume more water and can also self-administer more water during instrumental sessions, females and males showed similar CS+-triggered increases in both water-seeking actions and conditioned approach behaviours during PIT testing. We also found no sex differences in the persistence of these effects. Thus, for up to 4 weeks after initial conditioning, females and males showed comparable CS+ evoked potentiation of water-seeking and conditioned approach behaviours.

Our findings are consistent with work showing similar cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in female and male rats (Feltenstein et al., 2011). Note also that Fuchs, Evans, Mehta, Case, and See (2005) found no effect of estrous phase on cue-induced reinstatement of extinguished reward seeking. To our knowledge, there are no published accounts of how hormonal fluctuations might influence PIT in females. This being said, in a meta-analysis of neuroscience-related traits, Becker, Prendergast, and Liang (2016) found that while there can be instances where females are more variable than males, there is an *'overall absence of sex differences in variability across diverse traits of interests to neuroscientists'*, such that *'inclusion of intact females, without regard to estrous cycle, and intact males is a valid approach to learn about females in neuroscience research'*.

### **Activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors attenuates cue-triggered increases in incentive motivation for reward**

We found that in female and male rats, systemic administration of an mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist (LY379268) impairs the ability of a water-associated cue to increase both water-seeking actions and conditioned anticipation of water reward. This concords with studies showing that mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity mediates cue-triggered appetitive behaviours, such as cue-induced reinstatement of reward-seeking behaviour (Backstrom & Hyttia, 2005; Baptista et al., 2004; Bossert, Poles, et al., 2006; Lu et al., 2007; Uejima et al., 2007; Zhao et al., 2006).

Here, LY379268 decreased cue-induced potentiation of reward seeking in a pure conditioned incentive motivation paradigm. The PIT procedure we used allowed us to selectively assess the influence of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity on incentive motivation, because PIT measures the ability of a cue to trigger motivation for a reward, without the confounding influences of either primary or secondary reinforcement (Balleine, 1994; Dickinson & Balleine, 1994; Dickinson & Dawson, 1987; Rescorla & Solomon, 1967; Wyvell & Berridge, 2000). As such, the effects of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activation likely do not involve any suppression of the primary reinforcing value of water, because rats were tested under extinction conditions, when lever pressing no longer produced water. Our water consumption data also show that on PIT test days, when rats received the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist, they consumed as much water in their home cages after testing as they had on preceding days (Fig. 3e). This further supports the idea that administration of an mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist does not significantly change the reinforcing properties of water.

Our results cannot be due to the ability of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity to mediate conditioned reinforcement. Pavlovian cues can act as conditioned reinforcers, strengthening preceding instrumental responses. To act as a conditioned reinforcer, a reward cue must be presented contingently after an instrumental response. However, the PIT procedure we used precluded any such reinforcement contingency, as the cue was presented independently of lever-pressing behaviour. Thus, the results suggest that pharmacological activation of mGlu<sub>2/3</sub> receptors decreases the pure conditioned incentive impact of reward cues, without necessarily influencing primary or secondary reinforcement. As such, mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity could have suppressed cue effects on reward-seeking behaviour by decreasing the incentive salience of the cue-triggered neural representation of water reward (see Wyvell & Berridge, 2000).

The neurobiological mechanisms involved in the ability of mGlu<sub>2/3</sub> receptor activation to attenuate cue-induced incentive motivation for reward remain to be studied. However, the observed attenuation of cue-triggered incentive motivation following mGlu<sub>2/3</sub> activation is consistent with a reduction in synaptic glutamate release. We did not measure extracellular glutamate concentrations here. However, mGlu<sub>2/3</sub> receptor activity provides autoregulatory, negative feedback to decrease stimulated glutamate release (Conn & Pin, 1997; Imre, 2007; Schoepp, 2001). Several studies suggest that cue-triggered increases in incentive motivation require synaptic glutamate in regions such as the amygdala (Derman, Bass, & Ferrario, 2020; Feltenstein & See, 2007; Garceau et al., 2021; Khoo, LeCocq, Deyab, & Chaudhri, 2019; Lu et al., 2007; Malvaez et al., 2015) and the nucleus accumbens (Derman & Ferrario, 2018). Thus,

our findings extend work showing that synaptic glutamate transmission is necessary for cue-triggered increases in incentive motivation.

We found that systemic LY379268 attenuated some motor measures, but not others. LY379268 reduced total locomotor activity and lever pressing behaviour during inter-trial intervals (i.e., in the absence of the CS+). Previous studies using male rats have also noted motor effects with systemic LY379268 (Allain et al., 2017; Backstrom & Hyttia, 2005; Kufahl, Martin-Fardon, & Weiss, 2011), but at doses higher than used here ( $\geq 2$  mg/kg). For instance, Backstrom and Hyttia (2005) found that at 5 mg/kg, LY379268 decreased spontaneous locomotor activity in male rats. Other studies (Allain et al., 2017; Cannady, Grondin, Fisher, Hodge, & Besheer, 2011; Kufahl et al., 2011) found that the doses used here (0.3 or 1 mg/kg) did not significantly impair motor behaviour (but 2 and 3 mg/kg did). There are differences in the species used in these previous experiments compared to the present one. Cannady et al. (2011) used Long-Evans rats, others used Wistar rats (Allain et al., 2017; Kufahl et al., 2011), while here we used Sprague-Dawley rats. The apparent discrepancies between our findings and these previous experiments may arise from inherent species differences in sensitivity to the motor-impairing effects of LY379268. Sensitivity to the motor-impairing effects of LY379268 is also brain region-dependent. For example, the amygdala is relatively insensitive to LY379268's motor effects (e.g., at 6  $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$ ), while lower doses (3  $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$ ) injected into the nucleus accumbens can reduce locomotion (Besheer et al., 2010; Cannady et al., 2011). This suggests that systemic LY379268 may evoke some motor-suppressing effects in part by diffusing to sites of action in the nucleus accumbens. Indeed, systemic LY379268 can reduce activity in neuronal projections from the nucleus accumbens to the globus pallidus (Cannady et al., 2011), a structure that coordinates locomotor function (Mogenson, Swanson, & Wu, 1983). Thus, in the present work, motor suppression could have contributed at least partially to the effects of LY379268 on CS-evoked increases in incentive motivation.

However, it is unlikely that the effects of the mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonist on PIT are driven by motor actions alone. First, LY379268 completely spared motor behaviours including locomotor activity during CS presentations and water cup entries during inter-trial intervals. Second, during inter-trial intervals, water cup entries occurred at a similar rate as active lever pressing did (compare Figs. 4c and d). However, LY379268 injection only suppressed the latter behavioural response. Thus, a simple motor-suppression explanation of behaviour cannot account for the effects of LY379268 during PIT testing. Second, other work shows that LY379268 can decrease cue-triggered potentiation of incentive motivation for reward without having non-specific motor

effects. For example, injecting LY379268 into the BLA reduces both cue-evoked potentiation of incentive motivation for water reward and CS-induced anticipation of reward, without affecting other motor behaviours such as locomotion, and active lever pressing or water cup entries during inter-trial intervals (Garceau et al., 2021). Of course, the effects of systemic injections of LY379268 could be different. Whatever the case may be, future work can determine the extent to which motor suppression contributes to LY379268's effects on the behavioural response to reward cues using different mGlu<sub>2/3</sub> receptor agonists and/or different doses of LY379268.

### **Prior reward devaluation attenuates cue-triggered increases in incentive motivation for reward**

When rats were allowed to freely drink water for 1 h before PIT testing, thus devaluing the water reward, they showed reduced responding on the water-associated lever and reduced conditioned approach to the water cup. There were no significant differences between females and males in this effect. Previous studies on the influence of devaluation on cue-triggered increases in incentive motivation report mixed results, possibly due to the different procedures used. In rats, devaluation by satiation suppresses general, but not specific PIT (Corbit, Janak, & Balleine, 2007; Holland, 2004). While devaluation by conditioned taste aversion (i.e., pairing the reward with illness induced by lithium chloride) had no effect on PIT in a single-lever paradigm (Holland, 2004), satiation abolished PIT under the same test conditions (Aitken, Greenfield, & Wassum, 2016; Dailey, Moran, Holland, & Johnson, 2016). The latter finding is consistent with our results, as we used a single-outcome PIT paradigm and observed that devaluation by satiation suppressed both reward-associated lever responding and cue-triggered increases in conditioned approach. The palatability of the primary reward can also influence the response to devaluation by satiation. For instance, Kendig, Cheung, Raymond, and Corbit (2016) showed that devaluation by satiation is less effective in reducing food-seeking behaviour in the presence of contexts or discrete cues paired with junk food, compared to when rats were in the presence of contexts and cues paired with less palatable, regular chow. Here, we used plain water as the US, which is less reinforcing after satiation because water's reinforcing properties depend upon the level of thirst. This could explain the suppressive effects of devaluation we found on water-associated lever responding. Thus, water-seeking responses in our paradigm were sensitive to devaluation, suggesting this instrumental responding was likely goal-directed, and not habitual (Balleine & Dickinson, 1998).

## **Conclusions**

In conclusion, a water-associated cue increases both conditioned anticipation of water reward and water-seeking actions, and does so to a similar extent in female and male rats. Water devaluation by satiation also reduced water-associated lever responding and cue-triggered conditioned anticipation of water reward in both sexes. Finally, our results confirm and extend previous findings, showing that in both sexes, activating mGlu<sub>2/3</sub> receptors with systemic injections of LY379268 decreases both reward-seeking actions when the reward is not available (i.e., under extinction conditions), and cue-triggered increases in conditioned approach to the site of water delivery. These effects were seen at an LY379268 dose that also suppressed some motor measures. However, motor deficits are unlikely to fully account for LY379268's effects on PIT, because the agonist left other motor measures unchanged. Thus, we hypothesize that signaling via mGlu<sub>2/3</sub> receptors mediates the motivating influence of appetitive cues, thereby influencing the ability of such cues to goad reward-seeking actions when the associated reward is not immediately available.

## **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge Rifka (Rebecca) C. Derman, Carrie R. Ferrario and Cameron Nobile for generously sharing equipment, computer programs and advice in setting up the behavioural tasks used in this work.

## **Funding and Disclosure**

This work was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (grant 355923) and the Canada Foundation for Innovation to ANS (grant 24326). ANS holds a salary award from the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (Grant #28988). CG was supported by a Master's scholarship (B1X) from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (Grant #275340).

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Aitken, T. J., Greenfield, V. Y., & Wassum, K. M. (2016). Nucleus accumbens core dopamine signaling tracks the need-based motivational value of food-paired cues. *Journal of Neurochemistry*, *136*(5), 1026-1036. doi:10.1111/jnc.13494
- Allain, F., Roberts, D. C. S., Levesque, D., & Samaha, A. N. (2017). Intermittent intake of rapid cocaine injections promotes robust psychomotor sensitization, increased incentive motivation for the drug and mGlu2/3 receptor dysregulation. *Neuropharmacology*, *117*, 227-237. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.026
- Avants, S. K., Margolin, A., Kosten, T. R., & Cooney, N. L. (1995). Differences between responders and nonresponders to cocaine cues in the laboratory. *Addictive Behaviors*, *20*(2), 215-224. doi:10.1016/0306-4603(94)00066-2
- Backstrom, P., & Hyytia, P. (2005). Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. *European Journal of Pharmacology*, *528*(1-3), 110-118. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.051
- Balleine, B. (1994). Asymmetrical interactions between thirst and hunger in Pavlovian-instrumental transfer. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, *47*(2), 211-231. doi:10.1080/14640749408401357
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, *37*(4-5), 407-419. doi:10.1016/s0028-3908(98)00033-1
- Baptista, M. A. S., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2004). Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4723-4727. doi:10.1523/JNEUROSCI.0176-04.2004
- Becker, J. B., & Koob, G. F. (2016). Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. *Pharmacological Reviews*, *68*(2), 242-263. doi:10.1124/pr.115.011163
- Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, *7*, 34. doi:10.1186/s13293-016-0087-5
- Besheer, J., Grondin, J. J., Cannady, R., Sharko, A. C., Faccidomo, S., & Hodge, C. W. (2010). Metabotropic glutamate receptor 5 activity in the nucleus accumbens is required for the

- maintenance of ethanol self-administration in a rat genetic model of high alcohol intake. *Biological Psychiatry*, 67(9), 812-822. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.016
- Bossert, J. M., Gray, S. M., Lu, L., & Shaham, Y. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens shell attenuates context-induced relapse to heroin seeking. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2197-2209. doi:10.1038/sj.npp.1300977
- Bossert, J. M., Poles, G. C., Sheffler-Collins, S. I., & Ghitza, U. E. (2006). The mGluR2/3 agonist LY379268 attenuates context- and discrete cue-induced reinstatement of sucrose seeking but not sucrose self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 173(1), 148-152. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.008
- Cannady, R., Grondin, J. J., Fisher, K. R., Hodge, C. W., & Besheer, J. (2011). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits the discriminative stimulus effects of alcohol via selective activity within the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2328-2338. doi:10.1038/npp.2011.121
- Cartoni, E., Balleine, B., & Baldassarre, G. (2016). Appetitive Pavlovian-instrumental Transfer: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 71, 829-848. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.09.020
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 205-237. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205
- Corbit, L. H., Janak, P. H., & Balleine, B. W. (2007). General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: the effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3141-3149. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05934.x
- Dailey, M. J., Moran, T. H., Holland, P. C., & Johnson, A. W. (2016). The antagonism of ghrelin alters the appetitive response to learned cues associated with food. *Behavioural Brain Research*, 303, 191-200. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.040
- Delamater, A. R., Schneider, K., & Derman, R. C. (2017). Extinction of specific stimulus-outcome (S-O) associations in Pavlovian learning with an extended CS procedure. *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*, 43(3), 243-261. doi:10.1037/xan0000138
- Derman, R. C., Bass, C. E., & Ferrario, C. R. (2020). Effects of hM4Di activation in CamKII basolateral amygdala neurons and CNO treatment on sensory-specific vs. general PIT:

- refining PIT circuits and considerations for using CNO. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(5), 1249-1266. doi:10.1007/s00213-020-05453-8
- Derman, R. C., & Ferrario, C. R. (2018). Enhanced incentive motivation in obesity-prone rats is mediated by NAc core CP-AMPA receptors. *Neuropharmacology*, 131, 326-336. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.12.039
- Di Ciano, P., Cardinal, R. N., Cowell, R. A., Little, S. J., & Everitt, B. J. (2001). Differential involvement of NMDA, AMPA/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of pavlovian approach behavior. *Journal of Neuroscience*, 21(23), 9471-9477. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-23-09471.2001
- Dickinson, A., & Balleine, B. (1994). Motivational control of goal-directed action. *Animal Learning & Behavior*, 22(1), 1-18. doi:10.3758/BF03199951
- Dickinson, A., & Dawson, G. R. (1987). Pavlovian processes in the motivational control of instrumental performance. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 39(3), 201-213. doi:10.1080/14640748708402264
- Feltenstein, M. W., Henderson, A. R., & See, R. E. (2011). Enhancement of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by yohimbine: sex differences and the role of the estrous cycle. *Psychopharmacology (Berl)*, 216(1), 53-62. doi:10.1007/s00213-011-2187-6
- Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2007). NMDA receptor blockade in the basolateral amygdala disrupts consolidation of stimulus-reward memory and extinction learning during reinstatement of cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(4), 435-444. doi:10.1016/j.nlm.2007.05.006
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Mehta, R. H., Case, J. M., & See, R. E. (2005). Influence of sex and estrous cyclicity on conditioned cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(3), 662-672. doi:10.1007/s00213-004-2080-7
- Garceau, C., Samaha, A. N., Cordahi, T., Servonnet, A., & Khoo, S. Y. (2021). Metabotropic group II glutamate receptors in the basolateral amygdala mediate cue-triggered increases in incentive motivation. *Psychopharmacology (Berl)*. doi:10.1007/s00213-021-05907-7
- Holland, P. C. (2004). Relations between Pavlovian-instrumental transfer and reinforcer devaluation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 30(2), 104-117. doi:10.1037/0097-7403.30.2.104
- Imre, G. (2007). The preclinical properties of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *CNS Drug Reviews*, 13(4), 444-464. doi:10.1111/j.1527-3458.2007.00024.x



- Imre, G., Salomons, A., Jongsma, M., Fokkema, D. S., Den Boer, J. A., & Ter Horst, G. J. (2006). Effects of the mGluR2/3 agonist LY379268 on ketamine-evoked behaviours and neurochemical changes in the dentate gyrus of the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *84*(3), 392-399. doi:10.1016/j.pbb.2006.05.021
- Kendig, M. D., Cheung, A. M., Raymond, J. S., & Corbit, L. H. (2016). Contexts Paired with Junk Food Impair Goal-Directed Behavior in Rats: Implications for Decision Making in Obesogenic Environments. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*, 216. doi:10.3389/fnbeh.2016.00216
- Khoo, S. Y., LeCocq, M. R., Deyab, G. E., & Chaudhri, N. (2019). Context and topography determine the role of basolateral amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in appetitive Pavlovian responding. *Neuropsychopharmacology*, *44*(9), 1524-1533. doi:10.1038/s41386-019-0335-6
- Kufahl, P. R., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2011). Enhanced sensitivity to attenuation of conditioned reinstatement by the mGluR 2/3 agonist LY379268 and increased functional activity of mGluR 2/3 in rats with a history of ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology*, *36*(13), 2762-2773. doi:10.1038/npp.2011.174
- Lu, L., Uejima, J. L., Gray, S. M., Bossert, J. M., & Shaham, Y. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR(2/3) agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of cocaine craving. *Biological Psychiatry*, *61*(5), 591-598. doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.011
- Malvaez, M., Greenfield, V. Y., Wang, A. S., Yorita, A. M., Feng, L., Linker, K. E., . . . Wassum, K. M. (2015). Basolateral amygdala rapid glutamate release encodes an outcome-specific representation vital for reward-predictive cues to selectively invigorate reward-seeking actions. *Scientific Reports*, *5*, 12511. doi:10.1038/srep12511
- Mogenson, G. J., Swanson, L. W., & Wu, M. (1983). Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *Journal of Neuroscience*, *3*(1), 189-202. doi:10.1523/JNEUROSCI.03-01-00189.1983
- Negrete, J. C., & Emil, S. (1992). Cue-evoked arousal in cocaine users: a study of variance and predictive value. *Drug Alcohol Dependence*, *30*(2), 187-192. doi:10.1016/0376-8716(92)90025-8
- Perkins, K. A., Gerlach, D., Vender, J., Grobe, J., Meeker, J., & Hutchison, S. (2001). Sex differences in the subjective and reinforcing effects of visual and olfactory cigarette smoke stimuli. *Nicotine & Tobacco Research*, *3*(2), 141-150. doi:10.1080/14622200110043059

- Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *40*, 1-5. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.001
- Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological Review*, *74*(3), 151-182. doi:10.1037/h0024475
- Robbins, S. J., Ehrman, R. N., Childress, A. R., & O'Brien, C. P. (1999). Comparing levels of cocaine cue reactivity in male and female outpatients. *Drug Alcohol Dependence*, *53*(3), 223-230. doi:10.1016/s0376-8716(98)00135-5
- Rubonis, A. V., Colby, S. M., Monti, P. M., Rohsenow, D. J., Gulliver, S. B., & Sirota, A. D. (1994). Alcohol cue reactivity and mood induction in male and female alcoholics. *Journal of Studies on Alcohol*, *55*(4), 487-494. doi:10.15288/jsa.1994.55.487
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*(1), 12-20.
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., de Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 3-20. doi:10.1007/s00213-002-1224-x
- Shansky, R. M. (2019). Are hormones a "female problem" for animal research? *Science*, *364*(6443), 825-826. doi:10.1126/science.aaw7570
- Shansky, R. M., & Murphy, A. Z. (2021). Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 457-464. doi:10.1038/s41593-021-00806-8
- Sterling, R. C., Dean, J., Weinstein, S. P., Murphy, J., & Gottheil, E. (2004). Gender differences in cue exposure reactivity and 9-month outcome. *Journal of Substance Abuse Treatment*, *27*(1), 39-44. doi:10.1016/j.jsat.2004.03.008
- Uejima, J. L., Bossert, J. M., Poles, G. C., & Lu, L. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR2/3 agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of sucrose craving in rats. *Behavioural Brain Research*, *181*(2), 292-296. doi:10.1016/j.bbr.2007.04.019
- Waldrop, A. E., Price, K. L., Desantis, S. M., Simpson, A. N., Back, S. E., McRae, A. L., . . . Brady, K. T. (2010). Community-dwelling cocaine-dependent men and women respond differently to social stressors versus cocaine cues. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(6), 798-806. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.11.005

- Walker, K. C. (1942). The effect of a discriminative stimulus transferred to a previously unassociated response. *Journal of Experimental Psychology*, 31(4), 312-321. doi:10.1037/h0062929
- Wyvell, C. L., & Berridge, K. C. (2000). Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 8122-8130. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-21-08122.2000
- Zhao, Y., Dayas, C. V., Aujla, H., Baptista, M. A., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26(39), 9967-9974. doi:10.1523/JNEUROSCI.2384-06.2006

## **CHAPITRE IV: DISCUSSION**

## 4. Résumé et implications des résultats

### 4.1 L'activation des mGlu<sub>2/3</sub> diminue la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense chez les deux sexes

Le comportement animal est influencé par les CS omniprésents dans l'environnement. En effet, grâce à leurs propriétés prédictives et motivationnelles, les CS peuvent stimuler le désir pour une récompense et potentialiser des actions instrumentales visant à l'obtenir, un phénomène appelé: « transfert Pavlovien-à-instrumental (PIT) » (Cartoni et al., 2016; Rescorla & Solomon, 1967; Walker, 1942; Wyvell & Berridge, 2000). Ces effets des CS peuvent être adaptatifs lorsqu'ils guident les animaux vers des ressources essentielles à leur survie, telles que l'eau, la nourriture ou un abri pour se protéger (Doya, 2008; Perks & Clifton, 1997). Cependant, l'attribution d'une valeur motivationnelle trop élevée aux CS peut promouvoir l'addiction (Everitt et al., 2001; Ludwig et al., 1974; O'Brien et al., 1998; Robinson & Berridge, 1993). À l'inverse, une valeur motivationnelle trop faible des CS peut contribuer à la dépression (Olney, Warlow, Naffziger, & Berridge, 2018). Ainsi, il est important de mieux comprendre les mécanismes neuronaux par lesquels les CS guident le comportement, ainsi que les altérations possibles pouvant mener à des désordres, comme l'addiction et la dépression. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait aider le développement de traitements plus efficaces de ces désordres.

Un objectif de cette étude était donc d'évaluer le rôle des récepteurs mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA dans la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense, telle que mesurée par le PIT. L'injection d'un agoniste des mGlu<sub>2/3</sub> LY379268 dans la BLA avant le test PIT (3 ou 6 µg/hémisphère) a supprimé la capacité d'un CS à potentialiser les actions instrumentales de recherche de la récompense (dans ce cas-ci, l'eau) chez un groupe de rats mâles (Garceau, Samaha, Cordahi, Servonnet, & Khoo, 2021). Ces résultats suggèrent que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA diminue la **valeur motivationnelle du CS**. Malvaez et ses collègues (2015) ont démontré que la transmission synaptique excitatrice rapide du glutamate dans la BLA, via les récepteurs postsynaptiques **iGluRs AMPA**, était impliquée dans la capacité d'un CS à potentialiser la recherche de récompense, c'est-à-dire dans l'effet PIT. Les résultats de notre étude complètent ainsi la compréhension du mécanisme glutamatergique identifié par le groupe de Malvaez, en démontrant le rôle des **mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA** dans la régulation de cet effet. Nos résultats suggèrent également que le glutamate synaptique libéré dans la BLA est nécessaire pour l'expression du PIT, et que l'activation des autorécepteurs mGlu<sub>2/3</sub> supprime cet effet en réduisant la libération synaptique de glutamate dans la BLA. Cette interprétation des résultats est en accord avec Malvaez et ses collègues (2015) qui ont observé une augmentation de la

concentration de glutamate extracellulaire dans la BLA lors de la recherche de récompense évoquée par un CS.

Dans notre étude, l'injection du LY379268 dans la BLA a aussi diminué la capacité du CS à inciter l'approche des rats vers le site de livraison prévue de la récompense (Garceau et al., 2021). Cet effet reflète une atténuation de la **valeur prédictive du CS** par l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la BLA (Flagel, Watson, Robinson, & Akil, 2007; Robinson & Flagel, 2009). À l'inverse, Malvaez et ses collègues (2015) n'ont pas observé de diminution de l'approche conditionnée vers le site de livraison de la récompense après le blocage des iGluRs AMPA ou NMDA dans la BLA, ce qui suggère que ce comportement est régulé par l'activité de mGluRs dans la BLA, soit possiblement les récepteurs glutamatergiques métabotropes de type 5 (mGlu<sub>5</sub>). En effet, des études précliniques suggèrent que les mGlu<sub>5</sub> de la BLA régulent l'expression de comportements d'approche et de recherche de récompense évoquée par des CS (Khoo, LeCocq, Deyab, & Chaudhri, 2019; Sinclair, Cleva, Hood, Olive, & Gass, 2012).

En ciblant la BLA, notre recherche a permis l'identification d'une région spécifique du cerveau où l'activité des mGlu<sub>2/3</sub> module les propriétés prédictives et motivationnelles des CS. L'administration intra-BLA d'un agoniste des mGlu<sub>2/3</sub>, le LY379268, a inhibé les propriétés prédictives et motivationnelles d'un CS (Garceau et al., 2021). Cependant, l'administration intracérébrale de l'agoniste des mGlu<sub>2/3</sub> ne permet pas d'évaluer le potentiel de cette recherche pour des applications thérapeutiques chez l'humain, car cette voie d'administration n'est pas applicable sur le plan clinique. Ainsi, dans une nouvelle expérience, nous avons démontré que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> par l'injection **systemique** de LY379268 atténue également les propriétés prédictives et motivationnelles d'un CS, telles que mesurées lors du test PIT. Cette découverte et celles de plusieurs autres études démontrant un effet inhibiteur du LY379268 systemique sur le rétablissement de la recherche de drogue évoquée par un CS après extinction (Backstrom & Hyttia, 2005; Baptista et al., 2004; Bossert et al., 2005; Liechti, Lhuillier, Kaupmann, & Markou, 2007; Zhao et al., 2006) pourraient ouvrir la voie au développement de nouvelles thérapies dans l'addiction, comme les agonistes des mGlu<sub>2/3</sub>. Par contre, le LY379268 systemique a aussi eu des effets inhibiteurs sur certaines de nos mesures motrices (i.e., locomotion totale et nombre d'appuis sur le levier actif entre les CS). D'autres études ont rapporté des altérations motrices après administration systemique du LY379268, mais uniquement à des doses plus élevées ( $\geq 2$  mg/kg) que celles testées dans notre étude (Allain, Roberts, Levesque, & Samaha, 2017; Backstrom & Hyttia, 2005; Kufahl, Martin-Fardon, & Weiss, 2011). Ces effets moteurs pourraient être en partie dû à l'action du LY379268 sur des mGlu<sub>2/3</sub> situés dans le NAc. En effet, le NAc

projette vers le globus pallidus, une région clé dans la coordination motrice (Mogenson, Swanson, & Wu, 1983). De plus, des études ont démontré que l'injection de LY379268 dans le NAc pouvait altérer la locomotion (Besheer et al., 2010; Cannady, Grondin, Fisher, Hodge, & Besheer, 2011). Cependant, il est peu probable que les altérations motrices puissent expliquer en totalité les effets du LY379268 systémique observés sur le PIT dans notre étude, basé sur les observations suivantes: *i*) le LY379268 systémique n'a pas affecté certaines de nos mesures motrices (e.g., locomotion durant les CS et nombre d'entrées dans le réceptacle d'eau entre les CS), et *ii*) dans notre étude précédente, l'injection du LY379268 dans la BLA a réduit le PIT, et ce sans affecter la locomotion, suggérant que cet agoniste a un effet direct sur les propriétés prédictives et motivationnelles du CS (Garceau et al., 2021).

Dans cette étude, nous avons aussi comparé la contribution des récepteurs  $mGlu_{2/3}$  à la capacité des CS de potentialiser la recherche de récompense entre les rats femelles et mâles (en utilisant le PIT), puisqu'à notre connaissance, aucune étude n'avait rapporté cette information. Nous avons découvert que les effets inhibiteurs d'une administration systémique de LY379268 sur les propriétés prédictives et motivationnelles des CS sont similaires entre les sexes. L'activité des  $mGlu_{2/3}$  contribue donc autant à la régulation des propriétés des CS chez les femelles par rapport aux mâles. Ces résultats indiquent qu'une approche thérapeutique avec un agoniste des  $mGlu_{2/3}$  pourrait être potentiellement efficace indépendamment du sexe.

#### **4.2 La capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense est similaire entre les sexes**

La valeur motivationnelle attribuée à un CS peut grandement varier d'un individu à l'autre, ce qui influence leur vulnérabilité à l'addiction (Flagel, Akil, & Robinson, 2009; Robinson, Yager, Cogan, & Saunders, 2014). Dans une nouvelle expérience, nous avons ainsi évalué si le **sexe** est une source potentielle de cette variabilité. La plupart des recherches sur les propriétés motivationnelles des CS ont été conduites chez des rats mâles. Nous avons d'abord démontré un effet PIT significatif chez un groupe de rats mâles (Garceau et al., 2021). Puis, en répétant l'expérience avec un groupe de rats mixte, nous avons découvert que les femelles montrent un effet PIT similaire aux mâles. En effet, la présentation d'un CS associé à une récompense (CS+) a potentialisé la fréquence d'appuis sur le levier actif, et de façon comparable chez les deux sexes. Notre étude suggère donc que le sexe n'a pas d'effet significatif sur la susceptibilité aux propriétés motivationnelles des CS, telles que mesurées par le PIT. Des études utilisant d'autres modèles comportementaux comme le « renforcement conditionné » (Flagel et al., 2007) ou le « rétablissement de la recherche de cocaïne évoquée par un CS après extinction » n'ont

également pas observé de différences sexuelles notables dans les effets motivationnels des CS (Feltenstein et al., 2011). En revanche, lorsque les rats sont exposés à la fois à un CS et à un stress (induit par la yohimbine), les femelles montrent un rétablissement de la recherche de cocaïne plus élevé que les mâles (Feltenstein et al., 2011). Ainsi, le stress vécu lors de l'abstinence à une drogue pourrait rendre les femelles plus vulnérables aux effets motivationnels de CS associés aux drogues et à la rechute (Carroll, Lynch, Roth, Morgan, & Cosgrove, 2004; Lynch, Roth, & Carroll, 2002; Swan et al., 1988).

#### **4.3 La dévaluation diminue la recherche de récompense chez les deux sexes**

La valeur motivationnelle des CS (i.e., l'amplitude de l'effet PIT) dépend de la force de l'association entre l'action et la récompense, qui à son tour varie selon les changements dans la valeur et la désirabilité de la récompense (Balleine & Ostlund, 2007; Holmes et al., 2010). Par exemple, la nourriture a une plus grande valeur pour un animal qui a faim, tandis que la satiété diminue la valeur de la nourriture, un phénomène appelé « dévaluation ». Ainsi, les propriétés motivationnelles d'un CS devraient diminuer lorsque la récompense associée est dévaluée (Holmes et al., 2010). Dans notre étude, nous avons testé l'effet de la **dévaluation** sur la motivation à rechercher une récompense (dans ce cas-ci, l'eau) en présence d'un CS, en permettant à la moitié des rats mâles et femelles de consommer cette récompense à volonté pendant 1 h avant un test PIT. Sous l'effet de la dévaluation, les rats ont appuyé sur le levier associé à l'eau et approché le site de livraison de l'eau lors du CS+ moins fréquemment, comparé au groupe « témoin » restreint en eau. Ainsi, la réponse instrumentale dans notre modèle comportemental était sensible à la dévaluation de la récompense par satiété, suggérant qu'elle était dirigée vers un but et non le résultat d'une habitude (Balleine & Dickinson, 1998; Rudy, 2014). De plus, nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ont rapporté une diminution du PIT après la dévaluation de la récompense par satiété chez des rats mâles (Aitken et al., 2016; Corbit et al., 2007; Dailey, Moran, Holland, & Johnson, 2016). Nos résultats démontrent une sensibilité similaire à la dévaluation de la récompense par satiété **chez les rats femelles**.

L'appétence (i.e., la valeur hédonique « plaisir ») de la récompense peut cependant influencer la réponse à la dévaluation par satiété. Par exemple, une étude chez le rat a démontré que la dévaluation par satiété a tendance à être moins efficace pour diminuer la recherche de nourriture lorsque les CS sont associés à des **aliments plus appétitifs**, comme des aliments riches en gras ou en sucres (Kendig, Cheung, Raymond, & Corbit, 2016). Par ailleurs, une diète riche en gras ou en sucres est associée à des altérations dans les circuits



corticostriataux (e.g., augmentation de l'activité du striatum dorsal latéral) qui peuvent promouvoir la recherche de ce type d'aliments en présence de CS ainsi qu'une perte de la sensibilité à la dévaluation par satiété sur le long terme (Corbit, 2016; Furlong, Jayaweera, Balleine, & Corbit, 2014; Kendig, Boakes, Rooney, & Corbit, 2013). Ces neuroadaptations ainsi que l'exposition courante à des CS dans l'environnement (e.g., annonces à la télévision et panneaux publicitaires) pourraient expliquer en partie la recherche et la consommation d'aliments appétitifs en l'absence de la faim chez des individus, contribuant à l'augmentation de l'obésité (Watson, Wiers, Hommel, & de Wit, 2014).

Dans notre étude, nous avons utilisé de l'eau ordinaire comme récompense. Les propriétés de renforcement de cette récompense dépendent du niveau de soif de l'individu, ce qui pourrait expliquer la diminution significative des appuis sur le levier actif observée sous l'effet de la dévaluation par satiété. Dans une prochaine étude, il serait intéressant de comparer les effets de la dévaluation par satiété sur le PIT en utilisant de l'eau ordinaire versus une solution sucrée comme récompense. Nous nous attendons à ce que la dévaluation par satiété soit moins efficace pour diminuer le PIT lorsque le CS est associé à la récompense plus appétitive, soit la solution sucrée.

## 5. Avantages et limites de l'étude

### 5.1 Le PIT comme modèle comportemental

L'une des forces de notre étude est l'utilisation du PIT comme modèle comportemental pour étudier le rôle des mGlu<sub>2/3</sub> dans la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense. Premièrement, le PIT mesure les propriétés motivationnelles de CS, et ce **sans l'influence confondante du renforcement** de la réponse instrumentale par la récompense (renforcement primaire), car l'appui sur le levier actif durant le test PIT n'entraîne pas la livraison de la récompense (conditions d'extinction) (Dickinson & Balleine, 1994; Rescorla & Solomon, 1967; Wyvell & Berridge, 2000, 2001). Le PIT exclut également l'influence confondante du renforcement par le CS (renforcement secondaire), puisque contrairement à d'autres modèles comportementaux, la présentation d'un CS lors du test PIT est non-contingente et ne renforce donc pas la réponse instrumentale (Wylliv & Berridge, 2000). De plus, la présence d'homologies au niveau des substrats neuronaux du PIT entre les espèces ajoute une **valeur translationnelle** à ce modèle. En effet, l'effet PIT se manifeste chez plusieurs espèces dont le rat et l'humain (Holmes et al., 2010) et les mêmes régions neuronales responsables du PIT (e.g., l'amygdale et le NAc) ont été observées chez le rat et l'humain (Blundell et al., 2001; Corbit & Balleine, 2005,

2011; Derman, Bass, & Ferrario, 2020; Malvaez et al., 2015; Prevost et al., 2012; Talmi et al., 2008). Enfin, une autre force de notre modèle est la **reproductibilité** de ses mesures, puisqu'il a été répété à quatre reprises en conservant les mêmes paramètres et qu'un effet PIT robuste a été observé dans des conditions de base à chaque expérience. Nous avons également choisi des paramètres connus et testés dans la littérature, comme des CS d'une durée de 2 min et un horaire de renforcement à intervalle variable, pour favoriser une plus grande expression du PIT (Holmes et al., 2010; Lovibond, 1983). En effet, il est reconnu que le modèle PIT peut produire des amplitudes d'effets variables dans les conditions de base, selon les paramètres utilisés, tels que l'horaire de renforcement et la durée des CS (Delamater & Holland, 2008; Holmes et al., 2010; Wyvell & Berridge, 2000).

Tel que mentionné à la section **1.3** du chapitre I, il existe différents types de modèles pour étudier le PIT. Dans notre étude, nous avons utilisé un **modèle PIT simple à une récompense**. Dans ce modèle, une seule réponse instrumentale permet l'obtention d'une seule récompense, elle-même associée à un seul CS. Ce type de modèle ne permet pas la distinction comportementale des deux types de PIT, soient le PIT général et le PIT spécifique (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; Holland & Gallagher, 2003). Toutefois, la littérature suggère que le modèle PIT simple à une récompense serait davantage associé au **PIT général**, puisque la stimulation de la formation de représentations détaillées et sensorielles spécifiques d'une récompense nécessiterait la présentation de multiples actions instrumentales, chacune délivrant une récompense différente (Blundell et al., 2001; Corbit & Balleine, 2005; Holland, 2004). Selon une étude de lésions, le PIT général serait régulé par la **CeA**, une autre sous-région de l'amygdale, tandis que la **BLA** modulerait plutôt le PIT spécifique (Corbit & Balleine, 2005). Pourtant, nos résultats suggèrent que la transmission glutamatergique dans la BLA régule aussi le PIT général, remettant ainsi en question la découverte précédente de Corbit et Balleine (2005). Il n'est toutefois pas possible de conclure de façon définitive que la transmission glutamatergique dans la BLA régule aussi le PIT **général**, puisque notre *modèle PIT à une récompense* ne démontre pas d'évidences claires sur les types de PIT obtenus. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait utiliser un modèle PIT dissociant les deux types de PIT en une seule expérience (i.e., **le modèle PIT complet**) (Cartoni et al., 2016; Corbit & Balleine, 2005).

Comme mentionné précédemment, le test PIT se déroule dans des conditions d'extinction (i.e., la récompense n'est plus délivrée), ce qui a pour avantage d'isoler les propriétés motivationnelles du CS de celles de la récompense primaire (Dickinson & Balleine, 1994; Rescorla & Solomon, 1967; Wyvell & Berridge, 2000, 2001). Cette caractéristique amène

toutefois le questionnement suivant : le test PIT est-il une phase d'extinction? Le test PIT se distingue d'abord d'une phase d'extinction Pavlovienne par son nombre de sessions. En effet, la phase d'extinction Pavlovienne comprend de 10 à 12 sessions pour permettre l'extinction de la réponse comportementale aux CS, comparativement à souvent une seule session pour le test PIT. De plus, les rats ont des sessions de rappels du conditionnement Pavlovien et instrumental entre chaque test PIT, afin de prévenir les effets d'extinction sur le PIT (Cartoni et al., 2016; Delamater et al., 2017; Alarcón & Delamater, 2019). Cependant, à l'intérieur d'une même session de test PIT, le nombre d'appuis sur le levier actif a tendance à diminuer vers les dernières présentations du CS. En revanche, il est possible d'isoler ce processus « d'extinction » de « l'effet PIT », en comparant les appuis sur le levier actif entre les traitements lors des premières présentations du CS (i.e., au début de la session du test PIT). Durant ces premières présentations du CS, nous avons observé un nombre réduit d'appuis sur le levier actif chez les rats traités avec l'agoniste LY379268 comparativement aux rats témoins, ce qui confirme les effets supprimeurs d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> sur les propriétés motivationnelles du CS.

## 5.2 Le LY379268 comme agent pharmacologique ciblant les mGlu<sub>2/3</sub>

Pour étudier le rôle des mGlu<sub>2/3</sub> dans la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense, nous avons utilisé un agoniste de ces récepteurs, le LY379268. Cet agoniste a pour avantage de traverser facilement la barrière hématoencéphalique (Imre, 2007; Niswender & Conn, 2010), ce qui en fait un agent pharmacologique efficace lorsqu'injecté de manière systémique—la voie d'administration potentielle chez l'humain. Par contre, le LY379268 active à la fois les récepteurs mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub>, bien qu'il soit considérablement plus sélectif pour le récepteur mGlu<sub>3</sub> : un rapport  $K_i$  pour mGlu<sub>2</sub>/mGlu<sub>3</sub> de 2.4 (Imre, 2007). Malgré l'implication des mGlu<sub>2/3</sub> dans plusieurs maladies neurologiques ou psychiatriques comme l'addiction, il y a un manque d'agents pharmacologiques qui pourraient être utilisés pour différencier la fonction respective des **sous-types mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub>**. En effet, la forte homologie entre les mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub> rend difficile le développement d'agonistes ou d'antagonistes **plus sélectifs** de ces récepteurs (Morishima et al., 2005; Niswender & Conn, 2010). Des souris knock-out ont été utilisées pour différencier les rôles des mGlu<sub>2</sub> et mGlu<sub>3</sub> dans le rétablissement de la recherche de drogue évoquée par un CS après extinction. Par exemple, Cannella et ses collègues (2013) ont découvert que les souris mGlu<sub>3</sub><sup>-/-</sup> ne montrent pas de changement dans leur comportement de rétablissement de la recherche de cocaïne évoquée par un CS. Les souris mGlu<sub>2</sub><sup>-/-</sup> quant à elles ne peuvent être utilisées pour étudier le rôle spécifique de mGlu<sub>2</sub> dans les effets des CS sur la motivation, car cette modification génétique altère leur motricité (Cannella et al., 2013; Morishima

et al., 2005). En revanche, des modulateurs allostériques positifs sélectifs de mGlu<sub>2</sub> ont récemment été développés. Par exemple, le potassium 3'-((2-cyclopentyl-6-7-diméthyl-1-oxo-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)oxy)méthyl)biphényle 1-4-carboxylate (BINA) diminue le rétablissement de la recherche de cocaïne évoquée par un CS après extinction, mais n'a aucun effet sur la recherche de nourriture évoquée par un CS (Jin et al., 2010), contrairement au LY379268 qui inhibe à la fois les effets motivationnels des CS sur la recherche de drogues (Backstrom & Hyytia, 2005; Baptista et al., 2004; Bossert et al., 2005; Liechti et al., 2007; Zhao et al., 2006), de nourriture (Baptista et al., 2004; Bossert et al., 2006) ou d'eau (Garceau et al., 2021). Ainsi, comparativement aux agonistes des mGlu<sub>2/3</sub>, les agents sélectifs des mGlu<sub>2</sub> affecteraient plus spécifiquement les effets de CS associés à une drogue telle que la cocaïne, un avantage pour le traitement de l'addiction.

### 5.3 Les contrôles anatomiques

Les contrôles anatomiques forment un groupe de sujets recevant le traitement à l'étude, mais à l'extérieur de la région neuronale ciblée (e.g., dans la CeA au lieu de la BLA), ce qui permet d'évaluer la spécificité anatomique de l'effet du traitement. Ainsi, l'absence de contrôles anatomiques est une limite de notre étude. Six rats ont été exclus de **l'Article 1: Expérience 2** après histologie, puisque 2 d'entre eux ont reçu seulement une des 2 canules dans la BLA alors que les autres ont eu des placements de canules dorsal, médial et/ou latéral à la BLA. Bien que les données suggèrent que l'injection de LY379268 à ces rats n'influence pas la recherche de récompense évoquée par un CS, nous avons décidé de les exclure de l'article, en raison de la petite taille de ce groupe (n = 6) qui était insuffisante pour montrer un effet PIT significatif dans des conditions de base (solvant,  $p = 0.08$ ) et de l'hétérogénéité de l'emplacement des canules (Garceau et al., 2021). Ainsi, les données actuelles ne permettent pas de déterminer si les effets inhibiteurs d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> sur les propriétés prédictives ou motivationnelles des CS sont spécifiques à la région de la BLA. Pour répondre à cette question, il faudrait évaluer les effets du LY379268 lorsqu'il est administré dans d'autres régions du cerveau chez des rats (contrôles anatomiques) avant le test PIT. Par exemple, puisque la sous-région CeA de l'amygdale est également reconnue pour son rôle dans la régulation des propriétés motivationnelles des CS (Corbit & Balleine, 2005; Lu, Uejima, Gray, Bossert, & Shaham, 2007; Uejima, Bossert, Poles, & Lu, 2007), il serait intéressant d'injecter le LY379268 dans cette région, afin de comparer les effets d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la CeA à celle de la BLA sur la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense. Les mGlu<sub>2/3</sub> sont exprimés dans ces deux sous-régions de l'amygdale, bien que leur expression soit plus élevée dans la BLA : elle est considérée élevée

dans la BLA *versus* modérée dans la CeA (Petrulia et al., 1996; Tamaru, Nomura, Mizuno, & Shigemoto, 2001).

Une autre approche expérimentale pouvant être utilisée pour étudier le rôle des mGlu<sub>2/3</sub> dans les propriétés prédictives ou motivationnelles des CS est l'inactivation du gène de ces récepteurs chez des souris (i.e., mGlu<sub>2/3</sub> *-/-* knock-out) (Cannella et al., 2013). Le modèle knock-out conditionnel a pour avantage de limiter l'inactivation du gène d'intérêt à un tissu spécifique ou une sous-région du cerveau (Tsien et al., 1996; Chen et al., 2017). Ainsi, cette approche pourrait permettre le contrôle de l'expression des mGlu<sub>2/3</sub> spécifiquement dans la BLA.

#### **5.4 La considération du sexe comme variable biologique**

L'inclusion de rats mâles et femelles est l'une des forces de notre étude, puisque la contribution des mGlu<sub>2/3</sub> à la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense n'avait pas encore été étudiée chez les femelles. Le nombre restreint d'études chez les femelles dans la recherche en neurosciences est principalement dû à la croyance que les fluctuations des hormones ovariennes associées au cycle reproducteur féminin rendent les données des femelles plus variables que celles des mâles (Shansky, 2019). À notre connaissance, l'influence des fluctuations hormonales sur le « PIT » n'a pas été étudiée, mais Fuchs, Evans, Mehta, Case et See (2005) ont démontré que le cycle ovarien n'influence pas le « rétablissement de la recherche de cocaïne évoquée par un CS après extinction ». Par ailleurs, une méta-analyse a révélé que plusieurs données physiologiques, cellulaires ou comportementales recueillies auprès de souris femelles ne variaient pas plus que celles des mâles, indépendamment de la phase du cycle ovarien des femelles (Prendergast et al., 2014). Des résultats similaires ont été obtenus dans une méta-analyse complémentaire conduite chez des rats (Becker, Prendergast, & Liang, 2016). Ces analyses suggèrent que l'utilisation de rongeurs femelles en neurosciences ne requiert pas la surveillance du cycle ovarien. De plus, selon Becker et Koob (2016), « *la présence ou l'absence de différences entre les sexes est suffisamment robuste pour que les femelles qui cyclent au hasard puissent être étudiées sans qu'une variabilité supplémentaire ne soit introduite par le cycle ovarien* ». Par conséquent, nous avons décidé d'évaluer le sexe comme une variable biologique, sans surveiller le cycle ovarien des femelles. Tel que proposé par Shansky (2019), nous avons d'abord comparé un groupe de 16 rats mâles et un groupe de 16 rats femelles. Puis, comme aucune différence significative entre les sexes n'a été observée dans les mesures des tests PIT, les données des mâles et femelles ont été regroupées, afin d'augmenter la puissance statistique des analyses.

## 6. Implications pour l'addiction chez l'humain

Les CS sont impliqués dans de nombreuses pathologies, dont l'addiction, le jeu pathologique, les troubles alimentaires, les troubles obsessionnels/compulsifs et la psychose. Une attention particulière est toutefois mise sur l'addiction dans cette section, étant donné que des altérations de l'homéostasie glutamatergique ciblant notamment les mGlu<sub>2/3</sub> sont reconnues pour jouer un rôle important dans le développement de cette pathologie (Kalivas, 2009; Kalivas, Volkow, & Seamans, 2005; Kalivas & Volkow, 2005).

### 6.1 L'attribution pathologique d'une valeur motivationnelle à un stimulus

Selon la théorie de l'attribution pathologique d'une valeur motivationnelle à un stimulus : « Incentive Sensitization » (Robinson & Berridge, 1993), la consommation répétée de substances d'abus chez certains individus produit des neuroadaptations qui sensibilisent le système de récompense aux drogues et à leur CS, menant à une augmentation du désir et des comportements de recherche de la drogue. Ces neuroadaptations impliquent des changements de la transmission dopaminergique dans le NAc (Robinson & Berridge, 1993). Toutefois, l'augmentation de la sensibilité aux CS dans l'addiction est aussi liée à des **altérations de l'homéostasie glutamatergique** dans le système de récompense (Kalivas, 2009; Kalivas et al., 2005; Kalivas & Volkow, 2005). Par exemple, la consommation chronique de cocaïne ou de nicotine entraîne une diminution de l'activité de **l'échangeur cystine-glutamate** dans le NAc chez le rat, ce qui réduit la réserve de glutamate extrasynaptique et le tonus glutamatergique apposé sur les mGlu<sub>2/3</sub> (Knackstedt et al., 2009; Knackstedt, Melendez, & Kalivas, 2010). De plus, Schwendt, Reichel et See (2012) ont démontré que le niveau d'expression des **mGlu<sub>2/3</sub>** diminue dans le NAc après une administration chronique de méthamphétamine suivie d'une période d'abstinence. Par conséquent, lors d'une exposition aux drogues ou à leur CS, la libération synaptique de glutamate dans le NAc est plus élevée, puisqu'elle n'est plus suffisamment diminuée par des mécanismes de rétroaction négative exercés par les mGlu<sub>2/3</sub> (Kalivas, 2009). Il a également été démontré qu'après consommation chronique de cocaïne ou de nicotine, le niveau d'expression du **transporteur à glutamate-1** (un type d'EAATs) diminue dans le NAc, ce qui a pour conséquence de réduire les taux d'élimination du glutamate de la fente synaptique (Knackstedt et al., 2009; Knackstedt et al., 2010). Enfin, le niveau d'expression de **récepteurs AMPA** augmente dans les synapses du NAc durant l'abstinence à la cocaïne ou à la méthamphétamine (Conrad et al., 2008; Scheyer et al., 2016). Toutes ces neuroadaptations dans le système glutamatergique entraînent une augmentation de la transmission synaptique du

glutamate lors de l'exposition à une drogue ou à son CS, causant une perte de contrôle du comportement de recherche de la drogue.

## 6.2 Les agents ciblant le système glutamatergique: traitement potentiel de l'addiction?

Tel que mentionné à la section 6.1, l'activité de l'échangeur cystine-glutamate dans le NAc diminue lors de la consommation chronique de cocaïne ou de nicotine chez le rat, ce qui réduit la réserve de glutamate extrasynaptique (Knackstedt et al., 2009; Knackstedt et al., 2010). Puisque le glutamate extrasynaptique est libéré en échange de cystine par l'échangeur cystine-glutamate, la stimulation de cet échangeur durant l'abstinence à une drogue avec un traitement quotidien de **N-acétylcystéine**, une pro-cystéine, restaure les niveaux de base du glutamate extrasynaptique et le tonus glutamatergique apposé sur les mGlu<sub>2/3</sub> (Knackstedt et al., 2009). L'activation subséquente des mGlu<sub>2/3</sub> par le glutamate extrasynaptique diminue ainsi la libération synaptique de glutamate et la recherche de drogues lors de l'exposition à leur CS (Kalivas, 2009; Knackstedt et al., 2009).

Les agents pharmacologiques ciblant directement les mGlu<sub>2/3</sub> sont également considérés comme traitement potentiel de l'addiction, puisque ces autorécepteurs jouent un rôle important de rétroaction négative dans l'homéostasie glutamatergique (Kalivas, 2009). Des études précliniques ont démontré que l'administration systémique de l'**agoniste des mGlu<sub>2/3</sub>** LY379268 atténue le rétablissement de la recherche de plusieurs substances d'abus, comme la cocaïne (Baptista et al., 2004), l'héroïne (Bossert et al., 2005), l'alcool (Backstrom & Hyytia, 2005; Zhao et al., 2006), la nicotine (Liechti et al., 2007) ou le sucre (Bossert et al., 2006), évoquée par un CS. De plus, contrairement aux antagonistes des iGluRs AMPA et NMDA, les agonistes des mGlu<sub>2/3</sub> sont moins susceptibles d'interférer avec les processus normaux d'apprentissage et de mémoire dépendants de la transmission synaptique rapide du glutamate (Lu et al., 2007). Cependant, les agonistes des mGlu<sub>2/3</sub> ont pour effet secondaire d'altérer la locomotion à des doses plus élevées ( $\geq 2$  mg/kg) (Allain et al., 2017; Imre, 2007; Kufahl et al., 2011). En revanche, une tolérance aux effets moteurs indésirables se développerait après une administration répétée du LY379268, tandis que les effets thérapeutiques du LY379268 sur la recherche de récompense seraient conservés après une administration répétée de cet agoniste, élargissant ainsi son index thérapeutique (i.e., le rapport entre la dose qui provoque des effets indésirables chez 50% des sujets et la dose efficace chez 50% des sujets) (Cartmell, Monn, & Schoepp, 2000).

Comme indiqué à la section 5.2, les agonistes des mGlu<sub>2/3</sub> ont également pour effet secondaire de diminuer la consommation de nourriture chez les rats (Baptista et al., 2004; Liechti & Markou, 2008). Ainsi, les nouvelles études se sont concentrées sur des agents sélectifs des mGlu<sub>2</sub>, comme le modulateur allostérique positif AZD8529. Ce dernier atténue la rechute à la nicotine évoquée par un CS chez les rats (Li et al., 2016) et les singes (Justinova et al., 2015). Contrairement au LY379268, les agents sélectifs des mGlu<sub>2</sub> ont moins d'effets secondaires, comme la diminution de la consommation de nourriture (Baptista et al., 2004; Jin et al., 2010; Liechti & Markou, 2008). Un essai clinique de phase 2 sur l'AZD8529 a donc débuté en 2015 pour tester son efficacité à diminuer la consommation de cigarettes chez les femmes (Acri, Cross & Skolnick, 2017; Kenny, Hoyer & Koob, 2018; Lassi et al., 2016).

## 7. Directions futures

Notre recherche, comme d'autres études récentes (Blundell et al., 2001; Corbit & Balleine, 2005; Derman et al., 2020; Malvaez et al., 2015), démontrent que la BLA régule la capacité des CS à potentialiser la recherche de récompense, telle que mesurée par le PIT. En revanche, la manière dont cette région interagit avec plusieurs autres régions comme le NAc ou l'OFC pour produire les deux types de PIT est peu connue et doit être approfondie. De plus, comme la CeA est aussi impliquée dans la régulation des propriétés motivationnelles des CS (Corbit & Balleine, 2005; Lu et al., 2007; Uejima et al., 2007), il serait intéressant de comparer les effets d'une activation des mGlu<sub>2/3</sub> de la CeA versus la BLA à l'aide du même *modèle PIT simple à une récompense* ou d'un modèle PIT plus précis dissociant les deux types de PIT (i.e., *le modèle PIT complet*). Enfin, d'autres études pourraient être effectuées pour différencier davantage les rôles des mGlu<sub>2</sub> versus mGlu<sub>3</sub> dans la recherche de récompense évoquée par un CS. Ces découvertes permettront de développer des traitements plus sélectifs contre l'addiction, avec un index thérapeutique supérieur. Dans la perspective du développement d'un traitement de l'addiction, il serait aussi important d'étudier les effets chroniques des agonistes des mGlu<sub>2/3</sub> (Lu et al., 2007), afin d'établir son efficacité et son innocuité à long terme.

## 8. Conclusion

En conclusion, la présentation d'un CS associé à l'eau a potentialisé les comportements d'anticipation et de recherche de cette récompense chez des rats restreints en eau, suggérant que le CS a acquis des propriétés prédictives et motivationnelles. Par ailleurs, le sexe n'a pas influencé ces propriétés du CS. Cette étude a également démontré que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub>



de la BLA à l'aide de microinjections d'un agoniste de ces autorécepteurs, le LY379268, a entraîné une diminution de la capacité du CS à stimuler l'anticipation et les actions de recherche de la récompense. Ces effets du LY379268 sur l'expression de la motivation incitative n'impliquaient pas d'effet moteur général. Ces résultats suggèrent que le glutamate synaptique libéré dans la BLA est nécessaire pour les propriétés prédictives et motivationnelles des CS et que l'activation des mGlu<sub>2/3</sub> atténue ces propriétés en réduisant la libération synaptique de glutamate dans la BLA.

De plus, l'inhibition des propriétés prédictives et motivationnelles du CS suite à l'administration systémique du LY379268 supporte le potentiel d'une application translationnelle et thérapeutique chez l'humain. Toutefois, contrairement aux microinjections dans la BLA, l'administration du LY379268 par voie systémique a aussi eu des effets inhibiteurs faibles sur certaines mesures motrices. Ces effets moteurs pourraient être causés par l'action de l'agoniste des mGlu<sub>2/3</sub> dans des régions du cerveau impliquées dans la motricité, comme le NAc. En revanche, il est peu probable que les déficits moteurs puissent expliquer en totalité les effets obtenus sur les propriétés des CS après administration systémique du LY379268, puisque certaines de nos mesures motrices n'ont pas été affectées par l'agoniste. En résumé, les résultats de nos recherches indiquent que les mGlu<sub>2/3</sub> régulent la capacité des CS à potentialiser l'anticipation et la recherche de la récompense, et de façon comparable chez les deux sexes. Nos recherches ont également permis l'identification de la BLA comme région du cerveau où l'activité des mGlu<sub>2/3</sub> module les propriétés prédictives et motivationnelles des CS.

## Références Chapitres I & IV

- Acri, J. B., Cross, A. J., & Skolnick, P. (2017). From bench to bedside: mGluR2 positive allosteric modulators as medications to treat substance use disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 234(9-10), 1347-1355. doi:10.1007/s00213-016-4501-9
- Aitken, T. J., Greenfield, V. Y., & Wassum, K. M. (2016). Nucleus accumbens core dopamine signaling tracks the need-based motivational value of food-paired cues. *Journal of Neurochemistry*, 136(5), 1026-1036. doi:10.1111/jnc.13494
- Alarcón, D. E., & Delamater, A. R. (2019). Outcome-specific Pavlovian-to-instrumental transfer (PIT) with alcohol cues and its extinction. *Alcohol*, 76, 131-146. doi:10.1016/j.alcohol.2018.09.003

- Allain, F., Roberts, D. C. S., Levesque, D., & Samaha, A. N. (2017). Intermittent intake of rapid cocaine injections promotes robust psychomotor sensitization, increased incentive motivation for the drug and mGlu2/3 receptor dysregulation. *Neuropharmacology*, *117*, 227-237. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.026
- Aoki, C., Kaneko, T., Starr, A., & Pickel, V. M. (1991). Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience Research*, *28*(4), 531-548. doi:10.1002/jnr.490280410
- Avants, S. K., Margolin, A., Kosten, T. R., & Cooney, N. L. (1995). Differences between responders and nonresponders to cocaine cues in the laboratory. *Addictive Behaviors*, *20*(2), 215-224. doi:10.1016/0306-4603(94)00066-2
- Backstrom, P., & Hyttia, P. (2005). Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCEPG. *European Journal of Pharmacology*, *528*(1-3), 110-118. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.051
- Baker, D. A., Xi, Z. X., Shen, H., Swanson, C. J., & Kalivas, P. W. (2002). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *Journal of Neuroscience*, *22*(20), 9134-9141. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-09134.2002
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, *37*(4-5), 407-419. doi:10.1016/s0028-3908(98)00033-1
- Balleine, B. W., & Ostlund, S. B. (2007). Still at the choice-point: action selection and initiation in instrumental conditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1104*, 147-171. doi:10.1196/annals.1390.006
- Baptista, M. A. S., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2004). Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4723-4727. doi:10.1523/JNEUROSCI.0176-04.2004
- Becker, J. B., & Koob, G. F. (2016). Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. *Pharmacological Reviews*, *68*(2), 242-263. doi:10.1124/pr.115.011163
- Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, *7*, 34. doi:10.1186/s13293-016-0087-5

- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2003). Parsing reward. *Trends in Neurosciences*, 26(9), 507-513. doi:10.1016/S0166-2236(03)00233-9
- Besheer, J., Grondin, J. J., Cannady, R., Sharko, A. C., Faccidomo, S., & Hodge, C. W. (2010). Metabotropic glutamate receptor 5 activity in the nucleus accumbens is required for the maintenance of ethanol self-administration in a rat genetic model of high alcohol intake. *Biological Psychiatry*, 67(9), 812-822. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.016
- Bindra, D. (1978). How adaptive behavior is produced: A perceptual-motivational alternative to response-reinforcement. *Behavioral and Brain Sciences*, 1(1), 41-91. doi:10.1017/S0140525X00059380
- Blundell, P., Hall, G., & Killcross, S. (2001). Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *Journal of Neuroscience*, 21(22), 9018-9026. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-22-09018.2001
- Bolles, R. C. (1972). Reinforcement, expectancy, and learning. *Psychological Review*, 79(5), 394-409. doi:10.1037/h0033120
- Bossert, J. M., Busch, R. F., & Gray, S. M. (2005). The novel mGluR2/3 agonist LY379268 attenuates cue-induced reinstatement of heroin seeking. *NeuroReport*, 16(9), 1013-1016. doi:10.1097/00001756-200506210-00026
- Bossert, J. M., Poles, G. C., Sheffler-Collins, S. I., & Ghitza, U. E. (2006). The mGluR2/3 agonist LY379268 attenuates context- and discrete cue-induced reinstatement of sucrose seeking but not sucrose self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 173(1), 148-152. doi:10.1016/j.bbr.2006.06.008
- Cannady, R., Grondin, J. J., Fisher, K. R., Hodge, C. W., & Besheer, J. (2011). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits the discriminative stimulus effects of alcohol via selective activity within the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2328-2338. doi:10.1038/npp.2011.121
- Cannella, N., Halbout, B., Uhrig, S., Evrard, L., Corsi, M., Corti, C., . . . Spanagel, R. (2013). The mGluR2/3 agonist LY379268 induced anti-reinstatement effects in rats exhibiting addiction-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 38(10), 2048-2056. doi:10.1038/npp.2013.106
- Carroll, M. E., Lynch, W. J., Roth, M. E., Morgan, A. D., & Cosgrove, K. P. (2004). Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 273-279. doi:10.1016/j.tips.2004.03.011
- Cartmell, J., Monn, J. A., & Schoepp, D. D. (2000). Tolerance to the motor impairment, but not to the reversal of PCP-induced motor activities by oral administration of the mGlu2/3 receptor

- agonist, LY379268. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 361(1), 39-46. doi:10.1007/s002109900151
- Cartoni, E., Balleine, B., & Baldassarre, G. (2016). Appetitive Pavlovian-instrumental Transfer: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 71, 829-848. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.09.020
- Chen, J., Du, Y., He, X., Huang, X., & Shi, Y. S. (2017). A Convenient Cas9-based Conditional Knockout Strategy for Simultaneously Targeting Multiple Genes in Mouse. *Scientific Reports*, 7(1), 517. doi:10.1038/s41598-017-00654-2
- Childress, A., Ehrman, R., McLellan, A. T., & O'Brien, C. (1988). Conditioned craving and arousal in cocaine addiction: a preliminary report. *NIDA Research Monograph*, 81, 74-80.
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 205-237. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205
- Conrad, K. L., Tseng, K. Y., Uejima, J. L., Reimers, J. M., Heng, L. J., Shaham, Y., . . . Wolf, M. E. (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature*, 454(7200), 118-121. doi:10.1038/nature06995
- Corbit, L. H. (2016). Effects of obesogenic diets on learning and habitual responding. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 9, 84-90. doi:https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.02.010
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2005). Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of pavlovian-instrumental transfer. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 962-970. doi:10.1523/JNEUROSCI.4507-04.2005
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2011). The general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer are differentially mediated by the nucleus accumbens core and shell. *Journal of Neuroscience*, 31(33), 11786-11794. doi:10.1523/JNEUROSCI.2711-11.2011
- Corbit, L. H., Janak, P. H., & Balleine, B. W. (2007). General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: the effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3141-3149. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05934.x
- Dailey, M. J., Moran, T. H., Holland, P. C., & Johnson, A. W. (2016). The antagonism of ghrelin alters the appetitive response to learned cues associated with food. *Behavioural Brain Research*, 303, 191-200. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.040
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1-105. doi:10.1016/s0301-0082(00)00067-8

- Delamater, A. R., & Holland, P. C. (2008). The influence of CS-US interval on several different indices of learning in appetitive conditioning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 34(2), 202-222. doi:10.1037/0097-7403.34.2.202
- Delamater, A. R., Schneider, K., & Derman, R. C. (2017). Extinction of specific stimulus-outcome (S-O) associations in Pavlovian learning with an extended CS procedure. *Journal of Experimental Psychology Animal Learning and Cognition*, 43(3), 243-261. doi:10.1037/xan0000138
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 101-113. doi:10.1038/nrn2055
- Derman, R. C., Bass, C. E., & Ferrario, C. R. (2020). Effects of hM4Di activation in CamKII basolateral amygdala neurons and CNO treatment on sensory-specific vs. general PIT: refining PIT circuits and considerations for using CNO. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(5), 1249-1266. doi:10.1007/s00213-020-05453-8
- Dickinson, A., & Balleine, B. (1994). Motivational control of goal-directed action. *Animal Learning & Behavior*, 22(1), 1-18. doi:10.3758/BF03199951
- Domjan, M., Grau, J. W., & Krause, M. A. (2010). *The principles of learning and behavior* (6th ed.). Australia; Belmont, CA: Wadsworth Cenage Learning.
- Doya, K. (2008). Modulators of decision making. *Nature Neuroscience*, 11(4), 410-416. doi:10.1038/nn2077
- Ehrman, R. N., Robbins, S. J., Childress, A. R., & O'Brien, C. P. (1992). Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology (Berl)*, 107(4), 523-529. doi:10.1007/BF02245266
- Everitt, B. J., Dickinson, A., & Robbins, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Research Reviews*, 36(2-3), 129-138. doi:10.1016/s0165-0173(01)00088-1
- Featherstone, D. E. (2010). Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS Chemical Neuroscience*, 1(1), 4-12. doi:10.1021/cn900006n
- Feltenstein, M. W., Henderson, A. R., & See, R. E. (2011). Enhancement of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by yohimbine: sex differences and the role of the estrous cycle. *Psychopharmacology (Berl)*, 216(1), 53-62. doi:10.1007/s00213-011-2187-6
- Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2007). NMDA receptor blockade in the basolateral amygdala disrupts consolidation of stimulus-reward memory and extinction learning during

- reinstatement of cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(4), 435-444. doi:10.1016/j.nlm.2007.05.006
- Flagel, S. B., Akil, H., & Robinson, T. E. (2009). Individual differences in the attribution of incentive salience to reward-related cues: Implications for addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 139-148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.027
- Flagel, S. B., Watson, S. J., Robinson, T. E., & Akil, H. (2007). Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(3), 599-607. doi:10.1007/s00213-006-0535-8
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Mehta, R. H., Case, J. M., & See, R. E. (2005). Influence of sex and estrous cyclicity on conditioned cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(3), 662-672. doi:10.1007/s00213-004-2080-7
- Furlong, T. M., Jayaweera, H. K., Balleine, B. W., & Corbit, L. H. (2014). Binge-like consumption of a palatable food accelerates habitual control of behavior and is dependent on activation of the dorsolateral striatum. *Journal of Neuroscience*, 34(14), 5012-5022. doi:10.1523/JNEUROSCI.3707-13.2014
- Garceau, C., Samaha, A. N., Cordahi, T., Servonnet, A., & Khoo, S. Y. (2021). Metabotropic group II glutamate receptors in the basolateral amygdala mediate cue-triggered increases in incentive motivation. *Psychopharmacology (Berl)*. doi:10.1007/s00213-021-05907-7
- Hall, J., Parkinson, J. A., Connor, T. M., Dickinson, A., & Everitt, B. J. (2001). Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 13(10), 1984-1992. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01577.x
- Hammerslag, L. R., & Gulley, J. M. (2014). Age and sex differences in reward behavior in adolescent and adult rats. *Developmental Psychobiology*, 56(4), 611-621. doi:10.1002/dev.21127
- Hogarth, L., Balleine, B. W., Corbit, L. H., & Killcross, S. (2013). Associative learning mechanisms underpinning the transition from recreational drug use to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1282, 12-24. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06768.x
- Hogarth, L., Dickinson, A., Wright, A., Kouvaraki, M., & Duka, T. (2007). The role of drug expectancy in the control of human drug seeking. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 33(4), 484-496. doi:10.1037/0097-7403.33.4.484

- Holland, P. C. (2004). Relations between Pavlovian-instrumental transfer and reinforcer devaluation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 30(2), 104-117. doi:10.1037/0097-7403.30.2.104
- Holland, P. C., & Gallagher, M. (2003). Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1680-1694. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02585.x
- Holmes, N. M., Marchand, A. R., & Coutureau, E. (2010). Pavlovian to instrumental transfer: a neurobehavioural perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1277-1295. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.03.007
- Imre, G. (2007). The preclinical properties of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *CNS Drug Reviews*, 13(4), 444-464. doi:10.1111/j.1527-3458.2007.00024.x
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284-292. doi:10.1038/nature14188
- Jin, X., Semenova, S., Yang, L., Ardecky, R., Sheffler, D. J., Dahl, R., . . . Markou, A. (2010). The mGluR2 positive allosteric modulator BINA decreases cocaine self-administration and cue-induced cocaine-seeking and counteracts cocaine-induced enhancement of brain reward function in rats. *Neuropsychopharmacology*, 35(10), 2021-2036. doi:10.1038/npp.2010.82
- Johnson, A. R., Thibeault, K. C., Lopez, A. J., Peck, E. G., Sands, L. P., Sanders, C. M., . . . Calipari, E. S. (2019). Cues play a critical role in estrous cycle-dependent enhancement of cocaine reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, 44(7), 1189-1197. doi:10.1038/s41386-019-0320-0
- Justinova, Z., Panlilio, L. V., Secci, M. E., Redhi, G. H., Schindler, C. W., Cross, A. J., . . . Goldberg, S. R. (2015). The novel metabotropic glutamate receptor 2 positive allosteric modulator, AZD8529, decreases nicotine self-administration and relapse in squirrel monkeys. *Biological Psychiatry*, 78(7), 452-462. doi:10.1016/j.biopsych.2015.01.014
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(8), 561-572. doi:10.1038/nrn2515
- Kalivas, P. W., Volkow, N., & Seamans, J. (2005). Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*, 45(5), 647-650. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.005

- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, *162*(8), 1403-1413. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1403
- Kendig, M. D., Boakes, R. A., Rooney, K. B., & Corbit, L. H. (2013). Chronic restricted access to 10% sucrose solution in adolescent and young adult rats impairs spatial memory and alters sensitivity to outcome devaluation. *Physiology & Behavior*, *120*, 164-172. doi:10.1016/j.physbeh.2013.08.012
- Kendig, M. D., Cheung, A. M., Raymond, J. S., & Corbit, L. H. (2016). Contexts Paired with Junk Food Impair Goal-Directed Behavior in Rats: Implications for Decision Making in Obesogenic Environments. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*, 216. doi:10.3389/fnbeh.2016.00216
- Kenny, P. J., Hoyer, D., & Koob, G. F. (2018). Animal Models of Addiction and Neuropsychiatric Disorders and Their Role in Drug Discovery: Honoring the Legacy of Athina Markou. *Biological Psychiatry*, *83*(11), 940-946. doi:10.1016/j.biopsych.2018.02.009
- Kew, J. N., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, *179*(1), 4-29. doi:10.1007/s00213-005-2200-z
- Khoo, S. Y., LeCocq, M. R., Deyab, G. E., & Chaudhri, N. (2019). Context and topography determine the role of basolateral amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in appetitive Pavlovian responding. *Neuropsychopharmacology*, *44*(9), 1524-1533. doi:10.1038/s41386-019-0335-6
- Knackstedt, L. A., LaRowe, S., Mardikian, P., Malcolm, R., Upadhyaya, H., Hedden, S., . . . Kalivas, P. W. (2009). The role of cystine-glutamate exchange in nicotine dependence in rats and humans. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 841-845. doi:10.1016/j.biopsych.2008.10.040
- Knackstedt, L. A., Melendez, R. I., & Kalivas, P. W. (2010). Ceftriaxone restores glutamate homeostasis and prevents relapse to cocaine seeking. *Biological Psychiatry*, *67*(1), 81-84. doi:10.1016/j.biopsych.2009.07.018
- Kruse, J. M., Overmier, J. B., Konz, W. A., & Rokke, E. (1983). Pavlovian conditioned stimulus effects upon instrumental choice behavior are reinforcer specific. *Learning and Motivation*, *14*(2), 165-181. doi:https://doi.org/10.1016/0023-9690(83)90004-8
- Kufahl, P. R., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2011). Enhanced sensitivity to attenuation of conditioned reinstatement by the mGluR 2/3 agonist LY379268 and increased functional



- activity of mGluR 2/3 in rats with a history of ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2762-2773. doi:10.1038/npp.2011.174
- Lassi, G., Taylor, A. E., Timpson, N. J., Kenny, P. J., Mather, R. J., Eisen, T., & Munafò, M. R. (2016). The CHRNA5–A3–B4 Gene Cluster and Smoking: From Discovery to Therapeutics. *Trends in Neurosciences*, 39(12), 851-861. doi:10.1016/j.tins.2016.10.005
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4-5), 727-738. doi:10.1023/a:1025048802629
- Lex, A., & Hauber, W. (2008). Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learning & Memory*, 15(7), 483-491. doi:10.1101/lm.978708
- Li, X., D'Souza, M. S., Nino, A. M., Doherty, J., Cross, A., Markou, A. (2016). Attenuation of nicotine-taking and nicotine-seeking behavior by the mGlu2 receptor positive allosteric modulators AZD8418 and AZD8529 in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(10), 1801-1814. doi:10.1007/s00213-016-4220-2
- Lichtenberg, N. T., Pennington, Z. T., Holley, S. M., Greenfield, V. Y., Cepeda, C., Levine, M. S., & Wassum, K. M. (2017). Basolateral Amygdala to Orbitofrontal Cortex Projections Enable Cue-Triggered Reward Expectations. *Journal of Neuroscience*, 37(35), 8374-8384. doi:10.1523/JNEUROSCI.0486-17.2017
- Liechti, M. E., Lhuillier, L., Kaupmann, K., & Markou, A. (2007). Metabotropic glutamate 2/3 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens shell are involved in behaviors relating to nicotine dependence. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9077-9085. doi:10.1523/JNEUROSCI.1766-07.2007
- Liechti M. E., & Markou A. (2008). Role of the glutamatergic system in nicotine dependence: implications for the discovery and development of new pharmacological smoking cessation therapies. *CNS Drugs*, 22(9), 705–724. doi:10.2165/00023210-200822090-00001
- Lovibond, P. F. (1981). Appetitive Pavlovian-instrumental interactions: effects of inter-stimulus interval and baseline reinforcement conditions. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 33(Pt 4), 257-269. doi:10.1080/14640748108400811
- Lovibond, P. F. (1983). Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 9(3), 225-247. doi: 10.1037/0097-7403.9.3.225
- Lu, L., Uejima, J. L., Gray, S. M., Bossert, J. M., & Shaham, Y. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR(2/3) agonist LY379268 attenuate the expression of

- incubation of cocaine craving. *Biological Psychiatry*, 61(5), 591-598. doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.011
- Ludwig, A. M., Wikler, A., & Stark, L. H. (1974). The first drink: psychobiological aspects of craving. *Archives of General Psychiatry*, 30(4), 539-547. doi:10.1001/archpsyc.1974.01760100093015
- Lynch, W. J., Roth, M. E., & Carroll, M. E. (2002). Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 164(2), 121-137. doi:10.1007/s00213-002-1183-2
- Mackintosh, N. J. (1974). *The psychology of animal learning*. London ; New York: Academic Press.
- Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., & Lariccia, V. (2019). Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). doi:10.3390/ijms20225674
- Malvaez, M., Greenfield, V. Y., Wang, A. S., Yorita, A. M., Feng, L., Linker, K. E., . . . Wassum, K. M. (2015). Basolateral amygdala rapid glutamate release encodes an outcome-specific representation vital for reward-predictive cues to selectively invigorate reward-seeking actions. *Scientific Reports*, 5, 12511. doi:10.1038/srep12511
- Marin, M.-F., Camprodon, J.A., Dougherty, D.D., & Milad, M.R. (2014). Device-based brain stimulation to augment fear extinction: Implications for PTSD treatment and beyond. *Depression and Anxiety*, 31(4), 269-278. doi: 10.1002/da.22252
- Marquez, J., Tosina, M., de la Rosa, V., Segura, J. A., Alonso, F. J., Mates, J. M., & Campos-Sandoval, J. A. (2009). New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochemistry International*, 55(1-3), 64-70. doi:10.1016/j.neuint.2009.02.022
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 257-332. doi:10.1016/s0301-0082(98)00003-3
- Mogenson, G. J., Swanson, L. W., & Wu, M. (1983). Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *Journal of Neuroscience*, 3(1), 189-202. doi: 10.1523/JNEUROSCI.03-01-00189.1983
- Morishima, Y., Miyakawa, T., Furuyashiki, T., Tanaka, Y., Mizuma, H., & Nakanishi, S. (2005). Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 102(11), 4170-4175.  
doi:10.1073/pnas.0500914102
- Negrete, J. C., & Emil, S. (1992). Cue-evoked arousal in cocaine users: a study of variance and predictive value. *Drug Alcohol Dependence*, 30(2), 187-192. doi:10.1016/0376-8716(92)90025-8
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 295-322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., Ehrman, R., & Robbins, S. J. (1998). Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 15-22. doi:10.1177/026988119801200103
- Ohishi, H., Neki, A., & Mizuno, N. (1998). Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neuroscience Research*, 30(1), 65-82. doi:10.1016/s0168-0102(97)00120-x
- Olney, J. J., Warlow, S. M., Naffziger, E. E., & Berridge, K. C. (2018). Current perspectives on incentive salience and applications to clinical disorders. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 22, 59-69. doi:10.1016/j.cobeha.2018.01.007
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54(5), 581-618. doi:10.1016/s0301-0082(97)00085-3
- Perkins, K. A., Gerlach, D., Vender, J., Grobe, J., Meeker, J., & Hutchison, S. (2001). Sex differences in the subjective and reinforcing effects of visual and olfactory cigarette smoke stimuli. *Nicotine & Tobacco Research*, 3(2), 141-150. doi:10.1080/14622200110043059
- Perks, S. M., & Clifton, P. G. (1997). Reinforcer revaluation and conditioned place preference. *Physiology & Behavior*, 61(1), 1-5. doi:10.1016/s0031-9384(96)00243-0
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., Niedzielski, A. S., & Wenthold, R. J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71(4), 949-976. doi:10.1016/0306-4522(95)00533-1
- Pinheiro, P., & Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 457-482. doi:10.1007/s00441-006-0265-6
- Pitchers, K. K., Flagel, S. B., O'Donnell, E. G., Woods, L. C., Sarter, M., & Robinson, T. E. (2015). Individual variation in the propensity to attribute incentive salience to a food cue: influence of sex. *Behavioural Brain Research*, 278, 462-469. doi:10.1016/j.bbr.2014.10.036

- Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *40*, 1-5. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.001
- Prevost, C., Liljeholm, M., Tyszka, J. M., & O'Doherty, J. P. (2012). Neural correlates of specific and general Pavlovian-to-Instrumental Transfer within human amygdalar subregions: a high-resolution fMRI study. *Journal of Neuroscience*, *32*(24), 8383-8390. doi:10.1523/JNEUROSCI.6237-11.2012
- Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological Review*, *74*(3), 151-182. doi:10.1037/h0024475
- Robbins, S. J., Ehrman, R. N., Childress, A. R., & O'Brien, C. P. (1999). Comparing levels of cocaine cue reactivity in male and female outpatients. *Drug Alcohol Dependence*, *53*(3), 223-230. doi:10.1016/s0376-8716(98)00135-5
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, *18*(3), 247-291. doi:10.1016/0165-0173(93)90013-p
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1507), 3137-3146. doi:10.1098/rstb.2008.0093
- Robinson, T. E., & Flagel, S. B. (2009). Dissociating the predictive and incentive motivational properties of reward-related cues through the study of individual differences. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 869-873. doi:10.1016/j.biopsych.2008.09.006
- Robinson, T. E., Yager, L. M., Cogan, E. S., & Saunders, B. T. (2014). On the motivational properties of reward cues: Individual differences. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 450-459. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.040
- Rubonis, A. V., Colby, S. M., Monti, P. M., Rohsenow, D. J., Gulliver, S. B., & Sirota, A. D. (1994). Alcohol cue reactivity and mood induction in male and female alcoholics. *Journal of Studies on Alcohol*, *55*(4), 487-494. doi:10.15288/jsa.1994.55.487
- Rudy, J. W. (2014). *The neurobiology of learning and memory* (Second edition. ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, *83*(3), 803-834. doi:10.1152/physrev.00002.2003

- Scheyer, A. F., Loweth, J. A., Christian, D. T., Uejima, J., Rabei, R., Le, T., . . . Wolf, M. E. (2016). AMPA Receptor Plasticity in Accumbens Core Contributes to Incubation of Methamphetamine Craving. *Biological Psychiatry*, *80*(9), 661-670. doi:10.1016/j.biopsych.2016.04.003
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*(1), 12-20.
- Schwendt, M., Reichel, C. M., & See, R. E. (2012). Extinction-dependent alterations in corticostriatal mGluR2/3 and mGluR7 receptors following chronic methamphetamine self-administration in rats. *PLoS One*, *7*(3), e34299. doi:10.1371/journal.pone.0034299
- Shansky, R. M. (2019). Are hormones a "female problem" for animal research? *Science*, *364*(6443), 825-826. doi:10.1126/science.aaw7570
- Shansky, R. M., & Murphy, A. Z. (2021). Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 457-464. doi:10.1038/s41593-021-00806-8
- Shiflett, M. W., & Balleine, B. W. (2010). At the limbic-motor interface: disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. *European Journal of Neuroscience*, *32*(10), 1735-1743. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07439.x
- Sinclair, C. M., Cleva, R. M., Hood, L. E., Olive, M. F., & Gass, J. T. (2012). mGluR5 receptors in the basolateral amygdala and nucleus accumbens regulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *101*(3), 329-335. doi:10.1016/j.pbb.2012.01.014
- Spampanato, J., Polepalli, J., & Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, *60*(5), 765-773. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.11.006
- Stefanik, M. T., & Kalivas, P. W. (2013). Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*, 213. doi:10.3389/fnbeh.2013.00213
- Sterling, R. C., Dean, J., Weinstein, S. P., Murphy, J., & Gottheil, E. (2004). Gender differences in cue exposure reactivity and 9-month outcome. *Journal of Substance Abuse Treatment*, *27*(1), 39-44. doi:10.1016/j.jsat.2004.03.008
- Stewart, J., de Wit, H., & Eikelboom, R. (1984). Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. *Psychological Review*, *91*(2), 251-268. doi:10.1037/0033-295X.91.2.251

- Swan, G. E., Denk, C. E., Parker, S. D., Carmelli, D., Furze, C. T., & Rosenman, R. H. (1988). Risk factors for late relapse in male and female ex-smokers. *Addictive Behaviors, 13*(3), 253-266. doi:10.1016/0306-4603(88)90052-4
- Takamori, S. (2006). VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neuroscience Research, 55*(4), 343-351. doi:10.1016/j.neures.2006.04.016
- Talmi, D., Seymour, B., Dayan, P., & Dolan, R. J. (2008). Human pavlovian-instrumental transfer. *Journal of Neuroscience, 28*(2), 360-368. doi:10.1523/JNEUROSCI.4028-07.2008
- Tamaru, Y., Nomura, S., Mizuno, N., & Shigemoto, R. (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience, 106*(3), 481-503. doi:10.1016/s0306-4522(01)00305-0
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., . . . Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell, 87*(7), 1317-1326. doi:10.1016/s0092-8674(00)81826-7
- Tye, K. M., & Janak, P. H. (2007). Amygdala neurons differentially encode motivation and reinforcement. *Journal of Neuroscience, 27*(15), 3937-3945. doi:10.1523/JNEUROSCI.5281-06.2007
- Tye, K. M., Stuber, G. D., de Ridder, B., Bonci, A., & Janak, P. H. (2008). Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. *Nature, 453*(7199), 1253-1257. doi:10.1038/nature06963
- Uejima, J. L., Bossert, J. M., Poles, G. C., & Lu, L. (2007). Systemic and central amygdala injections of the mGluR2/3 agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of sucrose craving in rats. *Behavioural Brain Research, 181*(2), 292-296. doi:10.1016/j.bbr.2007.04.019
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., & Telang, F. (2008). Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363*(1507), 3191-3200. doi:10.1098/rstb.2008.0107
- Waldrop, A. E., Price, K. L., Desantis, S. M., Simpson, A. N., Back, S. E., McRae, A. L., . . . Brady, K. T. (2010). Community-dwelling cocaine-dependent men and women respond differently to social stressors versus cocaine cues. *Psychoneuroendocrinology, 35*(6), 798-806. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.11.005
- Walker, K. C. (1942). The effect of a discriminative stimulus transferred to a previously unassociated response. *Journal of Experimental Psychology, 31*(4), 312-321. doi:10.1037/h0062929

- Watson, P., Wiers, R. W., Hommel, B., & de Wit, S. (2014). Working for food you don't desire. Cues interfere with goal-directed food-seeking. *Appetite*, 79, 139-148. doi:10.1016/j.appet.2014.04.005
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093-1097. doi:10.1126/science.1128134
- Wyvell, C. L., & Berridge, K. C. (2000). Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 8122-8130. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-21-08122.2000
- Wyvell, C. L., & Berridge, K. C. (2001). Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7831-7840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-19-07831.2001
- Zhao, Y., Dayas, C. V., Aujla, H., Baptista, M. A., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26(39), 9967-9974. doi:10.1523/JNEUROSCI.2384-06.2006
- Zhou, L., Pruitt, C., Shin, C. B., Garcia, A. D., Zavala, A. R., & See, R. E. (2014). Fos expression induced by cocaine-conditioned cues in male and female rats. *Brain Structure and Function*, 219(5), 1831-1840. doi:10.1007/s00429-013-0605-8