

Université de Montréal

**Étude du rôle des récepteurs NMDA du mésencéphale ventral dans la récompense induite par la stimulation électrique du mésencéphale postérieur chez le rongeur.**

par

Sabrina Bergeron

Département de Psychiatrie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Master of Science (M.Sc)  
en sciences biomédicales  
option sciences psychiatriques

juillet 2012

© Sabrina Bergeron, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle des récepteurs NMDA du mésencéphale ventral dans la récompense induite  
par la stimulation électrique du mésencéphale postérieur chez le rongeur.

Présenté par :

Sabrina Bergeron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Adrianna Mendrek, président-rapporteur

Pierre-Paul Rompré, directeur de recherche

Sandra Boye, membre du jury

## Résumé

La voie dopaminergique mésolimbique qui prend son origine dans le mésencéphale ventral et qui projette vers des régions rostrales du système limbique fait partie du substrat nerveux qui contrôle la récompense et les comportements motivés. Il a été suggéré qu'un signal de récompense est produit lorsque le patron de décharge des neurones dopaminergiques passe d'un mode tonique à un mode phasique, une transition qui est initiée par l'action du glutamate aux récepteurs N-Méthyl-D-aspartate (NMDA). Étant donné qu'une altération du système de récompense est souvent associée à des anomalies cliniques telles que l'addiction compulsive et à des troubles émotionnels tels que l'anhédonie, nous avons étudié le rôle des récepteurs NMDA dans la récompense induite par la stimulation électrique intracérébrale. Puisque les récepteurs NMDA sont composés de sous-unités distinctes, GluN1, GluN2 et GluN3, nous avons étudié le rôle de deux sous-unités qui sont présentes dans le mésencéphale ventral : GluN2A et GluN2B.

Les résultats montrent que des injections mésencéphaliques de R-CPP et de PPPA, des antagonistes préférentiels aux sous-unités GluN2A/B, ont produit une augmentation dose-dépendante de l'effet de récompense, un effet qui était, à certains temps après les injections, accompagné d'une augmentation du nombre de réponses maximales. Ces effets n'ont pas été observés après l'injection d'une large gamme de doses de Ro04-5595, un antagoniste des sous-unités GluN2B. Ces résultats suggèrent que le glutamate mésencéphalique exerce une modulation négative sur le circuit de récompense, un effet dû à son action au niveau des récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN2A.

**Mots-clés : autostimulation, glutamate, mésencéphale ventral, NMDA, récompense**

## **Abstract**

The mesolimbic dopaminergic pathway, originating from the ventral midbrain and projecting to rostral limbic structures, is part of a neural substrate that controls reward and incentive behaviors. It has been suggested that the rewarding effect is produced by a tonic to phasic shift in dopamine cell firing and a transduction process initiated by the action of glutamate at the N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Given that an alteration in reward signaling is often associated with clinical symptoms of compulsive addictive behaviors and emotional disturbances such as anhedonia, we investigated the role of NMDA receptors in reward induced by intracranial electrical stimulation. Since NMDA receptors are composed of distinct subunits, GluN1, GluN2 and GluN3, we investigated the role of the main GluN2 subunits that are expressed in the ventral midbrain, GluN2A and GluN2B.

Results show that ventral midbrain injections of R-CPP or PPPA, preferential GluN2A/2B antagonists, produce a dose-orderly enhancement of reward, an effect that was, at some time after the injection, accompanied by an increase in maximum response rates. These effects were not observed following ventral midbrain injections of a wide range of doses of the selective GluN2B antagonist, Ro-04-5595. These findings suggest that ventral midbrain glutamate exerts a negative modulation on reward induced by electrical stimulation of the posterior mesencephalon, an effect most likely mediated by NMDA receptors composed of GluN2A subunits.

**Keywords :** glutamate, NMDA, reward, self-stimulation, ventral midbrain

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Liste des figures .....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>vii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>x</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>11</b>
<b>Apprentissage et comportements dirigés.....</b>	<b>11</b>
Conditionnement classique .....	11
Conditionnement instrumental .....	12
La récompense : un renforcement positif .....	15
<b>Étude du renforcement positif : modèle d'autostimulation intracérébrale.15</b>	
Description du modèle d'autostimulation intracérébrale.....	16
Prototype expérimental du modèle d'autostimulation intracérébrale (ASI) .....	21
Validité du modèle d'autostimulation intracérébrale : comparaison aux récompenses naturelles .....	27
Substrat nerveux de l'autostimulation intracérébrale .....	29
<b>L'aire tegmentaire ventrale : rôle dans la récompense.....</b>	<b>32</b>
La voie dopaminergique mésolimbique .....	34
Régulation et dérégulation dopaminergiques dans la récompense.....	35
La prédiction de la récompense.....	36
<b>Régulation glutamatergique de la récompense .....</b>	<b>38</b>
Les récepteurs glutamatergiques de type N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA).....	39
Implications des récepteurs NMDA dans la récompense .....	41
Assemblage des récepteurs NMDA.....	42
Étude des sous-unités GluN2A et GluN2B dans la récompense.....	43
<b>Objectifs de l'étude .....</b>	<b>44</b>
<b>Hypothèses.....</b>	<b>46</b>

<b>Résultats.....</b>	<b>47</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	49
<b>INTRODUCTION .....</b>	50
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	53
ANIMALS.....	53
SURGERY.....	53
SELF-STIMULATION TRAINING .....	54
DRUG AND VEHICLE TESTS.....	55
DATA ANALYSIS .....	56
HISTOLOGY .....	56
DRUGS .....	57
<b>RESULTS .....</b>	58
HISTOLOGY .....	58
EFFECTS OF R-CPP .....	58
EFFECTS OF PPPA .....	59
EFFECTS OF RO04-5595.....	60
<b>DISCUSSION .....</b>	61
<b>DISCLOSURE/CONFLICTS OF INTEREST .....</b>	66
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	67
<b>REFERENCES .....</b>	68
<b>LEGENDS.....</b>	74
<b>Discussion.....</b>	<b>80</b>
<b>Sélection des antagonistes et des paramètres d'autostimulation intracérébrale.....</b>	<b>81</b>
<b>Rôles des récepteurs NMDA dans le mésencéphale ventral .....</b>	<b>84</b>
<b>Expression des sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA dans le MV .....</b>	92

Modulation positive de la transmission dopaminergique du MV par le glutamate ....	93
Modulation négative de la transmission dopaminergique du MV par le glutamate ...	95
Implications possibles des sous-unités GluN2D dans la régulation de la récompense	98
Étude de l'activité locomotrice .....	99
Résumé des acquis : modèle proposé .....	101
Conclusions et perspectives .....	104
Bibliographie .....	106
Annexe 1. ....	i
Annexe 2. ....	ii
Annexe 3. ....	iii
Annexe 4. ....	vi

## Liste des figures

### INTRODUCTION

FIGURE 1. Exemple théorique d'une courbe R/F

FIGURE 2. Paradigme du déplacement de la courbe R/F

FIGURE 3. Modèle du *reward-prediction error* tel que proposé par Schultz.

FIGURE 4. Exemple de l'emplacement des canules guides et des canules d'injection

### RÉSULTATS : Article

Figure 1 à 6

Table I et II

### DISCUSSION

FIGURE 5. Modèle neuronal proposé

### ANNEXES

FIGURE 6. Étude pilote avec le PPPA (82,5 pmol)

FIGURE 7. Étude pilote avec le Ro04-5595 (82,5 pmol)

FIGURE 8. Site d'injection intra-MV pour les animaux inclus dans les études d'activité locomotrice

FIGURE 9. Mesures de l'activité locomotrice



## Liste des abréviations

AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid
ANOVA	Analysis of variance
a-p	Antero-postérieur
AP-7	D-(-)-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASI	Autostimulation intracérébrale
ASY	Asymptote : taux de réponse maximal
BSR	<i>Brain stimulation reward</i>
CamKII	Calmoduline dependant protein kinase
COMT	Catechol-O-méthyltransférase
CPF	Cortex pré-frontal
CPP	Acide 3-(R-2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1 phosphonique
DA	Dopamine
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
LH	Hypothalamus latéral
LHb	Habenula latérale
LTDg	Tegmentum latérodorsal
M50	Seuil de recompense : fréquence de stimulation requise pour obtenir 50% du taux de réponse maximal
MAO	Monoamine oxydase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFB	Faisceau mésencéphalique médian (Medial forebrain bundle)
MK-801	Dizocilpine, 5 <i>S</i> ,10 <i>R</i> -(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[ <i>a,d</i> ]cyclohepten-5,10-Imine maleate

MP	Mésencéphale postérieur
MV	Mésencéphale ventral
NMDA	N-Méthyle-D-Aspartate
PBP	Aire parabrachiale pigmentée
PCP	Phénylcyclidine
PFR	Aire réflexus parafasciculus
PKC	Protein kinase C
PLT	Potentialisation à long terme
PN	Noyau paranigral
PPPA	Acide (2R,4S)-4-(3-Phosphonopropyl)-2-piperidinecarboxylique
PPTg	Tegmentum pédunculo pontin
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
RD	Raphé Dorsal
RMTg	Tegmentum rostromédian
Ro04-5595	Hydrochloride 1-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-méthoxy-2-méthyl-7-isoquinolinol
SNc	Substance noire <i>pars compacta</i>
TH	Tyrosine hydroxylase
Vglut	<i>Vesicular Glutamate Transporter</i>
VMAT	<i>Vesicular monoamine transporter</i>

*À ma mère Josée*

## Remerciements

Ouf... Déjà la fin! Ou plutôt enfin la fin!? Ce fût tout un parcours, mais Ô combien agréable! Ceux qui me connaissent depuis longtemps seront tous d'accord pour dire que mon cheminement académique depuis l'enfance a été toute une épopée! C'est donc ici que j'en profite pour remercier tous ceux qui m'ont soutenu et qui ont cru en moi tout au long de ces années. Je tiens à remercier mes proches, amis, collègues et professeurs, ceux qui m'ont rendu la tâche plus agréable, ou un peu plus difficile parfois... À tous les gens que j'ai côtoyé depuis le début, à toutes les expériences vécues, à tous les défis relevés, c'est grâce à vous aujourd'hui que je suis devenue la personne que vous connaissez!

Je remercie spécialement ma mère, ma plus fidèle supporter, celle qui a toujours été là pour m'encourager. Aussi, un merci à mes amis et à tout ceux qui m'ont côtoyé récemment et qui ne se sont pas lassés de m'entendre raconter mes histoires de rats ou bien de m'entendre dire : Hey, j'ai presque fini mon mémoire!

Un sincère remerciement à mon directeur de recherche, Pierre-Paul Rompré, pour ses conseils, sa disponibilité, sa patience et surtout pour la grande confiance qu'il m'a accordé dès mon arrivée au laboratoire. Je tiens aussi à remercier Claude Bouchard pour son temps, pour la qualité de la formation qu'il m'a offert, pour son expertise et aussi pour m'avoir toujours aidée à réparer mes gaffes sans trop se moquer de moi! Enfin, il ne faut pas oublier mes 172 amis/cobayes, sans qui ce mémoire n'aurait pas beaucoup de contenu.

C'est avec une grande fierté que je dépose ce mémoire aujourd'hui, et je vous dis un gros MERCI à tous, c'est en grande partie à vous que je dois mon succès!

Cheers!

## **Introduction**

### **Apprentissage et comportements dirigés**

L'apprentissage est un processus essentiel à la survie de l'organisme et de l'espèce autant chez l'humain que chez l'animal. Nous devons apprendre à satisfaire nos besoins vitaux tels que boire, manger et se reproduire ainsi qu'à éviter les situations et les comportements qui risquent de nous mettre en danger. Ces comportements, appelés comportements dirigés, sont acquis par l'expérience; ils résultent en partie d'une association entre le comportement et les stimuli qui y sont associés; on parle alors de conditionnement. Deux grandes théories ont été élaborées pour décrire ce phénomène, le conditionnement classique et le conditionnement instrumental.

### **Conditionnement classique**

Ivan Pavlov, un célèbre physiologiste russe, a fait une découverte qui a marqué l'histoire de la psychologie: le conditionnement classique (popularisé sous le nom de conditionnement Pavlovien). En 1927, alors qu'il étudiait le système digestif canin, il a remarqué que les chiens salivaient avant que la nourriture leur soit présentée (Pavlov 1927). Il nota que la simple présence du technicien qui leur apportait quotidiennement leur nourriture suffisait pour provoquer la salivation. À partir de ces observations, il émit l'hypothèse de l'établissement d'une association entre le stimulus neutre, le technicien, et le stimulus non-neutre, la nourriture. Pour tester son hypothèse, Pavlov fit sonner une cloche avant de présenter la nourriture à un chien. Après un certain nombre de

répétitions, il nota que l'animal salivait au son de la cloche. Pour expliquer ce phénomène d'apprentissage, Pavlov a défini plusieurs concepts : i) le stimulus inconditionné; ii) le stimulus conditionné; iii) la réponse inconditionnée; et iv) la réponse conditionnée. Le stimulus inconditionné est un stimulus qui déclenche une réponse physiologique, dans le cas de l'expérience de Pavlov c'est la nourriture. Le stimulus conditionné est un stimulus neutre qui, en l'absence d'une quelconque association, ne déclenche aucune réponse physiologique; exemple : la cloche. La réponse inconditionnée est la réponse physiologique, la salivation, qui est déclenchée par le stimulus inconditionné. Enfin, la réponse conditionnée est la réponse physiologique qui est déclenchée par le stimulus conditionné après une série d'association entre ce dernier et le stimulus inconditionné. Le chien de Pavlov a appris que le stimulus conditionné prédit l'arrivée du stimulus inconditionné. Il faut donc en déduire que de nouvelles connexions ont été créées dans son cerveau, des connexions qui relient les éléments nerveux responsables de la perception du son de la cloche à ceux qui déclenchent la sécrétion des glandes salivaires. Ce phénomène d'apprentissage joue un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme à son environnement et par le fait même dans sa survie.

### **Conditionnement instrumental**

Burrhus Frederic Skinner, un comportementaliste américain, décrit un autre phénomène de conditionnement, qu'il nomma conditionnement instrumental ou opérant (Skinner 1934). Sa théorie a été inspirée des travaux de Thorndike sur la loi de l'effet en 1911

(Thorndike 1911). Cette loi stipule qu'un comportement est susceptible d'être reproduit s'il est accompagné d'aboutissements agréables. L'apprentissage par conditionnement opérant comprend la notion de renforcement et prend en considération les comportements volontaires qui visent l'obtention d'un but. À l'instar de Pavlov, Skinner a défini certains concepts pour expliquer le phénomène d'apprentissage par conditionnement opérant : i) le renforcement positif; ii) le renforcement négatif et iii) la punition. Le renforcement augmente la probabilité d'observer une réponse opérante; sa valence, positive ou négative, dépend de la nature du stimulus qui est associé à la réponse. Un stimulus agréable constitue donc un renforcement positif, car il augmentera la probabilité que la réponse soit répétée. À l'opposé du renforcement, la punition diminue la probabilité de la répétition d'une réponse opérante. Tel est généralement le cas pour un stimulus désagréable. Pour tester sa théorie, Skinner a mis au point dans les années 30 une chambre de conditionnement opérant, connue aujourd'hui sous le nom de « boîte de Skinner ». Le principe de fonctionnement de la boîte de Skinner est simple. Par exemple, l'animal est placé dans la boîte puis un signal lumineux apparaît au-dessus d'un levier positionné sur l'un des murs de la boîte; lorsque l'animal appuie sur le levier, un morceau de nourriture lui est présenté. Au début, l'animal appuie sur le levier par hasard, sans aucune évidence d'un but précis; mais après un certain temps, sa réponse est dirigée vers le levier dès la présentation de la lumière. Ce comportement dirigé résulte de l'apprentissage; il a appris que la nourriture est disponible lorsque la lumière s'allume. Il a

aussi appris que pour obtenir la nourriture, il faut qu'il appuie sur le levier. On peut dire que la lumière et le levier constituent des stimuli conditionnés qui déclenchent une réponse conditionnée ou opérante. La nourriture, selon la théorie de Skinner, constitue un renforcement positif, elle augmente la probabilité de répétition d'une réponse opérante. Si l'apparition de la lumière était suivie de la présentation d'un stimulus désagréable, par exemple un choc électrique, et que l'appui sur le levier avait pour conséquence d'annuler la présentation du choc électrique, on observerait l'apparition du même comportement dirigé vers le levier. Toutefois, Skinner dirait que la réponse opérante qui est émise résulte d'un renforcement négatif. Tout comme le renforcement positif, le renforcement négatif augmente la probabilité d'observer une réponse opérante. Si par contre, l'appui sur le levier avait pour conséquence l'apparition du choc électrique, l'animal éviterait de s'approcher du levier; le choc électrique diminuerait la probabilité de la réponse opérante; il agirait comme une punition. Pour expliquer l'apprentissage par conditionnement opérant, on doit supposer que de nouvelles connexions ont été créées dans le cerveau entre les éléments nerveux activés par les stimuli (lumière, levier), ceux activés par la nourriture et ceux qui sont responsables de l'émission du comportement. On peut également supposer que le réseau neuronal en question est plus complexe (voire plus élaboré) que celui qui sous-tend l'apprentissage par conditionnement Pavlovien. À l'instar de l'apprentissage par conditionnement Pavlovien, l'apprentissage par conditionnement



opérant joue un rôle essentiel dans l'adaptation de l'organisme à son environnement et dans sa survie.

### **La récompense : un renforcement positif**

Avant d'aborder le modèle qui sera utilisé pour étudier les mécanismes neuronaux qui sous-tendent le renforcement positif, il est pertinent de faire la distinction entre deux concepts, la récompense et le renforcement. Tel que mentionné précédemment, un stimulus aversif comme un choc électrique et un stimulus agréable comme la nourriture constituent chacun un renforcement. Selon la théorie d'apprentissage de Skinner, le renforcement, peu importe sa valence, renforce l'association entre la réponse et sa conséquence; le renforcement réfère au lien qui existe entre les deux et non à la nature même de la conséquence. Le terme récompense ne réfère aucunement au lien qui existe entre la réponse et sa conséquence; la récompense réfère à la connotation agréable du stimulus c'est-à-dire sa valence émotionnelle positive. Étant donné que le modèle animal utilisé dans la présente étude ne permet pas de faire la distinction entre le renforcement et la récompense, les deux termes seront employés comme des synonymes.

### **Étude du renforcement positif : modèle d'autostimulation intracérébrale.**

En 1954, Olds et Milner ont découvert qu'un rongeur peut facilement apprendre à produire une réponse opérante dans le but d'obtenir une stimulation électrique intracérébrale. L'hypothèse proposée pour expliquer ce comportement d'autostimulation

intracérébrale est que la stimulation électrique constitue un renforcement positif ou une récompense. Cette découverte fut importante puisqu'elle venait confirmer qu'il existe dans le système nerveux central des éléments nerveux qui sont activés par un stimulus ayant une valence positive. Le comportement d'autostimulation intracérébrale induit chez l'animal en laboratoire est devenu un modèle animal couramment utilisé pour étudier les caractéristiques anatomiques, physiologiques et pharmacologiques des éléments nerveux activés par la récompense; pour simplifier le texte, nous utiliserons dans les pages qui suivent l'expression « neurones de récompense » lorsqu'on se réfère à ces éléments nerveux.

### **Description du modèle d'autostimulation intracérébrale**

Pour induire le comportement d'autostimulation intracérébrale, une électrode de stimulation est implantée à demeure dans une région du cerveau qui contient des neurones de récompense. L'électrode est généralement constituée d'un fil d'acier inoxydable, d'un diamètre inférieur à 300  $\mu\text{m}$ , isolé électriquement à l'exception de la pointe. Un second fil métallique, non isolé, est branché à des vis insérées dans l'os crânien; ce fil permet de compléter le circuit électrique. Étant donné que les neurones au repos sont généralement à l'état hyperpolarisé, c'est-à-dire qu'ils ont une prédominance de charges négatives du côté intracellulaire, l'électrode doit fournir une stimulation d'une intensité suffisante pour dépolariser les neurones et déclencher des potentiels d'action. Les études sur les propriétés biophysiques des neurones ont montré que la stimulation

cathodale (courant négatif) est la plus efficace pour dépolariser un neurone lorsque l'électrode est du côté extracellulaire (Ranck 1975). Pour s'assurer que les potentiels d'actions sont déclenchés de façon synchrone, l'électrode est branchée à un générateur de courant constant qui délivre une pulsion de forme rectangulaire d'une intensité fixe. L'utilisation d'une pulsion de très courte durée (i.e. 100  $\mu$ sec) permet d'induire un seul potentiel d'action par neurone. L'intensité du courant exprimée en mA détermine le rayon d'action de la pulsion, c'est-à-dire la région autour de la pointe de l'électrode où la stimulation induira une dépolarisation supraliminaire. Plus l'intensité est élevée, plus le rayon est grand; l'intensité du courant est fonction de l'inverse du carré de la distance (Ranck 1975).

Pour les neurones de récompense, Fouriezos (Fouriezos and Wise 1984) a démontré que le rayon de stimulation supraliminaire peut être estimé par l'équation suivante :  $I = K \cdot r^2$  (où I = Intensité, K = une constante  $\approx 1\,300 \mu\text{Amp}/\text{mm}^2$ , r = rayon de stimulation). L'équation de Fouriezos prédit que le rayon est égal respectivement à 0,3 et 0,6 mm pour des pulsions de 0,2 et 0,8 mA. La validité de cette équation est soumise aux postulats suivants : i) chaque pulsion ne doit pas générer plus d'un potentiel d'action par axone; ii) la résistance autour de l'électrode doit être homogène et permettre une diffusion isotopique dans le rayon d'action de la stimulation et iii) la densité des neurones de récompense dans le rayon d'action de la stimulation doit être homogène.

Pour la plupart des phénomènes physiologiques induits par une stimulation électrique, et c'est particulièrement vrai pour le comportement, il est nécessaire d'induire un grand nombre de potentiels d'action pour observer une réponse. Ceci est réalisable en administrant la stimulation sous la forme d'une salve comprenant un certain nombre de pulsions. La salve a une durée fixe et le nombre de pulsions qu'elle contient est variable; plus il y a de pulsions par salve, plus le nombre de potentiels d'action induit est grand. Puisque la durée de chaque pulsion est très courte, un seul potentiel d'action est déclenché par neurone stimulé. Lorsque l'intensité des pulsions est fixe, le nombre de potentiels d'action déclenchés est donc fonction du nombre de pulsions par salve. Mais l'effet de récompense induit par la stimulation n'est pas l'unique résultat de l'induction de potentiels d'action à la pointe de l'électrode. Le signal (l'ensemble des potentiels d'action) se propage dans le circuit neuronal de la récompense par transmission synaptique. Quoique nos connaissances sur les propriétés physiologiques du circuit de récompense demeurent encore limitées, nous savons que le signal généré à la pointe de l'électrode est intégré quelque part dans le circuit. Gallistel (1974), a proposé le modèle du « *leaky integrator* » pour expliquer la relation entre la stimulation, soit le signal généré à la pointe de l'électrode, et l'effet de récompense qui en résulte; ce modèle fait une analogie avec un seau troué que l'on essaie de remplir avec un boyau d'arrosage. Pour remplir le seau, le débit d'entrée d'eau doit être supérieur au débit de sortie; on peut y verser une grande quantité d'eau en un temps très court ou une petite quantité en un temps plus long. On

peut dire que le plein constitue une intégration du versement d'eau dans le seau, mais que le plein est transitoire puisque l'eau fuit constamment. Il en est de même pour l'effet de récompense induit par la stimulation électrique; cet effet est transitoire, il se dissipe rapidement (le cerveau étant composé de structures non-isolées). Donc si l'on administre une courte salve de stimulation et que le délai entre chaque pulsion est fixe (i.e. fréquence de stimulation exprimée en Hertz (Hz)), le signal généré à la pointe de l'électrode doit être intense (on doit stimuler un grand nombre de neurones) pour induire un effet de récompense. Si la salve est longue, il y a plus de pulsions, donc l'intensité requise (le nombre de neurones stimulés) pour induire la récompense est plus faible. Cependant, si l'on calcule la charge totale, soit le produit du nombre pulsions, de leur durée et de leur intensité en mA, on observe qu'elle est fonction de la durée de la salve : plus la salve est longue plus la charge totale est grande. Il y a donc une perte d'efficacité de la stimulation, tout comme il y a une perte d'eau dans le seau. Par une série d'expériences réalisées afin de tester la validité du modèle d'intégration, Gallistel a démontré que l'amplitude de l'effet de récompense induit par la stimulation électrique du faisceau médian prosencéphalique est, comme nous l'avons mentionné précédemment, fonction du nombre de pulsions par salve mais dans les conditions suivantes : l'intensité des pulsions (en mA), la durée des pulsions et la durée de la salve doivent être constantes. Aussi une condition additionnelle vient s'ajouter pour que cette conclusion soit valide. Le comportement d'autostimulation intracérébrale consiste à entraîner un

animal à s'autoadministrer la stimulation; en général, il est libre de s'autoadministrer autant de salves qu'il le désire. Dans cette condition, l'intervalle de temps entre la fin d'une première salve et l'arrivée d'une seconde va dépendre de la rapidité avec laquelle il produit la réponse opérante; plus la réponse sera rapide, plus cet intervalle sera court. Il est donc possible qu'il y ait une sommation du signal entre les salves consécutives, une sommation qui viendrait invalider la fonction qui lie l'intensité de l'effet de récompense au nombre de pulsions par salve. Cette hypothèse a été vérifiée par Fouriez (1995) et il a montré que lorsque les salves se succèdent à un intervalle de moins de 600 ms, il y a une sommation de l'effet de récompense entre celles-ci. Ces résultats montrent que si la salve dure 400 ms et que l'animal émet une réponse par seconde, il n'y a pas de sommation entre les salves; l'effet de récompense est uniquement dû au nombre de pulsions par salve. Cependant si l'animal émet deux réponses par seconde, une salve arrivera 100ms après la fin de la précédente et il y aura une sommation entre les salves. Dans cette condition, l'effet de récompense n'est pas uniquement dû au nombre de pulsions par salve. Pour éviter ce problème, Boye et Rompré (1996) ont proposé d'ajouter un intervalle de 600 ms à la fin de la salve, un intervalle pendant lequel la réponse opérante ne peut activer le stimulateur; une seconde salve ne peut pas arriver plus tôt que 600 ms après la fin de la première même si l'animal répond très rapidement. Cette condition assure que l'intensité de l'effet de récompense dépend uniquement du nombre de pulsions par salve et que cette relation n'est pas contaminée par la vitesse à laquelle l'animal répond.

### **Prototype expérimental du modèle d'autostimulation intracérébrale (ASI)**

Suivant la théorie du conditionnement opérant, l'animal est placé dans une boîte de Skinner où se trouve un levier. Un appui sur le levier déclenche un stimulateur électrique qui envoie une salve de stimulation. La méthode de façonnement (*shaping*) est utilisée pour apprendre à l'animal à activer le stimulateur en appuyant sur le levier; cette méthode consiste à lui administrer une stimulation dès qu'il se trouve près du levier, qu'il le renifle et qu'il le touche. Tel que prédit par la théorie de Skinner, si la stimulation agit comme un renforcement positif, le comportement de l'animal sera dirigé vers le levier et le nombre de réponses sera augmenté. Une fois que la réponse opérante est apprise, on entraîne l'animal à répondre pendant des essais de 60 secondes espacés d'une période de repos. Au début de chaque essai, on administre une stimulation d'amorce qui consiste en des salves de stimulation (5 ou 10) non contingentes, à raison d'une par seconde; après la dernière salve, on enregistre le nombre de réponses opérantes pendant la période d'essai. Au cours des années qui ont suivi la découverte du comportement d'autostimulation intracérébrale, les chercheurs ont mesuré le nombre de réponses par essai à des fréquences (nombre de pulsions par salve) et intensités fixes. Cette méthode s'est avérée problématique, car l'on sait que le nombre de réponses n'est pas une fonction monotone de l'intensité<sup>1</sup> de la stimulation. En effet, si l'on trace une courbe à partir du nombre de réponses mesurées à plusieurs fréquences différentes (les autres paramètres étant

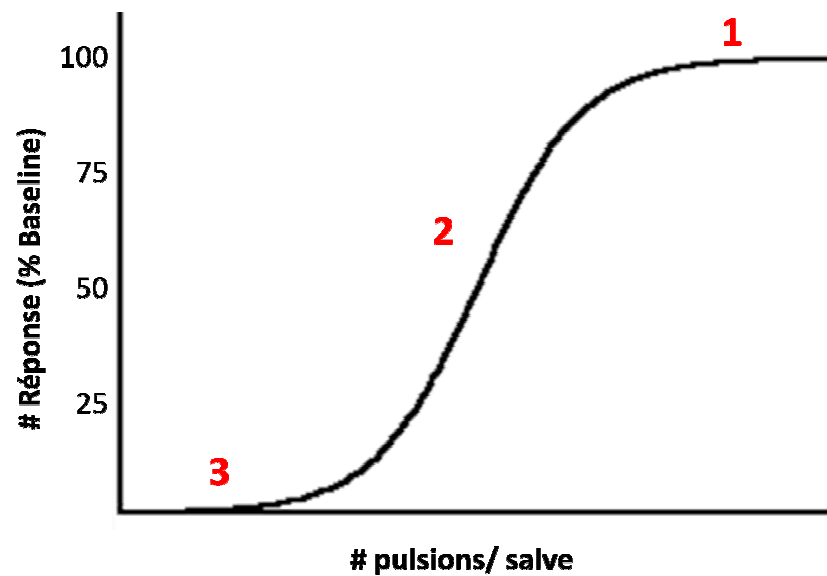
---

<sup>1</sup> L'Intensité réfère à l'amplitude de la stimulation et non à l'intensité en mAmp. des pulsions. L'emploi du terme Intensité réfèrera dorénavant à cette définition.

constant) on obtient une fonction qui a la forme d'une sigmoïde (voir paragraphe suivant). La forme de la relation entre la fréquence et le nombre de réponses met en lumière le manque de validité de construit de cette méthodologie; elle explique, en partie, le nombre important de faux négatifs dans les études portant sur la topographie des neurones de récompense (Miliaressis, Rompré et al. 1982) et la divergence des résultats sur leurs propriétés physiologiques (Yeomans and Davis 1975) et pharmacologiques (Rompre and Wise 1989).

Pour pallier à cette lacune méthodologique, on doit donc mesurer le nombre de réponses sur une large gamme de fréquences. Il faut rappeler que le modèle d'intégrateur de Gallistel demande que la variable indépendante soit la fréquence et que les autres paramètres de stimulation soient fixes. De façon pratique, on débute en enregistrant le nombre de réponses par essai (exemple 60 secondes) à une fréquence élevée; chaque essai est suivi d'une pause (exemple 15 secondes). Ensuite un nouvel essai débute avec une fréquence inférieure à la précédente, et ainsi de suite. À partir des mesures obtenues, on trace la courbe décrivant le nombre de réponses par essai en fonction de la fréquence (courbe réponse/fréquence ou R/F). Un exemple fictif est illustré à la Figure 1.



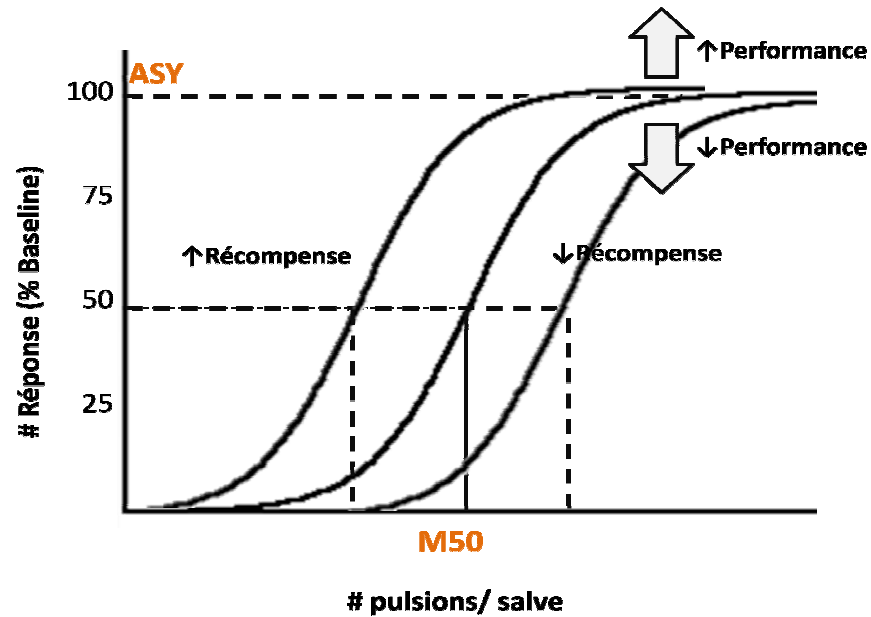


**Figure 1.** Exemple théorique d'une courbe R/F. La zone 1 correspond aux fréquences (# pulsions/salve) où le taux de réponses est maximal. La zone 2 représente la portion de la courbe où l'effet renforçant de la stimulation électrique est fonction de la fréquence et la zone 3 représente les fréquences pour lesquelles l'effet renforçant est insuffisant pour induire une réponse opérante.

En partant de la droite vers la gauche, on observe que le nombre de réponses est d'abord maximal (zone 1) et qu'ensuite il décroît (zone 2) progressivement pour atteindre un plancher (zone 3). Le plateau inférieur (zone 3) est observé à des fréquences qui ne déclenchent pas suffisamment de potentiels d'actions pour induire un signal de récompense supraliminaire ou suffisant pour que l'animal réponde. La phase dynamique (partie 2) de la courbe R/F correspond à l'intervalle de fréquences de stimulations qui produisent un signal de récompense supraliminaire et croissant. Finalement, à partir d'une fréquence élevée, la réponse atteint un niveau plafond, l'animal répond le plus rapidement qu'il le peut; on nomme ce plateau (partie 1) l'asymptote (ASY). L'asymptote

est vraisemblablement associée à la performance de l'animal, c'est-à-dire que même si la fréquence de la stimulation électrique est davantage augmentée, l'animal a atteint le maximum de sa performance et est physiquement incapable de produire une plus grande quantité de réponses opérantes. Miliareisis et Malette (1987) ont montré que l'asymptote n'est pas due à une saturation de l'effet de récompense; ceci est important pour la validité du modèle du déplacement de la courbe.

À partir de ces observations, Edmonds et Gallistel (1974) ont proposé un paradigme permettant de quantifier l'effet de récompense, ce que l'on peut aussi nommer « efficacité de renforcement de la stimulation » ; il s'agit du paradigme du déplacement de la courbe (*Curve-shift paradigm*). Des courbes R/F sont tracées avant et après un traitement puis l'on quantifie le déplacement vertical et latéral de la courbe (Voir Figure 2).



**Figure 2.** Paradigme du déplacement de la courbe R/F. Un déplacement vers la gauche (i.e. vers un nombre de pulsions inférieur) signifie une augmentation de la récompense (i.e. une diminution de l'index M50, voir le texte pour plus de détails) et un déplacement vers le haut est traduit par une augmentation de la performance de l'animal (ASY). Un déplacement vers la droite ou vers le bas reflète l'opposé, une atténuation de la récompense et de la performance.

Le déplacement vertical est quantifié en divisant le nombre de réponses maximales mesurées après le traitement par celui mesuré avant le traitement (on peut le multiplier par 100 pour obtenir un pourcentage, ASY%). Une valeur inférieure à 100 indique que le traitement a atténué la capacité de l'animal à produire la réponse. Miliareisis et coll. (1986) ont adapté la méthode du déplacement de la courbe au comportement d'ASI dans une boîte de Skinner et ont montré que l'administration d'un relaxant musculaire et une augmentation de la force requise pour activer le levier réduisent l'ASY. Le déplacement latéral est quantifié par la mesure du M50, c'est-à-dire la fréquence requise pour induire

un nombre de réponses égal à 50% du nombre de réponses maximales; la valeur M50 mesurée après le traitement est divisée par celle mesurée avant le traitement et le rapport est multiplié par 100 (M50%). Une valeur inférieure à 100 indique que l'effet de récompense a été amplifié par le traitement; après le traitement, l'animal a répondu à des fréquences qui n'induisaient peu ou pas de réponse avant. À l'opposé, une augmentation de la valeur M50 au-delà de 100 (i.e. un déplacement vers la droite de la courbe R/F), montre qu'il faut générer plus de potentiels d'actions (i.e. augmenter la fréquence) pour induire le même niveau de récompense; cela indique que le traitement a atténué l'effet de récompense.

Rappelons que plus l'intensité du courant est grande, plus le rayon de stimulation est étendu, et que la stimulation électrique active tous les neurones localisés dans le rayon supraliminaire peu importe leur fonction. Lors de l'interprétation des résultats obtenus par la méthode du déplacement de la courbe, il est important de prendre en considération le fait que le comportement observé est dû à la somme de neurones stimulés et non seulement à ceux qui induisent un renforcement positif. Selon certains chercheurs, cela peut devenir problématique, surtout lorsqu'on stimule un site situé près d'une région du cerveau connue pour être fortement innervée par des neurones qui contrôlent la motricité. Dans le mésencéphale postérieur, par exemple, les neurones de récompense sont situés sur la ligne médiane et côtoient ceux du faisceau longitudinal médian qui contrôlent les mouvements d'orientation de la tête. Il arrive qu'un

mouvement latéral accompagne la réponse opérante si l'électrode est légèrement latérale à la ligne médiane. Afin de s'assurer qu'un changement du seuil de récompense (M50) n'est pas un artefact causé par les réactions motrices engendrant un changement de performance, Miliareisis et Rompré (1987) ont mesuré l'impact d'un mouvement moteur sur la valeur M50. Les résultats démontrent que le mouvement moteur atténue l'ASY mais a peu d'effet sur la valeur M50. De plus, Boye et Rompré (1996) ont montré que l'ajout d'un intervalle fixe à la fin de la salve réduit l'impact d'une réduction de la performance sur la valeur M50. Mais ces conditions expérimentales ne permettent pas d'éliminer totalement l'impact d'un changement d'ASY sur la valeur M50. Dans le cas où un traitement produit une augmentation de 10 à 20% de la valeur M50 qui est accompagnée d'une réduction importante, au-delà de 60-80%, de l'ASY, il serait hasardeux d'inférer que le déplacement de la courbe est dû à une atténuation de la récompense (Miliareisis and Rompré 1987; Fouriezos, Bielajew et al. 1990).

### **Validité du modèle d'autostimulation intracérébrale : comparaison aux récompenses naturelles**

La découverte du comportement d'autostimulation électrique intracérébrale a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence dans le cerveau de neurones de récompense activés par des récompenses naturelles. Pour tester cette hypothèse, il suffirait d'enregistrer l'activité électrique de ces neurones en présence et en l'absence d'une récompense naturelle. Cette expérience n'est actuellement pas réalisable parce que ces neurones

n'ont pas été identifiés. Conover et Shizgal (1994) ont utilisé une approche indirecte. Ils ont comparé les effets d'une récompense naturelle, le sucre, à ceux de la récompense induite par la stimulation électrique du faisceau médian prosencéphalique (MFB ou *medial forebrain bundle*, voir section suivante) chez le rat. Les résultats démontrent que lorsqu'il a le choix entre le sucre ou la stimulation électrique, l'animal choisit la récompense qui a la plus forte valence indépendamment de sa nature. C'est-à-dire qu'il préfère une solution très sucrée à une stimulation à basse fréquence (peu renforçante) et vice-versa. Cela suggère que les deux récompenses sont évaluées par un système de régulation commun. Afin de voir si l'autostimulation intracérébrale est un agoniste de la récompense naturelle, c'est-à-dire que l'ASI peut remplacer le sucre, l'animal recevait à la fois le sucre et la stimulation électrique, mais dans un ratio inversé. C'est-à-dire qu'il recevait soit une solution faible en sucre et une stimulation de haute fréquence, ou une solution très sucrée et une stimulation de basse fréquence. Les résultats démontrent que dans les deux situations les taux de réponse sont les mêmes, ce qui suggère que la récompense induite par la stimulation électrique peut remplacer la récompense naturelle. Ces résultats permettent de conclure que la stimulation électrique et la récompense naturelle activent le même circuit neuronal. Ceci démontre que le comportement d'ASI est un modèle valide pour étudier les substrats de la récompense et ses désordres associés.

### **Substrat nerveux de l'autostimulation intracérébrale**

À partir des cartes topographiques des sites d'ASI établies depuis la découverte de Olds et Milner (1954), les chercheurs ont tenté d'identifier les neurones de récompense. Les premières cartes ont révélé que la topographie des sites d'ASI correspondait à celle des neurones catécholaminergiques. En outre, les projections ascendantes de ces neurones passent par l'hypothalamus latéral et le faisceau médian prosencéphalique, le site de stimulation le plus ciblé dans les études sur l'ASI. Ces observations ont mené à l'hypothèse catécholaminergique de l'ASI (German and Bowden 1974). Cette hypothèse était aussi soutenue par le fait que certaines substances que s'autoadministrent les toxicomanes, l'amphétamine et la cocaïne sont des agonistes des catécholamines. L'amphétamine et la cocaïne accélèrent la réponse opérante dans l'ASI (Wise 1978) alors que des antagonistes indirects comme l'alpha-méthyle-para-tyrosine et la réserpine l'atténuent. Des études plus récentes réalisées avec la méthode du déplacement de la courbe ont montré que les agonistes et les antagonistes dopaminergiques, et non noradrénergiques, amplifient et atténuent sélectivement la récompense induite par la stimulation électrique intracérébrale (Wise and Rompré 1989) démontrant ainsi que les neurones dopaminergiques pouvaient constituer les neurones de récompense. Mais cette hypothèse a été remise en question. En effet, des études psychophysiques réalisées en stimulant un ou deux sites le long du faisceau médian prosencéphalique ont révélé que les neurones de récompense possèdent des caractéristiques physiologiques et anatomiques

différentes de celles des neurones dopaminergiques. Les neurones de récompense ont une période réfractaire d'une durée de 0,4 à 1,2 msec, des valeurs deux à trois fois plus courtes que celles des neurones à dopamine (Yeomans and Davis 1975; Shizgal, Bielajew et al. 1980; Gallistel, Shizgal et al. 1981). La propagation de l'influx nerveux le long des axones des neurones de récompense est 2 à 16 fois plus rapide que la propagation de l'influx nerveux le long des axones dopaminergiques (Shizgal, Bielajew et al. 1980). Enfin Bielajew et Shizgal (1986) ont montré que le signal de récompense induit par la stimulation du faisceau médian prosencéphalique se propage dans la direction rostro-caudale, une direction opposée à celle des voies de projection des neurones dopaminergiques. L'ensemble de ces résultats indique que l'ASI est médiée par un circuit à plusieurs étapes comprenant des axones myélinisés qui projettent vers le mésencéphale et des neurones dopaminergiques constituant un intermédiaire direct ou indirect (Yeomans 1989).

Des études de topographie effectuées au moyen de la méthode du déplacement de la courbe ont montré que les neurones de récompense sont présents, ou envoient des projections, en forte densité dans le mésencéphale postéro-médian au niveau rostro-caudal des noyaux du raphé dorsal et du raphé médian (Rompré and Miliareisis 1985; Rompré and Boye 1989); il existe une bande de sites positifs pour l'ASI située sur un axe antéropostérieur entre l'aire tegmentale ventrale (ATV) et le mésencéphale postérieur (MP). En appliquant la méthode de stimulation à doubles pulsions sur deux sites d'ASI



distincts, Boye et Rompré (1996) ont montré que les neurones de récompense localisés dans le MP passent par l'ATV. Ces résultats sont d'un intérêt particulier, car l'ATV est une région mésencéphalique qui contient des neurones dopaminergiques; il est donc possible que les neurones de récompense localisés dans le MP établissent des liens fonctionnels avec les neurones dopaminergiques dans l'ATV. Des résultats électrophysiologiques et neurochimiques sont venus renforcer cette hypothèse. En effet, Rompré et Moisan (1998) ont montré que la stimulation électrique du MP active une sous-population de neurones dopaminergiques<sup>2</sup> mésencéphaliques et que cette activation est fonction de l'amplitude de la récompense induite par la stimulation. Au moyen de la technique de marquage de la protéine Fos par immunohistochimie, un indice de l'activité cellulaire, Marcangione et Rompré (2008) ont montré que la récompense induite par la stimulation du MP active des neurones de l'ATV et des neurones localisés dans des noyaux du système limbique qui reçoivent une innervation dopaminergique issue de l'ATV. L'ensemble de ces résultats permet de tracer un portrait du circuit neuronal de la récompense; ce portrait comprend des neurones qui voyagent dans le MP et le diencephale ventro-latéral, passent par l'ATV et établissent des liens fonctionnels avec des neurones de l'ATV dont certains sont des neurones présumés dopaminergiques qui projettent vers des noyaux du système limbique localisés dans le prosencéphale ventral. Un portrait similaire a été proposé par Yeomans deux décennies plus tôt (Yeomans 1989); ce portrait comprend des neurones du noyau

---

<sup>2</sup> Le phénotype dopaminergique n'a pas été confirmé par marquage neurochimique. Donc il s'agit de neurones présumés dopaminergiques.

pédunculo-pontin qui reçoivent des afférences des neurones de récompense diencephaliques et qui établissent des liens fonctionnels avec des neurones dopaminergiques dans l'ATV. Il est possible que les neurones du noyau pédunculo-pontin passent par le mésencéphale médian avant d'établir des liens avec les neurones de l'ATV. En effet, Boye *et al.* (2002) ont montré que des neurones du tegmentum pontin ayant des propriétés physiologiques (i.e. période réfractaire, vitesse de propagation de l'influx nerveux) similaires à celles des neurones de récompense sont activés de façon antidromique par la stimulation électrique du MP et de l'ATV. Néanmoins, les résultats d'études de lésion montrent que des lésions électrolytiques du tegmentum pontin latéral ont peu d'effet sur la récompense induite par la stimulation électrique de l'ATV et du faisceau médian prosencéphalique (Waraczynski, Perkins *et al.* 1999; Boye 2005), des résultats qui sont, à première vue, en désaccord avec les portraits du circuit neuronal de la récompense décrits ci-haut. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer si le circuit était composé de neurones très ramifiés, avec des projections diffuses, dans le MP, une hypothèse proposée initialement par Boye sur la base de ses résultats (2005).

### **L'aire tegmentaire ventrale : rôle dans la récompense**

L'aire tegmentaire ventrale, structure mésencéphalique décrite par Tsai en 1925, est la structure afférente principale du système limbique; elle a longtemps été identifiée comme étant la continuité de la substance noire parce que ses limites anatomiques n'étaient pas

clairement définies. La définition la plus récente propose une division de l'aire tegmentale ventrale en quatre parties; l'aire parabrachiale pigmentée (PBP) et le noyau paranigral (PN) (Phillipson 1979) qui possèdent une forte densité de neurones dopaminergiques (la voie mésolimbique, A10) envoyant des projections au striatum, ainsi que l'aire *rétroflexus parafasciculus* (PFR) et la queue du tegmentum ventral, qui sont plutôt constitués d'un mélange de neurones non-dopaminergiques, principalement glutamatergiques et GABAergiques (Ikemoto 2007). Une partie de ces neurones non-dopaminergiques sont des neurones de projection, les autres établissent des contacts synaptiques locaux avec des neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques et participent à la régulation intrinsèque de l'ATV (Dobi, Margolis et al. 2010). Il est important de noter que l'inclusion ou non de la queue de l'ATV, aussi connue sous le nom de tegmentum rostromédian (RMTg) comme étant une partie intégrale de l'ATV demeure toujours sujet à débat, car sa composition est majoritairement GABAergique et son rôle potentiel dans l'intégration des stimuli aversif le distingue largement du reste de l'ATV; certains proposent que le RMTg soit plutôt traité comme une structure afférente à l'ATV. En effet, comme nous y reviendrons à la discussion, le RMTg semble inhiber la transmission dopaminergique de l'ATV suite à l'exposition à un stimulus aversif. Toujours en lien avec sa fonction dans l'effet de renforcement positif, les éléments dopaminergiques de l'ATV envoient des projections au noyau *accumbens* (NAcc), connues pour réguler l'effet plaisant de la récompense et envoient aussi des projections au cortex préfrontal (CPF) qui sont plutôt

associées à la mémoire dans l'apprentissage de la récompense. Cette voie est souvent étudiée conjointement à la voie nigrostriée (A9) qui prend origine dans la substance noire *pars compacta* (SNc) et qui est surtout responsable de la motricité qui permet d'engager les comportements dirigés.

### **La voie dopaminergique mésolimbique**

La dopamine fait partie de la classe des catécholamines, elle est synthétisée à partir d'un acide aminé non essentiel, la tyrosine. La tyrosine est hydroxylée sous l'action de la tyrosine hydroxylase (TH) ce qui forme de la L-Dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). La L-DOPA est décarboxylée sous l'action de la DOPA décarboxylase pour former de la dopamine. Il est pertinent de mentionner que la dopamine est un précurseur pour la noradrénaline, cette dernière étant le produit de l'hydroxylation de la dopamine par la dopamine-bêta-hydroxylase; les neurones à dopamine ne produisent pas cette enzyme. La dopamine est stockée, par transport actif, via le *vesicular monoamine transporter* (VMAT) dans des vésicules synaptiques. Une fois relâchée, la dopamine peut soit être recaptée par la protéine de recapture (dopamine transporter ou DAT) ou dégradée par la monoamine oxydase (MAO) ou la catéchol-O-méthyl transférase (COMT). Elle peut aussi activer des récepteurs pré- et post-synaptiques. Il y a deux familles de récepteurs dopaminergiques : la famille des D<sub>1</sub> qui comprend les récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>5</sub> et la famille D<sub>2</sub> qui comprend les récepteurs D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub>. Tous ces récepteurs sont métabotropiques, c'est-à-dire couplés à une protéine G (RCPG). Les récepteurs de type D<sub>1</sub> stimulent l'adénylate cyclase tandis que

les D<sub>2</sub> l'inhibent. Les récepteurs de la famille D<sub>2</sub> sont aussi des autorécepteurs, ils sont présents à la surface de la membrane cellulaire des terminaisons nerveuses, du corps cellulaire et des dendrites. Les autorécepteurs somato-dendritiques servent à contrôler négativement le taux de décharge des neurones dopaminergiques alors que les autorécepteurs terminaux contrôlent la synthèse et l'exocytose de la dopamine.

### **Régulation et dérégulation dopaminergiques dans la récompense**

Une excellente façon d'illustrer le rôle essentiel que jouent les neurones de la voie mésolimbique dans la récompense est par les propos de Wolfram Schultz qui, lors d'un exposé en novembre dernier à l'Université de Montréal, posa la question : « Pourquoi avons-nous un cerveau? À cela les gens ont répondu : Pour bouger. Mais pourquoi devons-nous bouger dit-il? Pour fuir en cas de danger, mais aussi pour se nourrir, s'abreuver et se reproduire ». Le point commun à toutes ces réponses est qu'elles sont associées à des comportements de survie. L'impulsion et la motivation associées à ces comportements dirigés proviennent de l'effet de récompense ou de satisfaction qu'ils procurent. C'est l'apprentissage du plaisir qu'apporte une action qui fait que l'on tend à reproduire cette action dans le futur. Quoique vitale, la récompense est aussi fortement associée aux psychopathologies reliées au plaisir telles l'abus de substance (i.e. hypersensibilité au plaisir) ou la dépression (i.e. hyposensibilité au plaisir).

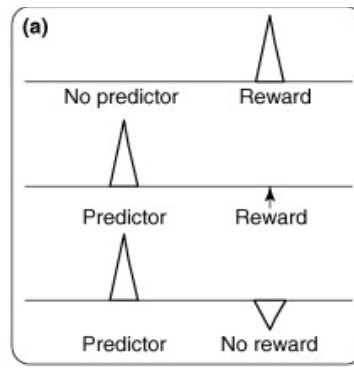
### La prédiction de la récompense

Cette théorie est soutenue par les observations de Schultz quant à la régulation des modes de décharges dopaminergiques (1998). En effet, les éléments dopaminergiques ont des propriétés électriques particulières, soit l'alternance entre deux modes de décharge; tonique et phasique. Le mode tonique est lent, continu et irrégulier tandis que le mode phasique se manifeste par la décharge de la dopamine en bouffée. Les études menées par Schultz *et al.* (1998) montrent que ces fluctuations de la transmission dopaminergique ne contingentent pas la récompense, mais bien la différence entre l'ampleur de la récompense et l'attente de cette récompense (*reward-prediction error*), qui est décrite par la relation suivante :

$$\text{Réponse dopaminergique} = \text{récompense reçue} - \text{récompense attendue}$$

Cela signifie qu'un stimulus conditionné, un stimulus associé à une récompense, peut générer une réponse dopaminergique d'aussi grande amplitude qu'une récompense inattendue. Ainsi pour qu'une récompense précédée d'un stimulus entraîne un mode de décharge phasique de la dopamine, cette récompense doit être d'une valence égale ou supérieure à celle qui n'était pas anticipée, un effet qui dépend aussi du délai entre le stimulus et l'obtention de la récompense attendue. Enfin, si la récompense attendue suite à un stimulus qui prédit l'arrivée d'une récompense n'a pas lieu, la réponse dopaminergique diminue (Figure 3; Schultz 1998). Chaque récompense ou stimuli est important dans l'apprentissage, car cet apprentissage consiste en une continuelle mise-à-

jour des erreurs de prédiction de la récompense qui sont encodées par les neurones dopaminergiques.



**Figure 3.** Modèle du *reward-prediction error* tel que proposé par Schultz. Le trait horizontal représente les variations du taux de décharge d'un neurone à dopamine. Source: Schultz, W., *Behavioral dopamine signals*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 203-10.

Le mode de décharge tonique est maintenu par un mécanisme intrinsèque un peu comme le battement cardiaque, tandis que le mode de décharge phasique est dépendant des signaux afférents. Des enregistrements de l'activité des neurones dopaminergiques montrent que le renforcement entre un stimulus et une récompense est associé à l'amplitude de la décharge phasique des éléments dopaminergiques de l'ATV (Schultz 1998). La transition entre les deux modes de décharge semble dépendante de l'influx afférent glutamatergique et cholinergique provenant du tegmentum latérodorsal (LTDg) et du pédonculo-pontin (PPTg) (Grace, Floresco et al. 2007).

## Régulation glutamatergique de la récompense

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur dans le système nerveux central; il est présent dans plusieurs structures corticales et sous-corticales qui envoient des afférences vers l'ATV. Les afférences glutamatergiques à l'ATV proviennent principalement du CPF (Carr and Sesack 2000), de l'*habenula* latérale (Omelchenko, Bell et al. 2009), et du LTDg (Omelchenko and Sesack 2005); les neurones de chaque noyau d'origine établissent des liens synaptiques avec des neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques. Les afférences glutamatergiques du CPF sont liées par des synapses à des neurones dopaminergiques qui projettent au cortex préfrontal et à des neurones GABAergiques qui projettent au noyau *accumbens*. Celles du LTDg sont liées par des synapses à des neurones dopaminergiques et GABAergiques qui projettent au cortex préfrontal et à des neurones dopaminergiques qui projettent au noyau *accumbens*.

Synthétisé à partir de la glutamine ou du glucose, le glutamate, tout comme les monoamines, est stocké dans des vésicules via le *Vesicular Glutamate Transporter* (VGlut) et est ensuite relâché par exocytose. Il y a trois types de VGlut qui ont été identifiés dans le système nerveux central et qui sont présents dans les terminaisons glutamatergiques dans l'ATV. Le VGlut1 est localisé dans les afférences corticales comme le cortex préfrontal, le VGlut2 est dans les afférences glutamatergiques sous-corticales comme l'*habenula* latérale et enfin le VGlut3 qui se trouve dans les éléments nerveux qui ne sont pas uniquement glutamatergiques et qui sont donc susceptibles de participer à une co-



transmission synaptique. L'identification de ces transporteurs constitue d'ailleurs un outil de choix pour étudier la transmission glutamatergique; la catégorisation de trois différents transporteurs permet d'avoir une perspective sur l'origine des afférences et sur leur nature (i.e. glutamatergique ou non-glutamatergique).

En plus de former des synapses asymétriques sur les éléments dopaminergiques et non-dopaminergiques de l'ATV, des études de double marquage pour la dopamine (via un marquage pour la TH) et le glutamate (via un marquage des VGluts) ont révélé la présence de neurones de projections et d'interneurones strictement glutamatergiques ( $TH^+/VGlut^+$ ) (Yamaguchi, Sheen et al. 2007). Aussi, de plus en plus d'études mettent en évidence que l'apprentissage de la récompense est plutôt le résultat d'une co-transmission synergique de dopamine et de glutamate ( $TH^+/VGlut^+$ ) au striatum, proposant ainsi la capacité de libération de ces 2 neurotransmetteurs par un même élément nerveux (Lapish, Seamans et al. 2006).

### **Les récepteurs glutamatergiques de type N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA)**

Le glutamate lie deux types de récepteurs; les métabotropiques et les canaux ioniques voltage-dépendants. Cette dernière catégorie comprend 3 principaux canaux : Kainate, acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque (AMPA) et N-méthyl-D-Aspartate (NMDA). Les canaux Kainate et AMPA sont aussi appelés les canaux à transmission rapide, car aussitôt qu'ils sont activés ils laissent passer un influx sodique menant à une dépolarisation membranaire.

Les canaux NMDA sont aussi excitateurs, mais leur action est plus lente que les AMPA et les Kaïnate. Le délai d'activation du récepteur est dû à la présence d'un ion magnésium qui bloque l'ouverture du canal, et cela indépendamment de la concentration en glutamate. Lorsque la membrane postsynaptique est dépolarisée, l'ion magnésium est expulsé hors du canal NMDA et celui-ci s'ouvre. Une fois ouvert, en plus de laisser passer le sodium, le canal NMDA a la particularité d'être perméable aux cations divalents et il génère un influx calcique. Ainsi, pour s'activer, le canal NMDA requiert non seulement la présence de glutamate, mais aussi une dépolarisation préalable via les canaux AMPA. À ces particularités s'ajoutent des sites de modulations allostériques. Tout d'abord, le récepteur NMDA possède un site de liaison pour la glycine qui est essentiel à l'ouverture du canal. Ensuite, il y a un site de liaison des polyamines qui, lorsqu'occupé, augmente l'affinité de la glycine pour son site de liaison. Enfin, un ion Zinc doit être libéré de la structure du canal pour que celui-ci soit complètement actif (Dingledine, Borges et al. 1999).

L'influx calcique généré par l'ouverture des canaux NMDA est essentiel à la neuroplasticité et à la formation de nouvelles connexions. Ce phénomène est connu sous le nom de potentialisation à long-terme (*Long-term potentiation*, LTP). Lorsque la concentration calcique intracellulaire atteint un seuil, plusieurs cascades enzymatiques sont activées, les plus importantes sont les kinases calcium-dépendantes (CamKII), les protéines kinases C (PKC) et la voie des kinases associées à la mitose (MAPK). Une fois que ces voies sont activées, la LTP est induite, peu importe que le canal NMDA reste ouvert ou se referme.

Les cascades de phosphorylations ont pour résultat d'activer la transcription cellulaire permettant la croissance des dendrites. De plus, lors de la LTP, il y a un recyclage des récepteurs AMPA à la surface; ce qui a pour effet d'alimenter et d'amplifier la LTP en activant plus de canaux NMDA (Dingledine, Borges et al. 1999). Une hypothèse bien connue, mais qui demeure toujours sujet à débat est que la plasticité neuronale LTP-dépendante est à la base de l'apprentissage et de la croissance neuronale. Ainsi, une hypofonction des récepteurs NMDA peut entraîner des troubles de la mémoire; une conséquence qui est bien illustrée par l'amnésie causée par la consommation de phénylcyclidine (PCP), une drogue d'abus antagoniste des récepteurs NMDA. Dans le cas opposé, une hyperfonction des récepteurs NMDA a un effet neurotoxique causé par un influx massif de calcium qui entraîne la mort cellulaire; ce qui restreint d'ailleurs l'utilisation d'agonistes glutamatergiques.

### **Implications des récepteurs NMDA dans la récompense**

Plusieurs études visant à décrire les rôles des récepteurs de type NMDA dans l'ATV sur la transmission dopaminergique et sur l'apprentissage de la récompense ont été effectuées et deux conclusions majeures en ressortent et s'opposent. Certaines études rapportent que l'activation des récepteurs glutamatergiques de l'ATV à l'aide d'injection d'agonistes entraînent une augmentation de la transmission dopaminergique au striatum (Karreman, Westerink et al. 1996; Westerink, Kwint et al. 1996), tandis que d'autres montrent que la récompense et les comportements dirigés sont plutôt augmentés suite à l'injection

d'antagonistes glutamatergiques et que cet effet est dépendant (Herberg and Rose 1989; Narayanan, Willins et al. 1996; David, Durkin et al. 1998) ou non de la neurotransmission dopaminergique (Harris, Wimmer et al. 2004; Clements and Greenshaw 2005). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par le fait qu'il y a des connections glutamatergiques monosynaptiques sur les éléments dopaminergiques et non-dopaminergiques. Le glutamate, par une action directe sur les neurones dopaminergiques, peut générer ou amplifier un signal de récompense. Aussi, il peut activer des neurones GABAergiques qui inhibent les neurones dopaminergiques; cet effet pourrait bloquer ou atténuer le signal de récompense (Omelchenko, Bell et al. 2009).

### **Assemblage des récepteurs NMDA**

Les canaux NMDA sont des hétéromères, généralement formés de quatre sous-unités (hétéro tétramères). Jusqu'à maintenant, trois types de sous-unités ont été identifiés, les GluN1, les GluN2 et les GluN3 (aussi appelées NR1, NR22 et NR3). L'on retrouve huit variantes d'épissage fonctionnel pour la sous-unité GluN1 qui contient le site de liaison au glutamate, et le canal doit obligatoirement en contenir deux pour être fonctionnel (i.e. 2 sites de liaison glutamate) (Benveniste and Mayer 1991). Les propriétés physicochimiques des récepteurs NMDA sont donc déterminées par l'assemblage des deux autres sous-unités; celles-ci peuvent soit être des variantes de GluN2 (GluN2A/B/C/D), des variantes de GluN3 (GluN3A/B) ou simplement d'autres GluN1 (Dingledine, Borges et al. 1999). Bien que l'existence de trihétéromères contenant les sous-unités GluN1/GluN2A/GluN2B ne

soit pas encore acceptée à majorité, plusieurs études biophysiques, pharmacologiques et moléculaires en suggèrent la présence au niveau du MV (Luo, Wang et al. 1996; Cull-Candy, Brickley et al. 2001; Schilstrom, Yaka et al. 2006).

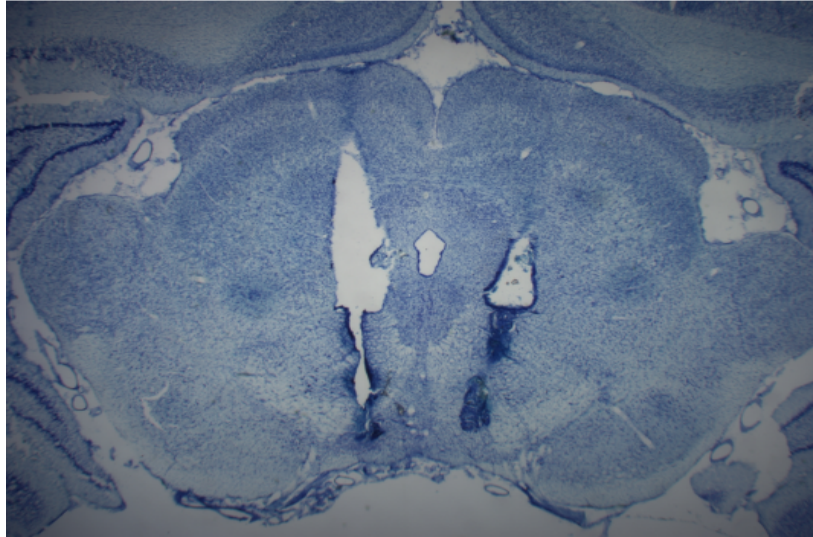
### **Étude des sous-unités GluN2A et GluN2B dans la récompense**

Une étude par immunomarquage a montré la présence de sous-unités GluN2A et GluN2B dans le prosencéphale, tandis que les sous-unités GluN2C et GluN2D sont plutôt restreintes au niveau du cervelet (Monyer, Burnashev et al. 1994). Une autre étude montre la présence de sous-unités GluN2A et GluN2B dans le mésencéphale (Wang, Bosy et al. 1995; Albers, Weiss et al. 1999). Bien que peu d'informations sont disponibles quant à la composition en sous-unité des récepteurs NMDA du mésencéphale ventral (MV), des études électrophysiologiques suggèrent que les neurones dopaminergiques de la substance noire expriment les sous-unités GluN2B et GluN2D (en plus petite quantité), mais pas de sous-unité GluN2A (Jones and Gibb 2005; Suarez, Zhao et al. 2010). Les récepteurs NMDA composés de la sous-unité GluN2A seraient principalement exprimés par des neurones non-dopaminergiques. Nous ne savons pas si ces caractéristiques s'appliquent aux neurones dopaminergiques du MV. Combinés au fait que les neurones dopaminergiques de l'ATV sont souvent considérés comme étant la continuité de ceux de la substance noire (SNc) et que les neurones des deux noyaux partagent un grand nombre de caractéristiques anatomiques, physiologiques et pharmacologiques communes (Kaufling, Veinante et al. 2009), il est possible d'émettre l'hypothèse que les neurones

dopaminergiques dans l'ATV expriment de façon prédominante les sous-unités GluN2B et GluN2D. Si cette hypothèse est valide, un antagoniste aux récepteurs GluN2B devrait inhiber l'action directe du glutamate sur les neurones dopaminergiques et atténuer la récompense. Si les récepteurs GluN2A sont localisés sur des neurones GABAergiques qui inhibent les neurones dopaminergiques, un antagoniste GluN2A devrait désinhiber les neurones dopaminergiques et amplifier la récompense.

### **Objectifs de l'étude**

La présente étude constitue donc une première tentative à déterminer le rôle des récepteurs NMDA du mésencéphale ventral composés des sous-unités GluN2A et GluN2B dans la récompense induite par la stimulation électrique du MP. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de différentes doses de R-CPP et de PPPA, des antagonistes qui possèdent une affinité plus élevée pour les récepteurs GluN2A que pour les GluN2B, 2C et 2D, et de Ro04-5595, un antagoniste préférentiel aux récepteurs GluN2B injectés bilatéralement dans le mésencéphale ventral (principalement au niveau de l'ATV)(Figure 4) sur la récompense induite par la stimulation électrique du MP. La méthode du déplacement de la courbe a été utilisée pour mesurer l'action des drogues sur la récompense et la performance.



**Figure 4.** Exemple de l'emplacement des canules guides et des canules d'injection qui dépassent de 2mm. Représentation macroscopique d'une coupe de MV (a-p. 5,6mm derrière bregma) d'épaisseur de 40 $\mu$ m colorée à la thionine (0.2%, dans formaline).

## Hypothèses

1. L'injection de R-CPP dans le MV va amplifier la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps.
  2. L'injection du PPPA dans le MV va amplifier la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps, et qui sera similaire à celui observé après l'injection de R-CPP.
  3. L'injection de Ro04-5595 dans le MV va atténuer la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps.
-



## **Résultats**

**Blockade of ventral midbrain NMDA receptors enhances brain stimulation reward: a preferential role for GluN2A subunits.**

Sabrina Bergeron and Pierre-Paul Rompré

Article en phase de soumission.

Date de soumission : 16 juillet 2012

Journal: Neuropsychopharmacology

Blockade of ventral midbrain NMDA receptors enhances brain stimulation reward:  
a preferential role for GluN2A subunits.

aSabrina Bergeron B. Sc. and a,bPierre-Paul Rompré Ph. D.

aDépartement de psychiatrie

Université de Montréal

Montréal(Québec), Canada, H3C 3J7

bFRSQ Research Group in Behavioral Neurobiology, Concordia University

Montréal, Québec, Canada, H4B 1R6

CORRESPONDANCE

Pierre-Paul Rompré  
Département de psychiatrie  
Université de Montréal  
Montréal, (Québec)  
Canada H3C 3J7

**ABSTRACT**

Ventral midbrain (VM) dopamine neurons that project to rostral limbic structures play a key role in reward and incentive motivation. It has been suggested that a reward-related signal is transmitted when the firing rate of VM dopamine neurons shifts from a tonic to a phasic mode. Since glutamate is necessary for initiation of this transduction process, it is likely that it plays a role in reward signaling. This study was aimed at determining the effect of VM N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) glutamatergic receptor blockade on reward induced by electrical brain stimulation.

Experiments were performed on male Long-Evans rats trained to self-administer an electrical stimulation in the medial posterior mesencephalon. Reward thresholds were measured with the curve-shift method before and after bilateral VM injections of the following NMDA receptor antagonists: R-CPP, 3-(R-2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, (0, 20.6, 41.2 and 82.5 pmol/0.5 $\mu$ l/side), PPPA, (2R,4S)-4-(3-Phosphonopropyl)-2-piperidinecarboxylic acid, (0, 0.825 and 1.65 nmol/0.5 $\mu$ l/side) or Ro04-5595, 1-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-methoxy-2-methyl-7-isoquinolinol hydrochloride (0, 0.825, 1.65 and 3.3 nmol/0.5 $\mu$ l/side).

R-CPP and PPPA produced a dose and time dependent decrease in reward threshold, an effect that was, at some doses and times after the injection, accompanied by an increase in maximum responses. These effects were not observed with Ro04-5595 over the range of doses tested. While previous studies suggest a role for glutamate in reward signaling, the present results rather show that VM glutamate exerts a tonic inhibition on the reward-relevant pathway. The selectivity of Ro04-5595 for NMDA receptors composed of GluN2B subunits and the higher affinity of R-CPP and PPPA for GluN2A suggest that the inhibition is mediated by receptors composed of GluN2A subunits.

Key words: Brain stimulation, Glutamate, NMDA, Reward, Ventral midbrain, VTA

## INTRODUCTION

It is well established that a population of dopamine neurons originating from the ventral midbrain (VM) and projecting to rostral limbic areas are part of a neural substrate that controls reward and incentive motivation. Dopamine dysfunctions are associated with psychiatric disorders characterized by emotional and motivational disturbances such as depression, drug addiction and schizophrenia. Most studies aimed at understanding the neural bases of these disorders focus on terminal regions but a dysfunction of dopamine neurotransmission may also originate from its afferent inputs. In effect, these neurons are under the control of numerous afferents originating from cortical and subcortical limbic regions, and from local interneurons that use glutamate and GABA as a neurotransmitter (Carr and Sesack 2000; Omelchenko, Bell et al. 2009; Dobi, Margolis et al. 2010). The induction of the phasic firing pattern of dopamine neurons, a mode that is associated with enhanced dopamine release (Gonon 1988), is under the control of glutamatergic afferents (Grace, Floresco et al. 2007). The rewarding value of a stimulus is signaled when firing of dopamine neurons shifts from a tonic to a phasic mode (Schultz 2007). This latter observation suggests that glutamate plays a key role in reward signaling. The modulatory role of glutamate is not restricted, however, to VM dopamine neurons. Other VM neurons establish synaptic connections with glutamatergic terminals that originate from limbic nuclei and local interneurons (Carr and Sesack 2000; Omelchenko, Bell et al. 2009; Dobi, Margolis et al. 2010). Some of these neurons are GABAergic neurons that exert a negative modulation on dopamine (see Grace, Floresco et al. 2007). Such a neural arrangement raises the possibility that glutamate may negatively modulate reward through activation of an inhibitory input to dopamine. Previous studies tend to support the existence of two opposite modulatory functions for glutamate. Activation of VM glutamate N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors increases ventral striatal dopamine release (Karreman, Westerink et al. 1996; Kretschmer 1999) and stimulates locomotor activity (Kretschmer 1999), but blockade of VM NMDA receptors also increases dopamine impulse flow and

release (French, Mura et al. 1993; Mathe, Nomikos et al. 1998). Consistent with the later effect, David et al. (1998) showed that mice self-administer the NMDA antagonist, AP-7, into the VM, a rewarding effect that is blocked by the selective dopamine D2-like antagonist, sulpiride. Blockade of VM NMDA receptors was also found to increase locomotor activity in a dopamine-dependent (Narayanan, Willins et al. 1996) and independent manner (Cornish, Nakamura et al. 2001). The opposite modulatory modes of NMDA receptors may be explained by a predominant action of the agonist and the antagonist on different VM neurons and/or on different subtypes of NMDA receptors. The NMDA receptor is composed of four sub-units, two obligatory GluN1 sub-units forming hetero or triheterotetramer with two of the following subunits, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A and/or GluN3B (McBain and Mayer 1994). Ventral midbrain contains mainly GluN2A, 2B and 2D subunits (Wang, Bosy et al. 1995) and some electrophysiological studies suggest that dopamine neurons express receptors composed of GluN2B or GluN2D but not GluN2A (Jones and Gibb 2005; Suarez, Zhao et al. 2010). On the basis of these findings, it can be hypothesized that glutamate exerts its positive and negative modulation of dopamine by acting on NMDA receptors composed of different sub-units.

The present study constitutes an initial attempt at testing this hypothesis. We investigated the effects of the VM NMDA receptor blockade on reward induced by electrical brain stimulation. Brain stimulation reward (BSR) is highly sensitive to changes in VM dopamine neurotransmission (Wise and Rompré 1989). Consistently, BSR induces an increase in VM dopamine cell firing (Moisan and Rompré 1998) and ventral striatal dopamine release (Hernandez and Shizgal 2009). Brain stimulation reward is also associated with an increase in VM glutamate release an effect that is prevented by VM infusion of tetrodotoxin (You, Chen et al. 2001). An increase in FOS immunoreactivity throughout the entire VM rostro-caudal extent is observed after BSR, suggesting that the

reward signals alter the activity of a large population of VM neurons (Marcangione and Rompre 2008).

The results obtained with the BSR paradigm show that VM microinjections of R-CPP, a preferential GluN2A/2B antagonist, enhances reward. This effect was reproduced by PPPA, another NMDA antagonist with a preferential action at GluN2A/2B receptors, but not by Ro04-5595, a selective GluN2B antagonist, hence suggesting that glutamate exerts an inhibitory effect on reward by acting on GluN2A receptors.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **ANIMALS**

Male Long-Evans (Charles River Canada) rats weighting between 300-350g at the time of surgery were used. They were housed 1 (after surgery) or 2 per cage in a temperature (22°C) and humidity (40%) controlled room with a 12h light/dark cycle (lights on 06:00). They were allowed to habituate for 5 to 7 days to the housing environment before surgery and had free access to food and water. All procedures were in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care and all efforts were made to minimize suffering and number of animals used.

### **SURGERY**

Rats were anaesthetized with isoflurane (2.5-3.5%, O<sub>2</sub> 0.6L/min) and placed on a stereotaxic apparatus. The surface of the skull was exposed between lambda and bregma and burr holes were made into the cranium at the point of insertion of the stimulation electrode and the guide cannulae. The stimulation electrode was made from a 0.27 mm stainless steel wire that was insulated with epoxy (except for the round tip) and connected to a male Amphenol connector; it was implanted into the postero-medial mesencephalon using the following flat skull coordinates: 7.6 mm posterior to bregma, 0.0 mm lateral and 6.8 mm below the surface of the skull. Electrical stimulation of this area activates reward-relevant axons that travel bilaterally through the VM, and increases dopamine cell firing and induced Fos immunoreactivity on both side of the VM (Boye and Rompré 1996; Moisan and Rompré 1998; Marcangione and Rompré 2008). Consequently, two guide cannulae (HRS Scientific, Montreal, Canada, model C315G) were implanted, one in each hemisphere, above the VM; coordinates were 5.4-5.6 mm posterior to bregma, 1.9 mm lateral to the midline (80 medio-lateral angle) and 6.4 mm below the surface of the skull; the cannula was closed with an obturator of the same length. A bare wire connected to a

male Amphenol connector was wrapped around four stainless steel screws that were threaded into the skull; it served as the inactive electrode. The cannula/electrode assembly was anchored to the skull with dental acrylic. A 0.05 mL of Duplocillin LA containing 15,000 I.U. of penicillin was administered (im) to prevent infections. The analgesic Anaphen (5 mg/kg, sc) was administered at the end of the surgery and 24 h later.

#### SELF-STIMULATION TRAINING

Five to seven days after surgery, rats were placed in a test cage (25 x 25 cm) made from polymer walls and one front Plexiglas wall that allowed observation. To reduce disturbance from external noise, test cages were encased in ventilated melamine boxes. Each cage was equipped with an infrared photocell inside a hole (3 cm diameter and 3 cm deep) located 2 cm above the wire-mesh floor. Interruption of the photocell triggered a constant-current pulse generator (Mundl 1980) that delivered a single 400 ms train of 0.1 ms cathodal rectangular pulses. Each train was followed by a period of 600 ms during which the pulse generator could not be triggered. This interval prevents the occurrence of summation between two consecutive trains in animals that respond at high response rates, and insures that the measure of reward threshold is a unique function of the number of pulses per train as predicted by the counter model on which the curve-shift method is based (Fouriezos 1995; Boye and Rompré 1996). Following a period of shaping, rats were trained to respond during discrete 50-s trials, each being followed by an interval of 15-s during which stimulation was not available. The beginning of each trial was signaled by 10 trains of non-contingent priming stimulation delivered at a rate of 1 per second. With the current intensity held constant, the frequency (number of pulses per train \* 2.5) was varied from 72 to 10 Hz in 0.06 to 0.09 log unit steps; this generated a function relating the number of nose-pokes per trial as a function of the stimulation



frequency (rate/frequency or R/F curve). An index of reward was inferred from each R/F curve and was defined as the pulse frequency sustaining a half-maximal rate of responding (M50). The current intensity was set for each rat to generate a M50 value between 35 and 42 Hz. During the training phase, four R/F curves were determined during daily test sessions. Testing began when the lower and higher M50 values derived from the last three R/F curves varied by less than 0.1 log unit for three consecutive days.

#### DRUG AND VEHICLE TESTS

A first saline test was carried out to habituate the animals to the injection procedure. This test was similar to the subsequent drug tests and consisted of determining four R/F curves before and seven after the injections. Bilateral injections were made by inserting into each guide cannula an injection cannula (model C315I) that extended 2 mm beyond the tip of the guide. Each injection cannula was connected with polyethylene tubing to a 2- $\mu$ l microsyringe and a 0.5  $\mu$ l volume of sterile 0.9% saline was injected into each hemisphere simultaneously with a micro-infusion pump over a period of 60 sec; the injection cannulae were left in place for an additional 60 sec to allow diffusion into the tissue. Results from this test were not included in the analysis. Drug and vehicle testing began five days after this first habituation test. On a drug test day, four baseline R/F curves were first determined, the first one was considered as a warm-up and discarded; then each rat was centrally injected with the drug, or its vehicle, using the procedure described above and seven additional R/F curves were determined over a test session that lasted approximately 115 min. Three different groups were tested respectively with three doses of R-CPP (20.6, 41.2 and 82.5 pmol/0.5 $\mu$ l/side, n = 10), two doses of PPPA (0.825 and 1.65 nmol/0.5 $\mu$ l/side, n = 7), or two doses of Ro04-5595 (0.825 and 1.65 nmol/0.5 $\mu$ l/side, n = 9; some of these later rats were tested again with 3.3 nmol/0.5 $\mu$ l/side, n = 4). Rats in each group received all doses (including the vehicle) in a counterbalanced order; there were at

least five days between two consecutive drug or vehicle tests. The doses of R-CPP were chosen based on previous studies (Cador, Bjijou et al. 1999; Cornish, Nakamura et al. 2001) while those of PPPA and Ro04-5595 were based on preliminary data from our lab.

#### DATA ANALYSIS

The mean changes in M50 and maximal responses were expressed as the percentage of pre-injection value (baseline) and group means were calculated for each dose and vehicle data. Mean percentage change of both M50 and maximum response were analyzed with a two-way (dose x time) analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. A one-way ANOVA for repeated measure on dose was used to analyze the data at a specific time after the injection. Homogeneity of variance was tested and square root or log data transformations were performed when necessary. Comparisons among means were made with Holm-Sidak test with the level of significance set at 0.05 (SigmaStat, V11.0, Systat Software Inc.)

#### HISTOLOGY

At the end of the experiment, the animals were anesthetized with urethane (1.4-2.0 g/kg, i-p.) and the stimulation and injection sites were marked by passing an anodal current of 0.1 mA during 60 seconds through the electrode and the injection cannulae that were inserted into the guide. The animals were then perfused with 0.9% saline followed by a 10% formalin solution and the brains were extracted and soaked in a solution containing 3% potassium ferrocyanide, 3% potassium ferricyanide and 0.5% trichloroacetic acid for 24 hours. The brains were then rinsed and stored in a 10% formalin solution for several days. They were subsequently frozen and sliced in 40  $\mu$ m sections that were mounted on gelatin-coated glass slides. The location of the stimulation and of the injections sites were determined under light microscopy from freshly sliced sections and/or sections stained

with Nissl's technique. Animals that had both injection sites within the ventral tegmental area, including the rostral and caudal linear nuclei, the paranigral, parabrachial and the interfascicular nuclei, between 4.8 and 6.0 mm behind bregma (Paxinos and Watson 1982) were included in the analyses.

#### DRUGS

R-CPP (3-((R)-2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid), PPPA (2R, 4S)-4-(3-Phosphopropyl)-2-piperidinecarboxylic acid), Ro04-5595 hydrochloride 1-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-methoxy-2-methyl-7-isoquinolinol hydrochloride), were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MI, USA). They were dissolved in sterile 0.9% saline and stored frozen in 40-50  $\mu$ l aliquots. Drug solutions were thawed and diluted when necessary just prior to testing.

## RESULTS

### HISTOLOGY

Histological analysis revealed that stimulation sites were located near the midline (0.0-0.3 mm), within ventral central gray or the decussation of the superior cerebellar peduncle between the anterior-posterior regions corresponding to 6.5 and 8.0 mm posterior to bregma (not shown). Injection sites for all the animals included in the analyses are shown in Figure 1. Sites were located within the VTA and its adjacent nuclei (see methods) between 5.2 and 6.0 mm posterior to bregma, VM regions that contain neurons activated by rewarding electrical stimulation (Marcangione and Rompre 2008).

### EFFECTS OF R-CPP

Rate-frequency curves obtained from one rat following bilateral VM injections of vehicle, 20.6, 41.2 and 82.5 pmol/0.5 $\mu$ l/side of R-CPP are shown in Figure 2. R-CPP produced a dose-dependent leftward shift of the R/F curve reflecting an enhancement of the rewarding effectiveness of the stimulation. This effect was not observed following injections of vehicle (top left panel). Figure 3 shows mean changes (expressed in % of baseline) in reward threshold (top panels) and maximal response (bottom panels) for each dose of R-CPP. Analysis of variance performed on mean percent change in reward threshold yielded a significant treatment by time interaction ( $F_{18,162} = 2.97$ ,  $p < 0.001$ ). The magnitude of the reduction of reward threshold produced by R-CPP varied with the dose and the time post-injection (top panel); post-hoc test confirmed that 25 min after the injection reward threshold was significantly reduced compared to vehicle at the three doses. At the highest dose, the significant reduction of threshold lasted up to 95 min. Post-hoc test also revealed a significant difference between the highest and the lowest dose at 60 and 80 min after the injection. Maximum response was also enhanced at the two highest doses (bottom panels). Because of the lack of homogeneity of variance, and

the ineffectiveness of the data transformation, an ANOVA could not be performed on the entire set of data. It was possible however to perform a one way ANOVA on the data collected at 25 min, a time period at which R-CPP reduced reward threshold at all doses, and at 80 min, a time at which only the highest dose reduced threshold. The ANOVAs yielded a significant effect of treatment (30 min,  $F_{3,27} = 3.3$ ,  $p < 0.05$ ; 75 min,  $F_{3,27} = 3.0$ ,  $p < 0.05$ ) and post-hoc test showed that only the highest dose produced a significant increase in maximum response at these two time periods, hence suggesting differential enhancements of reward and operant responding.

#### EFFECTS OF PPPA

To assess the reliability of the results obtained with R-CPP, we tested the effects of PPPA, a NMDA antagonist that has affinities for the GluN2A/2B subunits similar (about 2 times lower) to that of R-CPP (Feng, Morley et al. 2005). A pilot study ran on a different group of rats showed that PPPA was active over a range of doses 10 to 20 times higher than that of R-CPP (0.826 and 1.65nmol). Consequently, we did a dose-response experiment in a new group using these doses. Results presented in Figure 4 show that VM injection of PPPA, like R-CPP, produced a reduction in reward threshold (top panels) and an increase in maximum response (bottom panels). The ANOVA performed on mean changes in reward threshold yielded a significant effect of treatment ( $F_{2,12} = 10.05$ ,  $p < 0.05$ ) but no treatment by time interaction ( $F_{12,72} = 1.04$ ,  $p > 0.05$ ). Post-hoc test showed that PPPA significantly reduced threshold compared to vehicle at the two doses (top, right panel); there is no difference however between the effect of the low and of high dose. The ANOVA performed on mean changes in maximum rate yielded a significant treatment by time interaction ( $F_{12,72} = 1.95$ ,  $p < 0.05$ ) and post-hoc test showed that maximum response was enhanced compared to vehicle at 45 min at the lower dose and at 25-45 and 80-95 min at the higher dose (bottom, left panel).

## EFFECTS OF RO04-5595

In order to determine whether the enhancement of reward and maximum response produced by VM injections of R-CPP and PPPA was mediated, at least in part, by blockade of NMDA receptors composed of GluN2B subunits, we tested a new group of rats with two doses of the selective GluN2B antagonist, Ro04-5595. As shown in Figure 5, Ro04-5595 produced no change in reward threshold (top panels) and no change in maximum response (bottom panels) at the doses tested. The ANOVA performed on mean changes in reward threshold and maximum response yielded no effect of treatment (threshold:  $F_{2,16} = 0.44$ ,  $p > 0.05$ ; maximum response:  $F_{2,16} = 0.23$ ,  $p > 0.05$ ) and no significant treatment by time interaction (threshold:  $F_{12,95} = 0.93$ ,  $p > 0.05$ ; maximum response:  $F_{12,95} = 0.48$ ,  $p > 0.05$ ). Four rats from this group were tested with a dose of 3.3 nmol of Ro04-5595 (data not shown). This higher dose had no effect on reward threshold ( $F_{1,3} = 0.87$ ,  $p > 0.05$ ) nor on maximum response ( $F_{1,3} = 0.01$ ,  $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

The major finding of this study is that blockade of VM NMDA receptors enhances reward induced by electrical stimulation of the medial posterior mesencephalon. The reward enhancement which is reflected by a leftward shift of the R/F curve was sometimes accompanied, however, by an increase in maximum response, raising the possibility that the reward changes were due to a general increase in operant responding. Several observations suggest that it was not the case. First, raw data presented in Figure 2 shows that the R/F curve was shifted on both the x and the y-axis; if it were shifted on the y-axis only due to a proportional increase in rates at all stimulation frequencies (scalar transformation), there would be no change in the M50 index (Edmonds and Gallistel 1974). Second, there was a mismatch between the time course of the changes in reward threshold and maximum response produced by R-CPP and PPPA. Thirty minutes after the injection of R-CPP, for instance, reward threshold was decreased at every dose while maximum response was enhanced only at the high dose. Third, if reward threshold reductions were linked to increases in maximum response, one would expect a strong negative correlation between these two variables. A correlational analysis performed on data collected with every dose of R-CPP reveals that the changes in maximum response accounts for less than 5% of variance of reward threshold. For PPPA, the percent of the variance in reward threshold explained by maximum responses is 29% at 0.825 nmol but less than 1% at 1.65 nmol. Such dissociation between reward threshold and maximum response changes has been shown before with several different pharmacological treatments (Rompre 1995; Boye and Rompré 1996; Benaliouad, Kapur et al. 2009; Gallo, Lapointe et al. 2010). Carlezon and Wise (1996) also reported that microinjection of 800 pmol of R/S-CPP into the nucleus accumbens reduced reward threshold while producing either no change or a reduction in maximum response depending upon the site of injection.

NMDA receptors are tetrameric channels forming hetero- or triheterodimers composed of two GluN1 subunits with GluN2 and/or GluN3 subunits (McBain and Mayer 1994). Four GluN2 subunits have been identified, 2A, 2B, 2C and 2D, and VM contains mainly GluN2A, 2B and 2D subunits (Wang, Bosy et al. 1995). R-CPP and PPPA were both effective at enhancing reward. The affinity of R-CPP is 7 and 48 times higher than for GluN2A than 2B and 2D respectively; PPPA has a similar affinity profile, having a higher affinity that is 4 and 30 times higher for GluN2A than 2B and 2D respectively (Feng, Morley et al. 2005). This suggests that the enhancement of reward produced by these antagonists is mostly likely due to blockade of NMDA receptors composed of GluN2A and/or 2B sub-units. To determine a possible role of GluN2B we tested a wide range of the doses of the selective GluN2B antagonist, Ro04-5595 (Mutel, Buchy et al. 1998); this selective antagonist failed to alter reward at any dose and time post-injection. It is unlikely that the doses used were too low, since over this range they were found to enhance neurotensin-induced locomotor activity and neurotensin-induced sensitization to amphetamine (Rompré June 2012). That suggests that the reward enhancement produced by R-CPP and PPPA was due to their action at the NMDA receptors that contain GluN2A subunits.

Previous studies have reported an enhancement of BSR following systemic injection of MK-801, a non-selective NMDA antagonist (Corbett 1989; Herberg and Rose 1989; Tzschentke and Schmidt 1999; Clements and Greenshaw 2005). Systemic MK-801 injection also induces a conditioned place-preference suggesting that blockade of NMDA receptors is sufficient to induce a rewarding effect (Hoffman 1994; Papp and Moryl 1994). Previous studies with in situ microinjections suggest that MK-801 may act in the ventral striatum to produce a rewarding effect and to enhance BSR (Carlezon and Wise 1996). But the present results suggest that the VM may also constitute a site of action of NMDA antagonist. In accordance with this hypothesis, David et al. (1998) reported that VM microinjections of AP-7, a NMDA antagonist that shows a higher affinity for GluN2A,



supports self-administration. Interestingly, the rewarding effect of AP-7 was attenuated by the selective D2-like antagonist, sulpiride, suggesting that it is dopamine-dependent. Such a hypothesis is consistent with the present findings. Brain stimulation reward is enhanced following VM microinjection of drugs that increases dopamine impulse flow (Wise and Rompré 1989), and a reward-dependent increase in VM dopamine cell firing is observed during delivery of electrical stimulation to the medial posterior mesencephalon (Moisan and Rompré 1998). This hypothesis implies that glutamate exerts a tonic inhibitory input to reward-relevant VM dopamine neurons through activation of NMDA receptors. Electrophysiological studies have shown that GABA provides a tonic inhibitory input to dopamine neurons (Grace, Floresco et al. 2007). Activation of VM opioid receptors, for instance, is hypothesized to support self-administration, induce a conditioned place-preference and enhance BSR, by inhibiting a GABAergic inhibitory input to dopamine neurons (Wise and Rompré 1989; Johnson and North 1992; Chefer, Denoroy et al. 2009). Other studies have shown that VM microinjection of bicuculline, a GABA antagonist, supports self-administration while muscimol, a GABA agonist, reduces BSR. This suggests that part of the tonic inhibition exerted by GABA is reward relevant. It is not unlikely that the tonic inhibitory input to dopamine is, at least in part, under control of glutamate. Anatomical studies show that glutamatergic terminals established synaptic contacts with non-dopamine (presumed to be GABAergic) neurons that send collaterals to dopamine neurons (Omelchenko and Sesack 2009). Ventral midbrain non-dopamine neurons express NMDA receptors and these play a role in drug reward (Luo, Good et al. 2010). This hypothesis predicts the relevant non-dopamine neurons express NMDA receptors that are composed of GluN2A subunits. GluN2A subunits are present in the VM and electrophysiological data suggest that they are expressed by non-dopamine neurons (Jones and Gibb 2005; Suarez, Zhao et al. 2010); it is possible then that activation of these receptors increases firing of non-dopamine neurons and indirectly inhibits dopamine activity.

Glutamate possibly plays a role in reward signaling as it controls burst firing of dopamine neurons by activating NMDA receptors (Zweifel, Parker et al. 2009). It is not known which sub-type(s) of NMDA receptors is/are involved. Current knowledge suggests that they are mostly receptors composed of GluN2B or GluN2D (Jones and Gibb 2005; Suarez, Zhao et al. 2010). Possible involvement of GluN2B in the initiation of phasic dopamine cell firing predicts that VM microinjections of Ro04-5595, a selective GluN2B antagonist, would attenuate dopamine impulse flow and dopamine release, effects that are predictive of an attenuation of BSR. But such an effect was not observed in the present study over a wide range of doses. As mentioned earlier, these negative results cannot be attributed to inappropriate dose range. Simple explanations are that i) NMDA receptors involved in control of dopamine burst firing contain GluN2D but not GluN2B subunit(s) and/or ii) those dopamine neurons that expressed NMDA receptors with GluN2B subunits are not involved in reward induced by electrical brain stimulation. In agreement to the first explanation, a study measuring striatal dopamine levels following PCP injection suggests that the GluN2D subunit is essential for dopamine burst firing. (Hagino, Kasai et al. 2010). These results might provide an explanation to why we did not observe any effect following injections of Ro04-5595.

An important observation is that R-CPP and PPPA, but not Ro04-5595, produced a significant increase in maximum response, an effect not related to the reward enhancement. Ranaldi et al. (1997) who studied the effect of MK-801 on cocaine-induced potentiation of BSR, found that a sub-threshold dose of MK-801 induced a 40% increase in maximum response when combined with cocaine. These findings are somewhat consistent with the present results. With the curve-shift paradigm, changes in maximum response are generally interpreted as changes in performance (Miliaressis, Rompré et al. 1986). The maximum response is highly variable from one animal to the other, even when there is no apparent side-effect of the stimulation such as motor response, post-stimulation behavioral inhibition, and intense exploratory behavior. It is thus difficult to

provide an explanation to an enhancement of maximum response. One possibility is that R-CPP and PPPA have attenuated unapparent side-effects and/or have enhanced the capacity of the animal to produce the operant response. An alternative explanation is that the animals focused more on the task when injected with these drugs. Could it be that they were more motivated to obtain the stimulation? With the operant response paradigm it is not possible to dissociate motivation from reward; such a dissociation is possible with the use of the runway paradigm developed by Gallistel's group (Wasserman, Gomita et al. 1982). It would indeed be interesting to determine what type of changes blockade of VM GluN2A subunits produce in this paradigm.

Anhedonia, a core symptom of depression, is associated with an hypofunction of the mesolimbic pathway (Nestler and Carlezon 2006). Dysregulation of this pathway may result from its glutamatergic afferent inputs from cortical and subcortical limbic regions, and from local neurons. The present results show that blockade of VM NMDA receptors enhances the reward signal, suggesting that glutamate provides inhibition of the reward pathway and raising the possibility that anhedonia is due to this glutamatergic inhibition. Recent clinical studies have shown that ketamine produces a rapid change in mood deficit (Mathew, Shah et al. 2012). The mechanism(s) by which ketamine produces its antidepressant effect remains largely unknown, but at the dose used, it is hypothesized to act primarily as a NMDA antagonist (Aan Het Rot, Zarate et al. 2012). Our results suggest that ketamine may act on VM NMDA receptors to reverse mood deficit. Pharmacological treatments that would selectively target NMDA VM receptors may have clinical potential as fast acting antidepressants. But drugs that enhance BSR also possess a strong addictive potential (Wise 1996) and this should be taken into account for the development of new antidepressant molecules targeting NMDA receptors.

**DISCLOSURE/CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare that, except for income received from any primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past three years for research or professional services and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (PPR, grant #119057) and by the FRSQ Research Center in Behavioral Neurobiology (SB). Authors express their gratitude to Claude Bouchard for his excellent assistance.

**REFERENCES**

- Aan Het Rot, M., C. A. Zarate, Jr., et al. (2012). "Ketamine for Depression: Where Do We Go from Here?" *Biol Psychiatry*.
- Benaliouad, F., S. Kapur, et al. (2009). "Effects of the dopamine stabilizer, OSU-6162, on brain stimulation reward and on quinpirole-induced changes in reward and locomotion." *European Neuropsychopharmacology* 19(6): 416-430.
- Boye, S. M. and P. P. Rompré (1996). "Effect of pimozide on self-stimulation threshold under a continuous and fixed-interval schedule of reinforcement." *Behav Brain Res* 78(2): 243-245.
- Boye, S. M. and P. P. Rompré (1996). "Mesencephalic substrate of reward: axonal connections." *J Neurosci* 16(10): 3511-3520.
- Cador, M., Y. Bijiou, et al. (1999). "D-amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation." *Neuroscience* 94(3): 705-721.
- Carlezon, W. A. and R. A. Wise (1996). "Microinjections of phencyclidine (PCP) and related drugs into nucleus accumbens shell potentiate medial forebrain bundle brain stimulation reward." *Psychopharmacology* 128(4): 413-420.
- Carr, D. B. and S. R. Sesack (2000). "Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons." *J Neurosci* 20(10): 3864-3873.
- Chefer, V. I., L. Denoroy, et al. (2009). "Mu opioid receptor modulation of somatodendritic dopamine overflow: GABAergic and glutamatergic mechanisms." *Eur J Neurosci* 30(2): 272-278.

- Clements, R. L. and A. J. Greenshaw (2005). "Facilitation of brain stimulation reward by MK-801 (dizocilpine) may be independent of D2-like dopamine receptor stimulation in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 182(1): 65-74.
- Corbett, D. (1989). "Possible abuse potential of the NMDA antagonist MK-801." *Behav Brain Res* 34(3): 239-246.
- Cornish, J. L., M. Nakamura, et al. (2001). "Dopamine-independent locomotion following blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area." *J Pharmacol Exp Ther* 298(1): 226-233.
- David, V., T. P. Durkin, et al. (1998). "Rewarding effects elicited by the microinjection of either AMPA or NMDA glutamatergic antagonists into the ventral tegmental area revealed by an intracranial self-administration paradigm in mice." *Eur J Neurosci* 10(4): 1394-1402.
- Dobi, A., E. B. Margolis, et al. (2010). "Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons." *J Neurosci* 30(1): 218-229.
- Edmonds, D. E. and C. R. Gallistel (1974). "Parametric analysis of brain stimulation reward in the rat: III. Effect of performance variables on the reward summation function." *J Comp Physiol Psychol* 87(5): 876-883.
- Feng, B., R. M. Morley, et al. (2005). "The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity." *Neuropharmacology* 48(3): 354-359.
- Fouriez, G. (1995). "Temporal integration in self-stimulation: a paradox lost?" *Behav Neurosci* 109(5): 965-971.
- French, E. D., A. Mura, et al. (1993). "MK-801, phencyclidine (PCP), and PCP-like drugs increase burst firing in rat A10 dopamine neurons: comparison to competitive NMDA antagonists." *Synapse* 13(2): 108-116.

- Gallo, A., S. Lapointe, et al. (2010). "Quetiapine blocks cocaine-induced enhancement of brain stimulation reward." *Behavioural brain research* 208(1): 163-168.
- Gonon, F. G. (1988). "Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry." *Neuroscience* 24(1): 19-28.
- Grace, A. A., S. B. Floresco, et al. (2007). "Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors." *Trends Neurosci* 30(5): 220-227.
- Hagino, Y., S. Kasai, et al. (2010). "Essential Role of NMDA Receptor Channel epsilon 4 Subunit (GluN2D) in the Effects of Phencyclidine, but Not Methamphetamine." *PLoS One* 5(10).
- Herberg, L. J. and I. C. Rose (1989). "The effect of MK-801 and other antagonists of NMDA-type glutamate receptors on brain-stimulation reward." *Psychopharmacology (Berl)* 99(1): 87-90.
- Hernandez, G. and P. Shizgal (2009). "Dynamic changes in dopamine tone during self-stimulation of the ventral tegmental area in rats." *Behav Brain Res* 198(1): 91-97.
- Hoffman, D. C. (1994). "The noncompetitive NMDA antagonist MK-801 fails to block amphetamine-induced place conditioning in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 47(4): 907-912.
- Johnson, S. W. and R. A. North (1992). "Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs." *J Physiol* 450: 455-468.
- Jones, S. and A. J. Gibb (2005). "Functional NR2B- and NR2D-containing NMDA receptor channels in rat substantia nigra dopaminergic neurones." *J Physiol* 569(Pt 1): 209-221.
- Karreman, M., B. H. Westerink, et al. (1996). "Excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine release in the ventral striatum." *J Neurochem* 67(2): 601-607.



- Kretschmer, B. D. (1999). "Modulation of the mesolimbic dopamine system by glutamate: role of NMDA receptors." *J Neurochem* 73(2): 839-848.
- Luo, Y., C. H. Good, et al. (2010). "NMDA receptors on non-dopaminergic neurons in the VTA support cocaine sensitization." *PLoS One* 5(8): e12141.
- Marcangione, C. and P. P. Rompre (2008). "Topographical Fos induction within the ventral midbrain and projection sites following self-stimulation of the posterior mesencephalon." *Neuroscience* 154(4): 1227-1241.
- Marcangione, C. and P. P. Rompré (2008). "Topographical Fos induction within the ventral midbrain and projection sites following self-stimulation of the posterior mesencephalon." *Neuroscience* 154(4): 1227-1241.
- Mathe, J. M., G. G. Nomikos, et al. (1998). "Non-NMDA excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area mediate systemic dizocilpine (MK-801) induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens." *J Neurosci Res* 51(5): 583-592.
- Mathew, S. J., A. Shah, et al. (2012). "Ketamine for treatment-resistant unipolar depression: current evidence." *CNS Drugs* 26(3): 189-204.
- McBain, C. J. and M. L. Mayer (1994). "N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function." *Physiol Rev* 74(3): 723-760.
- Miliaressis, E., P. P. Rompré, et al. (1986). "The curve-shift paradigm in self-stimulation." *Physiol Behav* 37(1): 85-91.
- Moisan, J. and P. P. Rompré (1998). "Electrophysiological evidence that a subset of midbrain dopamine neurons integrate the reward signal induced by electrical stimulation of the posterior mesencephalon." *Brain Res* 786(1-2): 143-152.
- Mundl, W. J. (1980). "A constant-current stimulator." *Physiol Behav* 24(5): 991-993.

- Mutel, V., D. Buchy, et al. (1998). "In vitro binding properties in rat brain of [3H]Ro 25-6981, a potent and selective antagonist of NMDA receptors containing NR2B subunits." *J Neurochem* 70(5): 2147-2155.
- Narayanan, S., D. Willins, et al. (1996). "Role of dopaminergic mechanisms in the stimulatory effects of MK-801 injected into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens." *Pharmacol Biochem Behav* 54(3): 565-573.
- Nestler, E. J. and W. A. Carlezon, Jr. (2006). "The mesolimbic dopamine reward circuit in depression." *Biol Psychiatry* 59(12): 1151-1159.
- Omelchenko, N., R. Bell, et al. (2009). "Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area." *Eur J Neurosci* 30(7): 1239-1250.
- Omelchenko, N. and S. R. Sesack (2009). "Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells." *Synapse* 63(10): 895-906.
- Papp, M. and E. Moryl (1994). "Rewarding properties of non-competitive and competitive NMDA antagonists as measured by place preference conditioning in rats." *Pol J Pharmacol* 46(1-2): 79-81.
- Paxinos, G. and C. Watson (1982). "The rat brain in stereotaxic coordinates." Ed 2. Sydney: Academic.
- Ranaldi, R., P. Baucó, et al. (1997). "Synergistic effects of cocaine and dizocilpine (MK-801) on brain stimulation reward." *Brain Res* 760(1-2): 231-237.
- Rompré, P.-P. and D. Lévesque (2012). "Blockade of ventral midbrain NMDA receptors prevents Neurotensin-induced sensitization to amphetamine (abstract)." Abstracts from the 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Stockholm, Sweden, 3–7 June 2012. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, Volume 15, Supplement S1, June 2012, : 75

- Rompres, P. P. (1995). "Psychostimulant-Like Effect of Central Microinjection of Neurotensin on Brain-Stimulation Reward." *Peptides* 16(8): 1417-1420.
- Schultz, W. (2007). "Behavioral dopamine signals." *Trends Neurosci* 30(5): 203-210.
- Suarez, F., Q. Zhao, et al. (2010). "Functional heterogeneity of NMDA receptors in rat substantia nigra pars compacta and reticulata neurones." *Eur J Neurosci* 32(3): 359-367.
- Tzschenke, T. M. and W. J. Schmidt (1999). "Memantine does not substantially affect brain stimulation reward: comparison with MK-801." *Brain Res* 845(2): 192-198.
- Wang, Y. H., T. Z. Bosy, et al. (1995). "Characterization of NMDA receptor subunit-specific antibodies: distribution of NR2A and NR2B receptor subunits in rat brain and ontogenic profile in the cerebellum." *J Neurochem* 65(1): 176-183.
- Wasserman, E. M., Y. Gomita, et al. (1982). "Pimozide blocks reinforcement but not priming from MFB stimulation in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 17(4): 783-787.
- Wise, R. A. (1996). "Addictive drugs and brain stimulation reward." *Annu Rev Neurosci* 19: 319-340.
- Wise, R. A. and P. P. Rompré (1989). "Brain dopamine and reward." *Annu Rev Psychol* 40: 191-225.
- You, Z. B., Y. Q. Chen, et al. (2001). "Dopamine and glutamate release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat following lateral hypothalamic self-stimulation." *Neuroscience* 107(4): 629-639.
- Zweifel, L. S., J. G. Parker, et al. (2009). "Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18): 7281-7288.

## LEGENDS

Figure 1. Location of injection sites for each animal included in the study (R-CPP, PPPA and Ro04-5595). Each injection site is represented by a single cross. Illustrations are modified drawings from Paxinos & Watson's atlas (1986); numbers on the right represent the anterior-posterior distance (mm) from bregma.

Figure 2. Rate-frequency curves obtained from one animal prior to (dotted line) and two hours (line) after injection of vehicle (top left panel) and three doses (20.6, 41.2, 82.5 pmol/0.5 $\mu$ l/side) of R-CPP. The x-axis represents the number of pulses per train on a log scale.

Figure 3. Changes in reward threshold (top panels) and maximum response (bottom panels) as a function of time (left panels) after injection of vehicle (VEH) and each of the three doses of R-CPP. Data represent the mean ( $\pm$  S.E.M.) from 10 animals and are expressed as percentage of baseline. Changes (mean  $\pm$  S.E.M.) measured over the entire test session are shown in the right panels. Asterisk and cross indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) from VEH and the highest dose, respectively.

Figure 4. Changes in reward threshold (top panels) and maximum response (bottom panels) as a function of time (left panels) after injection of vehicle (VEH) and each of the two doses of PPPA. Data represent mean ( $\pm$  S.E.M.) from seven animals and are expressed as percentage of baseline. Changes (mean  $\pm$  S.E.M.) measured over the entire test session are shown in the right panels. Asterisk indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) from VEH.

Figure 5. Changes in reward threshold (top panels) and maximum response (bottom panels) as a function of time (left panels) after injection of vehicle (VEH) and each of the two doses of Ro04-5595. Data represent mean ( $\pm$  S.E.M.) from nine animals and are expressed as percentage of baseline. Changes (mean  $\pm$  S.E.M.) measured over the entire test session are shown in the right panels.

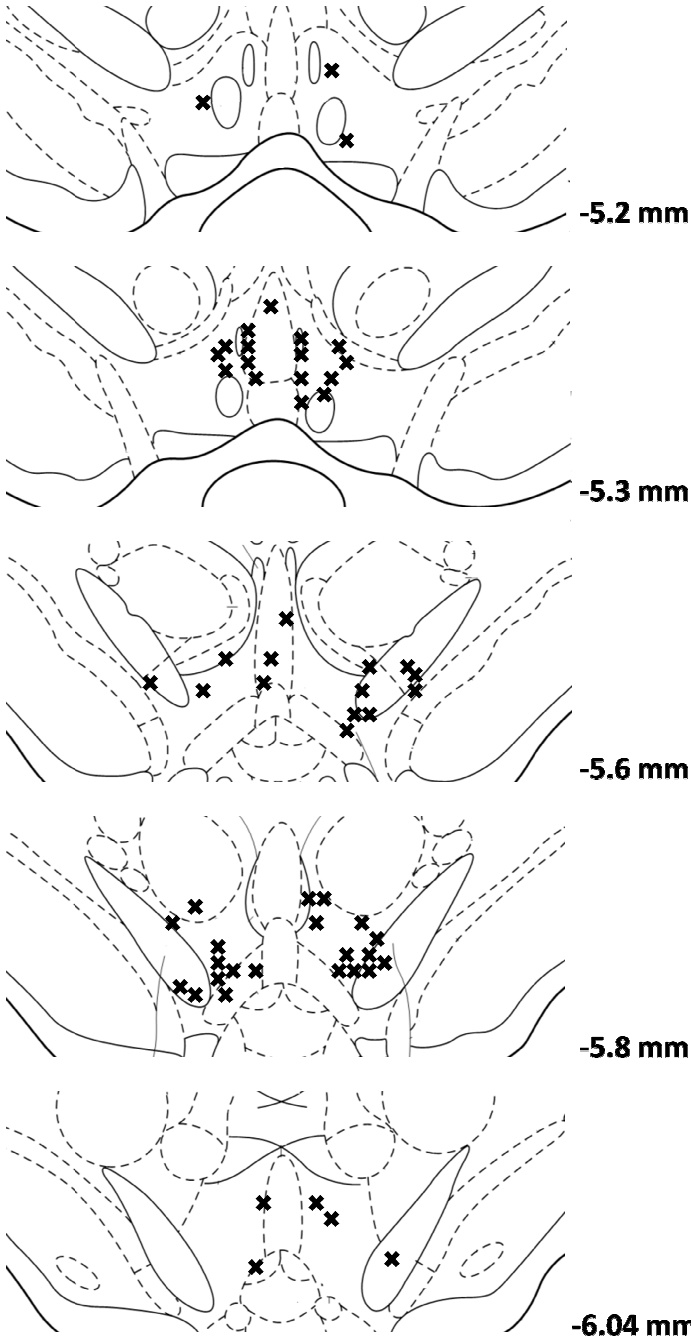


FIGURE 1

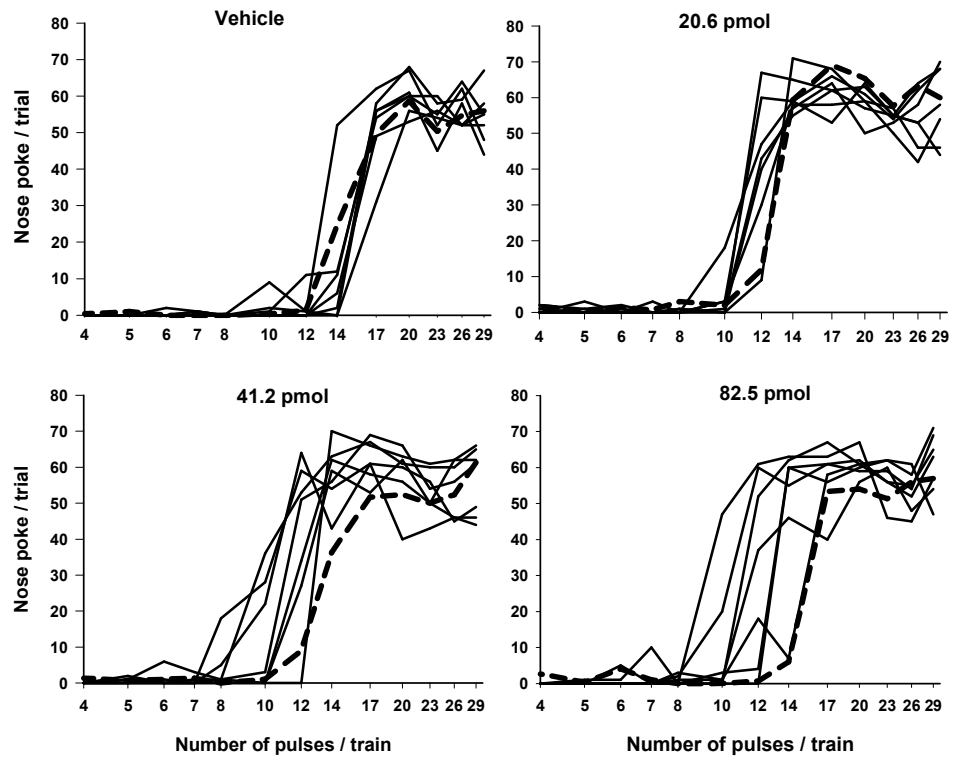


FIGURE 2

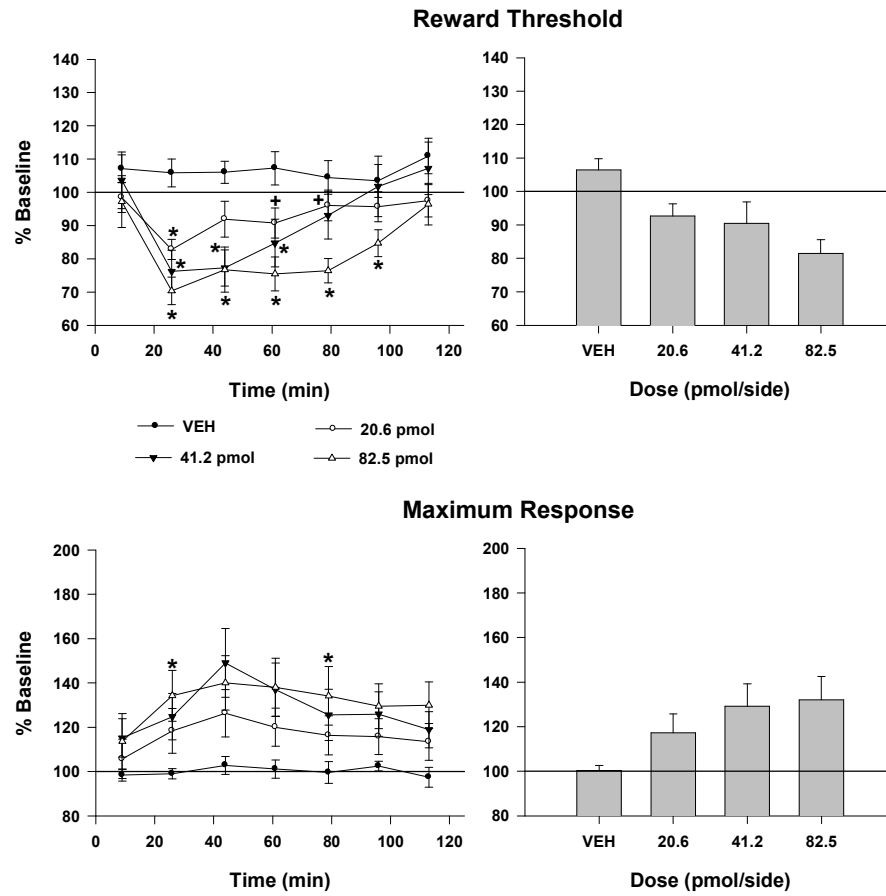


FIGURE 3

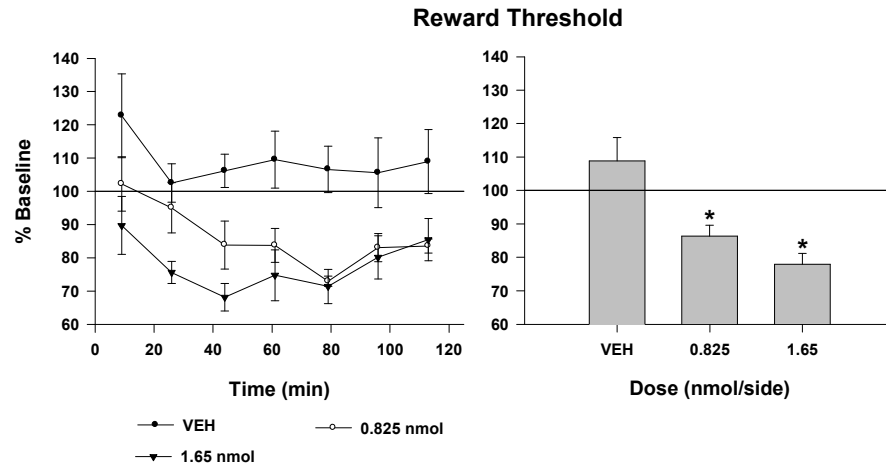


FIGURE 4



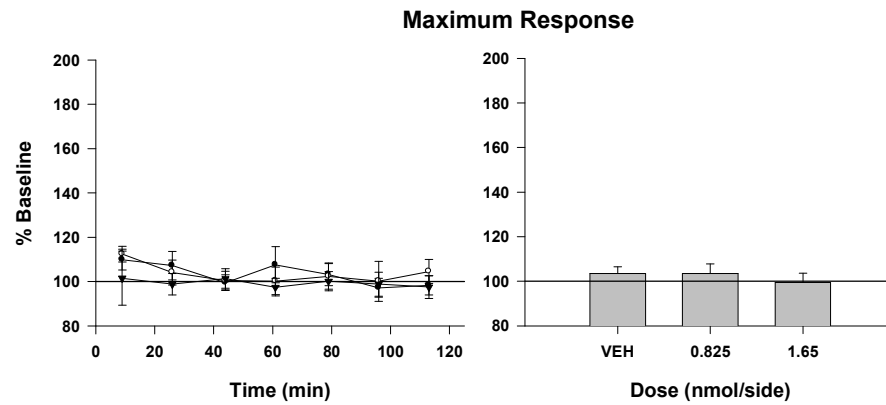
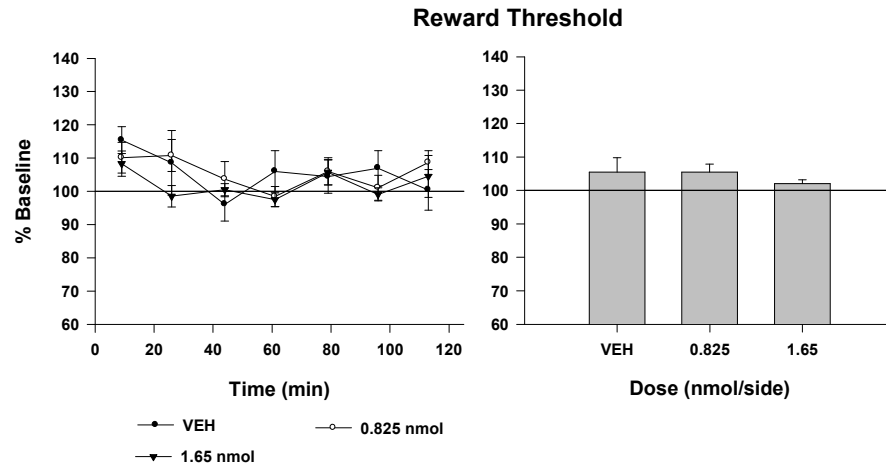


FIGURE 5

## Discussion

Bien que plusieurs mécanismes neurobiologiques régissant la récompense demeurent à découvrir, le rôle des neurones du mésencéphale ventral (MV) est bien documenté. L'hypothèse d'un rôle prépondérant des éléments nerveux mésencéphaliques est appuyée par les observations suivantes : 1) l'injection de drogues d'abus dans le mésencéphale ventral induit un effet de récompense et amplifie la récompense induite par la stimulation électrique intracérébrale (Wise and Rompré 1989; Wise 1996); 2) une augmentation de l'activité neuronale mésencéphalique est enregistrée pendant la stimulation électrique du circuit de récompense (Moisan and Rompré 1998; Lassen, Brown et al. 2007); 3) une augmentation de l'activité neuronale, mesurée par l'expression de la protéine Fos, est observée après une séance d'autostimulation intracérébrale (Arvanitogiannis, Flores et al. 1997; Marcangione and Rompré 2008).

Au cours des dernières décennies, une attention particulière a été accordée au rôle de la dopamine dans la récompense; nous avons cependant peu de connaissances sur le rôle d'autres neuromédiateurs chimiques présents dans les neurones et les terminaisons nerveuses mésencéphaliques. Plusieurs régions du système limbique impliquées dans la récompense envoient des efférences vers le mésencéphale ventral et un grand nombre d'entre elles utilisent le glutamate comme neurotransmetteur; ces efférences établissent des connections synaptiques avec des neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques. Étant donné qu'il y a des récepteurs glutamatergiques de type NMDA

sur les éléments nerveux dopaminergiques et non-dopaminergiques du MV, les expériences effectuées dans le cadre de ce projet avaient pour objectif de mieux comprendre le rôle que jouent ces récepteurs dans la récompense induite par la stimulation électrique du MP. Au moyen de la technique d'injection intracérébrale *in situ*, nous avons tenté de préciser le rôle de deux sous-unités du récepteurs NMDA, la sous-unité GluN2A et la sous-unité GluN2B, dans la modulation de la récompense.

### **Sélection des antagonistes et des paramètres d'autostimulation intracérébrale**

Pour déterminer si l'activation des récepteurs NMDA du MV amplifie ou atténue le comportement d'autostimulation intracérébrale, nous avons injecté dans le MV différentes concentrations de trois antagonistes aux récepteurs NMDA, le R-CPP, le PPPA et le Ro04-5595. L'effet de l'injection de ces drogues sur la récompense a été quantifié au moyen de la méthode du déplacement de la courbe R/F (Miliaressis, Rompré et al. 1986). L'utilisation d'antagonistes plutôt que d'agonistes était motivée par le fait qu'une suractivation des récepteurs NMDA peut provoquer la mort cellulaire, une variable confondante pour l'interprétation des résultats.

L'acide phosphonique-3-(R-2-Carboxypiperazine-4-yl)-propyle-1 (R-CPP) est un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA. Il possède une affinité plus élevée pour la sous-unité GluN2A par rapport aux sous-unités GluN2B, GluN2C et GluN2D. Puisqu'aucune

étude n'a été réalisée à ce jour sur l'effet de l'injection intra-MV de R-CPP sur le comportement d'autostimulation intracérébrale, nous avons utilisé des doses comparables à celles qui altèrent l'activité locomotrice chez le rat (Cador, Bijiou et al. 1999; Cornish, Nakamura et al. 2001). Chez un premier groupe de rats, nous avons quantifié la réponse opérante suite à la stimulation électrique du MP à des fréquences variant de 72 à 10Hz, avant et après l'injection de trois doses (20,6, 41,2 et 82,5 pmol/0,5 µl/hémisphère) de R-CPP. Afin de pouvoir détecter une atténuation ou une amplification de l'effet de récompense, les animaux ont été entraînés à produire une réponse basale (i.e. avant le traitement) à une intensité de pulsions générant une valeur de M50 modérée, se situant entre 35 et 42,5 Hz (14-17 pulsions/salve).

Une première hypothèse a été formulée :

Hypothèse 1: L'injection de R-CPP dans le MV va amplifier la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps.

L'injection bilatérale de R-CPP a produit un déplacement vers la gauche de la courbe R/F et un déplacement vers le haut de la portion asymptotique (voir Figure 2 de l'article). Les analyses statistiques réalisées sur la moyenne des résultats révèlent que l'injection bilatérale des trois doses de R-CPP a produit une réduction significative de la valeur M50, un effet qui est dépendant du temps (voir Figure 3 de l'article). Selon le modèle du déplacement de la courbe, une réduction de la valeur M50 reflète une

augmentation de la récompense induite par la stimulation électrique. En effet, lorsque le signal généré par la stimulation à la pointe de l'électrode est amplifié soit par l'injection d'une drogue, soit par l'augmentation de l'intensité (courant) des pulsions, le nombre de pulsions par salve requis pour induire la réponse opérante est diminué; il en résulte un déplacement de la courbe R/F vers la gauche. Sur la base de ces résultats, on ne peut pas infirmer l'hypothèse 1 et par conséquent on peut inférer que le R-CPP a amplifié la récompense.

La variabilité (variance non-homogène) des mesures de la réponse maximale (voir Figure 3 de l'article) n'a pas permis de réaliser une ANOVA à deux voies (doses x temps) avec mesures répétées. Cependant, une ANOVA à une voie (dose) a pu être réalisée à deux temps spécifiques, soit à 30 minutes, un temps où une amplification de l'effet de récompense est observée à chacune des doses, et à 75 minutes, un temps où seule la dose la plus élevée a amplifié la récompense. Les résultats de ces analyses statistiques montrent que la réponse maximale est augmentée aux deux temps mais seulement à la dose élevée : ceci suggère que l'amplification de la récompense induite par le R-CPP est indépendante de l'augmentation de la réponse maximale, du moins à la dose modérée et la dose la plus faible. Cette observation vient renforcer la fiabilité de la mesure M50 et sa capacité de détecter des changements spécifiques de la récompense (Miliaressis and Rompré 1987).

## Rôles des récepteurs NMDA dans le mésencéphale ventral

Les résultats obtenus avec le R-CPP suggèrent que le glutamate exerce une régulation négative sur le circuit de récompense par l'entremise des récepteurs NMDA localisés dans le MV. Cette hypothèse est appuyée par des études antérieures qui ont montré que le MK-801, un antagoniste non-compétitif NMDA, administré par voie systémique amplifie la récompense induite par la stimulation électrique intracérébrale (Corbett 1989; Herberg and Rose 1989; Ranaldi, Bauco et al. 1997; Tzschentke and Schmidt 1999; Clements and Greenshaw 2005). L'administration répétée de MK-801 induit également une préférence conditionnée ce qui suggère qu'une action antagoniste aux récepteurs NMDA est suffisante pour induire un effet de récompense (Papp and Moryl 1994). Cette hypothèse est appuyée par les résultats de David *et al.* (David, Durkin et al. 1998) qui ont montré que des souris s'autoadministrent de l'AP-7, un antagoniste NMDA compétitif, directement dans le MV.

Les récepteurs NMDA sont des hétéromères, généralement formés de quatre sous-unités comprenant obligatoirement 2 sous-unités GluN1 qui comprennent chacun un site de liaison au glutamate; les propriétés physicochimiques des récepteurs NMDA sont déterminées par l'assemblage des deux autres sous-unités. Celles-ci peuvent être des variantes de GluN2 soit les sous-unités GluN2A, 2B, 2C et/ou 2D, ou GluN3. Tel que mentionné précédemment, le R-CPP se lie préférentiellement aux récepteurs NMDA qui

contiennent les sous-unités GluN2A. Afin de déterminer si cette propriété pharmacologique du R-CPP pouvait expliquer ses effets sur le comportement d'ASI, nous avons testé un autre antagoniste possédant un profil pharmacologique similaire, soit le PPPA. Sur la base de ces propriétés une seconde hypothèse a été formulée :

Hypothèse 2: L'injection du PPPA dans le MV va amplifier la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps, et qui sera similaire à celui observé après l'injection de R-CPP.

Puisqu'aucune étude sur l'effet du PPPA injecté dans le MV sur la récompense n'a été réalisée à ce jour, il fut nécessaire d'effectuer une expérience pilote afin de déterminer la dose de PPPA efficace. Un groupe de rats a donc été testé avec des doses équimolaires de PPPA et de R-CPP (82,5 pmol/0,5µl/hémisphère). Les résultats (voir Figure 6, Annexe 1) montrent que le R-CPP a produit une augmentation de la récompense (diminution de la valeur M50) et de la réponse maximale alors que le PPPA, injecté aux mêmes sites dans le MV, n'a produit aucun effet. Ces résultats montrent i) que les effets du R-CPP sont reproductibles et fidèles et ii) que les résultats négatifs obtenus avec le PPPA ne peuvent être attribuables aux sites d'injection. Il est peu probable que l'effet négatif soit dû à la plus faible affinité du PPPA pour les récepteurs GluN2A puisqu'elle n'est que seulement 3 fois inférieure à celle du R-CPP. D'autres facteurs qui contribuent à l'action pharmacologique d'une drogue injectée *in situ* tel la liposolubilité, la liaison non-spécifique, et la diffusion dans l'espace extracellulaire pourraient peut-être expliquer les

résultats avec le PPPA. Nous avons donc augmenté la dose par un facteur de 10-20 et testé un nouveau groupe de rats avec le PPPA seulement.

Les résultats présentés à la figure 4 de l'article montrent que le PPPA a produit aux deux doses testées une augmentation significative de la récompense telle que mesurée par une réduction de la valeur M50; cette augmentation était accompagnée d'une augmentation de la réponse maximale. Les effets du PPPA sont très similaires à ceux obtenus avec le R-CPP. Ainsi, sur la base de ces résultats, on ne peut pas infirmer l'hypothèse 2 et par conséquent on peut inférer que le PPPA a amplifié la récompense.

La similarité des résultats obtenus avec le R-CPP et le PPPA suggère que leurs effets sont dus à une, ou des, action(s) pharmacologique(s) commune(s). Puisque le PPPA, à l'instar du R-CPP, possède une affinité préférentielle pour les récepteurs NMDA qui contiennent les sous-unités GluN2A, il est possible de conclure que les changements qu'ils induisent sont dus à une action antagoniste à ce sous-type de récepteur. On ne peut toutefois écarter la possibilité d'une action sur un autre sous-type de récepteur contenant notamment les sous-unités GluN2B. En effet, l'affinité du R-CPP et du PPPA pour les sous-unités GluN2B est respectivement sept et quatre fois moins élevée que pour les sous-unités GluN2A, ce qui ne permet pas de qualifier ses molécules de sélectives pour le GluN2A. Sur la base des données disponibles dans la littérature (voir Introduction, section Régulation glutamatergique de la récompense), on pourrait s'attendre à ce qu'une action antagoniste GluN2B atténue la récompense, un effet opposé à celui observé avec le R-CPP



et le PPPA. Il est possible que l'effet mesuré après l'injection de R-CPP et de PPPA représente un effet net sur chacun des sous-types de récepteurs, avec une prédominance d'effet amplificateur. Pour mieux comprendre la contribution de chacune de ces sous-unités GluN2 nous avons étudié l'effet du Ro04-5595, un antagoniste sélectif GluN2B.

Une troisième hypothèse a donc été formulée et testée :

Hypothèse 3. L'injection de Ro04-5595 dans le MV va atténuer la récompense induite par la stimulation électrique du MP, un effet qui sera dépendant de la dose et du temps.

Puisqu'aucune étude sur l'effet de cet antagoniste injecté dans le MV sur la récompense n'a été réalisée à ce jour, il fut aussi nécessaire d'effectuer une expérience pilote afin de déterminer la dose de Ro04-5595 qui serait efficace. Un groupe de rats a donc été testé avec des doses équimolaires de Ro04-5595 et de R-CPP (82,5 pmol/0,5ul/hémisphère). Les résultats (voir Figure 7, Annexe 2) montrent que le R-CPP a produit une augmentation de la récompense (diminution de la valeur M50) et de la réponse maximale alors que le Ro04-5595, injecté aux mêmes sites dans le MV, n'a produit aucun effet. Ces résultats montrent à nouveau que les effets du R-CPP sont reproductibles et que les résultats négatifs obtenus avec le Ro04-5595 ne peuvent être attribuables aux sites d'injection. Toutefois, il est possible que d'autres variables telles que celles évoquées dans le cas du PPPA puissent avoir contribué à l'effet négatif observé avec cette dose de Ro04-5595. Pour éliminer cette hypothèse nous avons testé des doses 10-20

et 40 fois plus élevées chez un nouveau groupe de rats; ces rats ont été testés avec le Ro04-5595 seulement.

Les résultats présentés aux figures 5 et 6 de l'article montrent que le Ro04-5595 n'a produit aucun changement de la récompense et de la réponse maximale. La question qui se pose lorsqu'on est confronté à des résultats négatifs est de savoir si le composé administré était actif. Des études effectuées dans notre laboratoire (Rompré and Lévesque 2012) ont montré que l'injection d'une dose similaire de Ro04-5595 (1,2 nmol/0,5µl/hémisphère) dans le MV amplifie l'effet stimulant de la neurotensine sur l'activité locomotrice, confirmant ainsi son action pharmacologique dans le MV. Sur la base de ces résultats, on peut infirmer l'hypothèse 3 et conclure qu'une action antagoniste aux récepteurs NMDA composés de GluN2B ne produit pas d'inhibition de la récompense, et ne peut expliquer les résultats obtenus avec le PPPA et le R-CPP.

Un grand nombre d'études montrent que la récompense induite par la stimulation électrique intracérébrale est dépendante de la neurotransmission dopaminergique dans le MV (voir introduction). Aussi, si les neurones dopaminergiques expriment seulement des récepteurs NMDA comprenant la sous-unité GluN2B, l'injection de Ro04-5595 devrait atténuer l'effet du glutamate sur ces neurones et réduire la décharge en bouffée. Puisque ce mode de décharge est associé à une plus grande sécrétion synaptique de dopamine (Gonon 1988), sa réduction devrait se traduire par une inhibition de la récompense.

Il a été démontré que l'activation du circuit de la récompense par les drogues d'abus entraîne une augmentation de l'intégration de sous-unités GluN2B aux hétérotrimères contenant la sous-unité GluN2A (Schilstrom, Yaka et al. 2006). Il est possible que la stimulation électrique ait provoqué le même type d'intégration GluN2B vers GluN2A. Puisque les récepteurs NMDA comprenant GluN2A sont préférentiellement exprimés par des neurones non-dopaminergiques, l'action attendue du Ro04-5595 aurait pu être modifiée voire atténuée. Cette hypothèse postule toutefois que les effets du Ro04-5595 sur les cellules dopaminergiques et non-dopaminergiques se sont annulés mutuellement, un postulat difficilement démontrable. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer les résultats est que les récepteurs NMDA comprenant la sous-unité GluN2B ne contribuent pas à l'effet de récompense induite par la stimulation électrique du MP.

Avant de discuter du rôle du glutamate dans la récompense, une question importante se pose à savoir si la réduction du seuil de récompense observée avec le R-CPP et le PPPA pourrait être attribuable à l'augmentation de la réponse maximale. Certaines observations et analyses portent à croire que ce n'est pas le cas. D'abord, nous avons observé une dissociation entre l'augmentation de la récompense et de la réponse maximale suite à l'injection de R-CPP (voir ci-haut). Aussi l'analyse corrélacionnelle présentée dans l'article montre que pour chaque dose de R-CPP testée, le changement de la réponse maximale explique moins de 2% de la variance du changement de seuil. Dans le cas du PPPA, une corrélation positive est observée, ce qui appuie d'avantage le fait que,

dans notre cas, la diminution du M50 n'est pas associée à l'augmentation de l'ASY. De plus, le pourcentage de variance expliquée est de 29% à la dose de 0,825 nmol, mais il est inférieur à 1% à la dose de 1,65 nmol. Ces observations ne sont pas étonnantes puisque le calcul de l'index M50 tient compte du changement de la réponse maximale (Edmonds and Gallistel 1974; Miliaressis, Rompré et al. 1986). On peut donc conclure que les changements du seuil de récompense sont spécifiques et résultent soit d'une synergie entre l'effet de récompense induit par la stimulation électrique et l'action des drogues, soit d'une amplification du signal de récompense induit par la stimulation électrique.

Selon le modèle du déplacement, la réponse maximale reflète la limitation physique de l'animal et non la limite de l'effet de récompense induit par la stimulation électrique (Miliaressis and Malette 1987; Waraczynski, Stellar et al. 1987). Même si l'intensité de la récompense induite par la stimulation est une fonction de la fréquence, à un certain niveau l'animal est physiquement incapable de produire un plus grand nombre de réponses opérantes par unité de temps. Ainsi, des traitements pharmacologiques qui altèrent la capacité motrice de l'animal réduisent sélectivement la réponse maximale. On ne peut toutefois exclure l'hypothèse que la mesure de la réponse maximale reflète en partie la motivation. Le protocole de stimulation comprend un intervalle fixe de 1 seconde ce qui laisse à l'animal plus d'une demi-seconde (i.e. 600 msec). Si la motivation est plus grande, on peut s'attendre à ce que l'animal concentre plus de temps à la tâche et réponde avec une plus grande vigueur. Le fait que le PPPA augmente le taux de réponse

maximale tandis que le R-CPP produit un changement similaire pour une courte durée de l'expérience, laisse croire que le R-CPP produit un effet moins puissant que le PPPA sur cette variable. La réponse opérante utilisée ne permet pas de dissocier la motivation de la récompense. Une méthode alternative pour pallier à ce manque serait d'utiliser une allée comprenant un compartiment de départ et un compartiment d'arrivée tel qu'utilisé par Gallistel (1974). Il serait donc intéressant de comparer les effets du R-CPP à ceux du PPPA au moyen de cette méthodologie. Arvanitogiannis et coll. (2008) ont aussi développé un modèle qui permet de dissocier l'effet d'un traitement pharmacologique sur l'amplitude de la récompense et sur le temps (effort à fournir) que l'animal est prêt à consacrer à la tâche opérante pour obtenir la récompense. Hernandez *et al.* (2010) ont montré que la cocaïne agit principalement en augmentant l'effort prêt à fournir, ce qui suggère que cette variable est dépendante de la neurotransmission dopaminergique. Ce protocole expérimental exige toutefois plusieurs heures de test; il serait difficile de l'appliquer avec le R-CPP et le PPPA puisque l'effet de drogues injectées *in situ* est de courte durée.

Enfin, étant donné que l'administration répétée de stimulations électriques, ainsi que l'implantation d'électrodes et de canules intracérébrales peuvent influencer la pharmacologie de la voie de la récompense, des études ultérieures devraient être effectuées pour contourner ce problème. Des ARN d'interférence (ARNi) pourront être utilisés afin de rendre silencieuse l'expression des sous-unités GluN2A et/ou GluN2B. En

détruisant les ARNm des sous-unités GluN2A et GluN2B avant la traduction, un lien direct pourra être établi entre les comportements observés et l'absence de ces sous-unités.

### **Expression des sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA dans le MV**

À la lumière des résultats obtenus, on peut suggérer que les récepteurs NMDA du MV exprimant les sous-unités GluN2A n'ont pas le même rôle dans la récompense et ne sont pas situés sur les mêmes neurones que ceux exprimant des sous-unités GluN2B. Des études antérieures appuient cette hypothèse. Une analyse détaillée des réponses synaptiques glutamatergiques par enregistrements électrophysiologiques des neurones dopaminergiques de la substance noire suggère que ces neurones n'expriment pas la sous-unité GluN2A (Jones and Gibb 2005; Suarez, Zhao et al. 2010). Il a aussi été proposé que la sous-unité GluN2B est exprimée lors de la croissance et du développement, ou bien suite à un stress, et est graduellement remplacée par la sous-unité GluN2A (Monyer, Burnashev et al. 1994; Sheng, Cummings et al. 1994). Ainsi, la régulation des sous-unités GluN2A et GluN2B semble muable et soumise à des variables ontogénétiques et physiologiques. Pour déterminer si les sous-unités GluN2A et GluN2B sous-tendent les mêmes fonctions à des périodes de développement différentes ou bien si leurs fonctions étaient tout simplement différentes, Wang et coll. (2011) ont développé un modèle de souris transgénique où les sous-unités GluN2B sont remplacés par les sous-unités GluN2A. Mis à part le haut taux de mortalité périnatale qui démontre le rôle de la sous-unité GluN2B dans le développement et la croissance, les souris transgéniques atteignant l'âge adulte

présentent une atténuation du comportement d'exploration social et une augmentation de l'activité locomotrice par rapport aux souris sauvages. Cela suggère que la surexpression de la sous-unité GluN2A ne peut compenser pour la déplétion de la sous-unité GluN2B. Cette étude est d'autant plus pertinente, car elle montre que les souris dépourvues de la sous-unité GluN2B démontrent un déficit sévère lors de l'induction de la potentialisation à long terme (PLT), un mécanisme qui sous-tend la plasticité synaptique responsable de l'apprentissage (Wang, Held et al. 2011). Il est intéressant de mentionner que Kauer a proposé un modèle qui stipule que la PLT est produite seulement sur les synapses excitatrices des neurones dopaminergiques et non sur les synapses excitatrices des neurones GABA (Kauer 2004). Ainsi, si la PLT est possible seulement aux synapses excitatrices dopaminergiques et que seulement la sous-unité GluN2B est capable de produire la PLT, on peut en conclure que les récepteurs NMDA exprimés par les neurones dopaminergiques sont principalement composés de sous-unités GluN2B.

### **Modulation positive de la transmission dopaminergique du MV par le glutamate**

L'on sait déjà que l'activité dopaminergique du MV alterne entre deux modes de décharge, soit tonique et phasique et qu'un effet de récompense est associé à une transition entre ces deux modes d'activité neuronale. Ce mode de décharge n'est pas déterminé par le stimulus renforçant, mais bien par la différence entre une récompense reçue et une récompense attendue (Schultz 1998); de plus en plus d'études sur le sujet suggèrent que cette transition est dépendante du glutamate. La pertinence de ce

mécanisme glutamatergique pour la récompense induite par la stimulation électrique est appuyée par les études de Yeomans (1993) qui ont démontré qu'une inhibition des neurones du tegmentum pédonculopontin (PPTg), une source de projections cholinergiques et glutamatergiques au MV, diminue la récompense produite par l'ASI. De plus, Okada *et al.* (2009) ont fait des enregistrements électrophysiologiques des neurones du PPTg chez des primates pendant la présentation de stimuli qui prédisent une récompense soit de grande soit de faible amplitude. Ils ont identifié deux populations de neurones excitateurs dans le PPTg qui transmettent l'information relative à la récompense; une première semble être active dès la présentation du stimulus et responsable de la prédiction du signal de récompense, et une deuxième qui s'active seulement lorsque la récompense est obtenue. Quoique la nature exacte de ces signaux ainsi que les sites de projection des neurones qui les génèrent soient inconnus, ils appuient l'hypothèse d'un rôle du PPTg dans la modulation de la récompense.

Des études par Grace *et al.* (2007), montrent qu'en bloquant la transmission glutamatergique à l'ATV l'on empêche le mode de décharge phasique, mais que l'application locale de glutamate n'est pas suffisante pour produire la transition de tonique à phasique à elle-seule; proposant ainsi un double-mécanisme de régulation qui agit en synergie mais qui n'implique pas seulement le glutamate. En accord avec les études d'Okada (2009), le modèle suggéré par Grace stipule que la transition du mode de décharge tonique à phasique est dirigée par le glutamate en provenance des noyaux PPTg



et LTDg et requiert un influx cholinergique (Grace, Floresco et al. 2007). Ce modèle d'activation glutamatergique dirigé par l'acétylcholine est soutenu par des travaux récents de Zellner (2010) qui suggèrent que l'acétylcholine est le neurotransmetteur associé au stimulus conditionné (*environmental cue*), tandis que le glutamate est associé au stimulus inconditionné (*reward-associated cue*). Cette étude suggère que l'intégration de ces deux signaux au MV entraîne l'activation de canaux NMDA et résulte en la PLT; un phénomène relié à l'apprentissage, dans ce cas-ci, l'association du stimulus conditionné au stimulus inconditionné. Tel qu'énoncé précédemment, les études de Kauer (2004) démontrent que seulement les récepteurs NMDA au niveau des synapses asymétriques des neurones dopaminergiques sont capables d'induire une PLT. D'autres études par Ranaldi (2011) montrent aussi que cette neuroplasticité est nécessaire seulement pour l'acquisition (i.e. apprentissage) du comportement dirigé et non pas pour l'expression de celui-ci. Ainsi, les récepteurs NMDA des éléments dopaminergiques formant des synapses asymétriques seraient nécessaires seulement lors de l'acquisition d'un comportement et non pour son expression.

### **Modulation négative de la transmission dopaminergique du MV par le glutamate**

Il est bien connu que le MV comprend une population de neurones GABAergiques et des terminaisons GABAergiques qui ont pour origine dans des régions corticales et sous-corticales; ces éléments GABAergiques établissent des liens synaptiques locaux sur les neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques du MV. Les neurones GABAergiques

semblent permettre une modulation plus fine des signaux associés à la présentation de stimuli renforçants. Des études récentes de Cohen *et al.* (2012) ont permis d'identifier, par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* jumelés à la méthode d'optogénétique, deux populations de neurones GABAergiques dans le MV, une qui est active suite à la présentation d'un stimulus conditionné positif (associé à une récompense) et une autre qui est inhibée; cette régulation GABAergique est indépendante de la présentation de la récompense ou du stimulus inconditionné. Alors que les neurones dopaminergiques sont inhibés par un stimulus conditionné selon l'ampleur de la récompense attendue; la nature des afférences excitatrices est inconnue, mais les observations antérieures d'Okada *et al.* (2009) rapportent une population d'éléments excitateurs (possiblement glutamatergique) du PPTg qui exhibe une activité soutenue suite à la présentation d'un stimulus aversif; les neurones GABAergiques sont ainsi excités. La régulation négative de l'activité dopaminergique du MV par les neurones GABAergiques pourrait signaler une valence négative, ou une aversion. Des études suggèrent que cette régulation pourrait venir de l'*habenula* latérale (LHb). Cette région diencephalique est activée en présence d'un stimulus aversif et envoie des projections glutamatergiques excitatrices aux éléments GABAergiques au tegmentum rostromédian (RMTg). Le RMTg est une structure postérieure du MV qui est composée de neurones GABAergiques qui font synapses sur les neurones dopaminergiques et qui inhibent ces neurones (Jhou, Fields et al. 2009). L'activation des neurones du RMTg par un stimulus aversif entraînerait une inhibition de la transmission dopaminergique dans le MV.

Selon une approche fonctionnelle, l'activation de LHb devrait inhiber la récompense alors que son inhibition devrait l'augmenter. Des études cliniques démontrent que la technique de stimulation intracrânienne profonde (*Deep Brain Stimulation, DBS*) qui a pour effet d'inhiber l'*habenula* exhibe une amélioration significative des symptômes d'anhédonie chez les patients déprimés (Lecca, Melis et al. 2011), suggérant une désinhibition du système de récompense. Morissette et Boye (Morissette and Boye 2008) ont aussi étudié l'impact d'une lésion unilatérale de l'*habenula* sur la récompense induite par la stimulation électrique du MP chez le rat : ils ont toutefois rapporté une atténuation de la récompense et non une inhibition. Ces résultats montrent qu'il existe un lien entre l'*habenula* et le circuit neuronal de la récompense et que ce lien est fonctionnellement complexe.

Bien que notre étude se concentre plutôt sur le MV que sur le RMTg, d'autres expériences démontrent que le LHb envoie fait aussi des synapses asymétriques excitatrices sur les éléments non-dopaminergiques du MV plus antérieur, où se trouve l'ATV (Omelchenko, Bell et al. 2009). En faisant abstraction de l'origine des projections glutamatergiques, l'intégralité de ces résultats indique que la présence de récepteurs NMDA situés sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral a un rôle de régulation négative de la récompense; ce qui va de pair avec nos résultats montrant une désinhibition de la récompense lors de l'administration de R-CPP ou de PPPA.

### **Implications possibles des sous-unités GluN2D dans la régulation de la récompense**

Très peu d'études se sont intéressées aux rôles des sous-unités GluN2C et GluN2D dans la modulation des neurones mésencéphaliques et leurs fonctions. Pourtant, Jones et Gibbs (2005) ont montré la présence d'une population de récepteurs NMDA portant la sous-unité GluN2B et/ou GluN2D dans la substance noire. Dans la mesure où ces sous-types de récepteurs sont aussi présents dans les noyaux plus médians du MV, leur implication possible ne peut être ignorée. Hagino *et al.* (2010) ont étudié les effets de la déplétion de ces deux sous-unités sur le comportement des rongeurs et le taux de dopamine extracellulaire (au striatum et CPF) suite à des injections de PCP, un antagoniste des récepteurs NMDA. Ils ont rapporté une augmentation de l'activité locomotrice et une augmentation du taux de dopamine extracellulaire suite à l'injection de PCP chez les rats naïfs ainsi que chez les rats dépourvus de la sous-unité GluN2A, mais pas ceux dépourvus de GluN2D; ceci suggère que les effets du PCP sur la transmission dopaminergique sont dus à l'action antagoniste aux récepteurs NMDA comprenant la sous-unité GluN2D, mais pas la sous-unité GluN2A. Des études supplémentaires sont requises afin de déterminer si les effets facilitateurs de la récompense observés lors de nos études avec le R-CPP et le PPPA sont attribuables au blocage de la sous-unité GluN2D et non pas seulement à la sous-unité GluN2A

## Étude de l'activité locomotrice

Une expérience complémentaire a été réalisée avec les animaux pour lesquels nous ne parvenions pas à induire un comportement d'autostimulation dû au mauvais positionnement de l'électrode (voir Annexe III). Chaque animal qui ne pouvait pas être inclus dans les expériences d'ASI, mais qui présentait une bonne localisation des canules d'injection (voir Figure 8, Annexe IV) a donc été utilisé pour déterminer si l'injection de R-CPP pouvait induire une augmentation de l'activité locomotrice. Le comportement d'autostimulation est accompagné d'une augmentation de l'activité d'exploration. Lors de la présentation de la stimulation d'amorce, l'animal renifle intensément et exprime une locomotion dirigée vers le mécanisme lui permettant de s'autoadministrer la stimulation. Selon Wise et Bozarth (1987) les drogues d'abus induisent une activité d'exploration dite psychomotrice en agissant sur des mécanismes qui font partie du circuit neuronal de la récompense. Cette expérience a permis de déterminer si l'effet du R-CPP était spécifique à la stimulation électrique.

Tout d'abord, un premier groupe a reçu soit la plus forte dose de R-CPP (82,5pmol) ou de la saline physiologique (véhicule) afin de vérifier si les effets amplificateurs de la récompense lors des études d'ASI étaient limités à la stimulation électrique. Tel qu'observé à la figure 9 de l'Annexe IV, le R-CPP, en comparaison avec le véhicule, entraîne une augmentation significative de la réponse ambulatoire et non ambulatoire

pendant les 60 minutes suivant l'injection. Ces résultats montrent que l'action du R-CPP n'est pas seulement dépendante de la stimulation électrique du circuit de récompense.

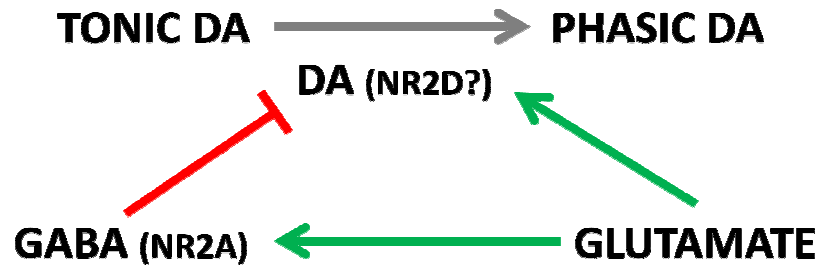
Ensuite, un deuxième groupe a reçu le même traitement que le premier groupe (R-CPP ou véhicule), mais cette fois-ci l'injection intracérébrale était précédée d'une injection intrapéritonéale d'halopéridol (10µg/kg, dans acide tartarique 0,3%), un antagoniste des récepteurs D<sub>2</sub> de la dopamine, ou de son véhicule 30 minutes avant le test. Ce deuxième groupe donne une piste de réflexion quant à l'implication de la dopamine dans les effets comportementaux observés par le R-CPP. Si l'on compare l'activité ambulatoire des animaux ayant reçu seulement le R-CPP avec celle du groupe ayant reçu l'halopéridol en plus du R-CPP (Figure 9, Annexe IV), l'on observe une diminution de l'activité ambulatoire suite à l'inhibition des récepteurs D<sub>2</sub>; cette diminution d'activité est toutefois non-significative due possiblement au petit nombre d'animaux testés et à la grande variabilité des résultats. Par contre, bien qu'elle soit moins prononcée qu'avec le R-CPP seul, si l'on compare l'activité locomotrice du groupe halopéridol/R-CPP avec celle du groupe contrôle veh/veh, l'on note une augmentation significative de l'activité ambulatoire lors des 60 premières minutes de test. Ainsi, il est possible que les effets stimulants produits par le R-CPP ne soient pas directement dépendants de la transmission dopaminergique; un résultat similaire à celui déjà obtenu par Cornish *et al.* (2001) suite à des injections d'AP-5. Il est toutefois possible que la dose halopéridol utilisée n'ait pas été suffisante pour

atténuer complètement l'effet du R-CPP. Ceci devrait être vérifié dans une étude ultérieure.

De plus, étant donné qu'aucun changement n'est observé entre le groupe contrôle pour le R-CPP (veh/veh) et le groupe contrôle pour l'halopéridol (halopéridol/veh), nous pouvons conclure qu'à elle seule, l'injection d'halopéridol n'est pas suffisamment élevée pour affecter l'activité locomotrice. Ce fait est d'autant plus appuyé par le panneau du bas de la Figure 9 (Annexe 4), qui montre que la dose d'Halopéridol utilisée n'augmente pas la durée de mouvements non-ambulateurs. Ces mesures de mouvement non-ambulateurs viennent ajouter à la crédibilité de nos résultats, étant donné que la diminution d'activité ambulatoire du groupe halopéridol/veh n'est pas corrélée avec l'apparition de stéréotypies typiquement observée avec les inhibiteurs dopaminergiques administrés à des doses plus élevées.

### **Résumé des acquis : modèle proposé**

Si l'on tente à partir de nos résultats et de la littérature actuelle de faire un portrait très simplifié du rôle des récepteurs NMDA sur la régulation de la récompense, l'on obtiendrait un modèle semblable à celui qui est proposé à la figure 5. Le modèle est basé sur le postulat que la récompense résulte d'une transition entre un mode de décharge tonique à phasique de la transmission dopaminergique de la voie mésolimbique.



**Figure 5.** Modèle neuronal proposé de la régulation glutamatergique de la voie mésolimbique impliquée dans la récompense. Des projections glutamatergiques activent les éléments GABAergiques et dopaminergiques du MV. Ces différentes projections sont, en partie, responsables de la régulation négative (par les sous-unités NR2A) et positive (possiblement par les sous-unités NR2D?) de la décharge en bouffée de la dopamine (*phasic DA*).

Il est aussi postulé que les interneurons GABAergiques du MV sont porteurs des sous-unités GluN2A (ou GluN2D (Hagino, Kasai et al. 2010)), mais pas GluN2B. Ces éléments GABAergiques reçoivent aussi une forte innervation glutamatergique en provenant de divers noyaux limbiques impliqués dans la motivation; il exercerait une modulation négative sur les neurones dopaminergiques. La levée de cette inhibition pourrait signaler la récompense ou encore l'amplifier tel que nous avons observé avec le R-CPP et le PPPA.

Ce portrait est certes qu'une version simpliste d'un circuit fort probablement très complexe. Mais il illustre bien le rôle intégrateur prépondérant des neurones du MV dans la récompense. Ce modèle ne prend pas en compte la présence d'interneurones et de neurones de projections glutamatergiques, ainsi que de la cotransmission (et/ou



réroaction) du glutamate-dopamine au striatum (Lapish, Seamans et al. 2006; Alsio, Nordenankar et al. 2011; El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011).

## Conclusions et perspectives

La stimulation électrique du mésencéphale postérieur produit un puissant effet de récompense. Suite à l'injection intra-MV du R-CPP, un antagoniste préférentiel aux sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA, nous avons mesuré une augmentation significative de l'effet de récompense traduite par une augmentation de la réponse opérante; un effet qui était fonction de la dose et du temps. Ces effets amplificateurs ont été reproduits par l'injection du PPPA, un antagoniste NMDA ayant des affinités similaires au R-CPP, mais pas par le Ro04-5595, un antagoniste spécifique aux sous-unités GluN2B. Ces résultats démontrent que le glutamate est responsable de la modulation négative du circuit de la récompense, un effet médié par les récepteurs NMDA pourvus de la sous-unité GluN2A, mais pas GluN2B. Ainsi, dans le cas inverse, une augmentation de la neurotransmission glutamatergique via la sous-unité GluN2A résulterait en une inhibition du circuit neuronal de la récompense, un effet qui se traduirait par une hyposensibilité aux stimuli renforçants.

Bien que des études supplémentaires de mesure de l'activité locomotrice ont servi à confirmer que les effets du R-CPP sur la réponse opérante n'étaient pas un artifice issu de la stimulation électrique, des études plus poussées devront maintenant être effectuées afin de s'assurer que les effets observés sont réellement attribuables aux sous-unités étudiées et non à des sous-produits de l'injection. L'utilisation d'ARN d'interférence sera

une technique à exploiter, car elle permet d'observer les effets dus à l'absence totale d'une sous-unité spécifique tout en évitant l'utilisation de composés chimiques risquant d'avoir des interactions pharmacologiques. Ensuite, il sera intéressant d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques du MV afin de localiser et d'identifier la nature des neurones portant les sous-unités GluN2A.

Non seulement cette étude permet de mieux comprendre le rôle qu'occupe les différentes sous-unités des récepteurs NMDA dans la récompense, mais elle pourrait s'avérer d'une importance capitale sur le point de vue clinique. Il a déjà été démontré que la kétamine a un effet antidépresseur rapide et puissant, mais son mécanisme d'action demeure toujours inconnu (Berman, Cappiello et al. 2000; Mathew, Shah et al. 2012). Compte tenu de ses effets psychotropes importants, il est évident que son usage n'est pas recommandé pour le traitement de troubles de l'humeur. Étant donné que la kétamine est reconnue pour son action antagoniste des récepteurs NMDA, plusieurs études tentent déjà d'élucider le rôle de ces récepteurs dans la dépression (Skolnick, Layer et al. 1996), mais aucune ne semble encore s'être penchée sur la question des différentes sous-unités. Sur la base de nos résultats, l'utilisation d'un antagoniste GluN2A pourrait devenir une cible potentielle pour les sujets ayant des symptômes d'hyposensibilité au plaisir ou d'anhédonie.

## Bibliographie

- Albers, D. S., S. W. Weiss, et al. (1999). "Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunits in the substantia nigra pars compacta of the rat." Neuroscience **89**(1): 209-220.
- Alsio, J., K. Nordenankar, et al. (2011). "Enhanced sucrose and cocaine self-administration and cue-induced drug seeking after loss of VGLUT2 in midbrain dopamine neurons in mice." J Neurosci **31**(35): 12593-12603.
- Arvanitogiannis, A., C. Flores, et al. (1997). "Fos-like immunoreactivity in the caudal diencephalon and brainstem following lateral hypothalamic self-stimulation." Behav Brain Res **88**(2): 275-279.
- Arvanitogiannis, A. and P. Shizgal (2008). "The reinforcement mountain: allocation of behavior as a function of the rate and intensity of rewarding brain stimulation." Behav Neurosci **122**(5): 1126-1138.
- Benveniste, M. and M. L. Mayer (1991). "Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine." Biophys J **59**(3): 560-573.
- Berman, R. M., A. Cappiello, et al. (2000). "Antidepressant effects of ketamine in depressed patients." Biol Psychiatry **47**(4): 351-354.
- Bielajew, C. and P. Shizgal (1986). "Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial forebrain bundle." J Neurosci **6**(4): 919-929.
- Boye, S. M. (2005). "Mesencephalic substrate of reward: lesion effects." Behav Brain Res **156**(1): 31-43.
- Boye, S. M., C. Contant, et al. (2002). "Mesencephalic substrate of reward: possible role for lateral pontine tegmental cells." Brain Res **949**(1-2): 188-196.
- Boye, S. M. and P. P. Rompré (1996). "Effect of pimozide on self-stimulation threshold under a continuous and fixed-interval schedule of reinforcement." Behav Brain Res **78**(2): 243-245.
- Boye, S. M. and P. P. Rompré (1996). "Mesencephalic substrate of reward: axonal connections." J Neurosci **16**(10): 3511-3520.
- Cador, M., Y. Bijiou, et al. (1999). "D-amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation." Neuroscience **94**(3): 705-721.
- Carr, D. B. and S. R. Sesack (2000). "Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons." J Neurosci **20**(10): 3864-3873.
- Clements, R. L. and A. J. Greenshaw (2005). "Facilitation of brain stimulation reward by MK-801 (dizocilpine) may be independent of D2-like dopamine receptor stimulation in rats." Psychopharmacology (Berl) **182**(1): 65-74.
- Cohen, J. Y., S. Haesler, et al. (2012). "Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area." Nature **482**(7383): 85-88.

- Conover, K. L. and P. Shizgal (1994). "Competition and summation between rewarding effects of sucrose and lateral hypothalamic stimulation in the rat." Behav Neurosci **108**(3): 537-548.
- Corbett, D. (1989). "Possible abuse potential of the NMDA antagonist MK-801." Behav Brain Res **34**(3): 239-246.
- Cornish, J. L., M. Nakamura, et al. (2001). "Dopamine-independent locomotion following blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area." J Pharmacol Exp Ther **298**(1): 226-233.
- Cull-Candy, S., S. Brickley, et al. (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 327-335.
- David, V., T. P. Durkin, et al. (1998). "Rewarding effects elicited by the microinjection of either AMPA or NMDA glutamatergic antagonists into the ventral tegmental area revealed by an intracranial self-administration paradigm in mice." Eur J Neurosci **10**(4): 1394-1402.
- Dingledine, R., K. Borges, et al. (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacological Reviews **51**(1): 7-61.
- Dobi, A., E. B. Margolis, et al. (2010). "Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons." J Neurosci **30**(1): 218-229.
- Edmonds, D. E. and C. R. Gallistel (1974). "Parametric analysis of brain stimulation reward in the rat: III. Effect of performance variables on the reward summation function." J Comp Physiol Psychol **87**(5): 876-883.
- El Mestikawy, S., A. Wallen-Mackenzie, et al. (2011). "From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters." Nat Rev Neurosci **12**(4): 204-216.
- Elmer, G. I., A. Brockington, et al. (1996). "Cocaine cross-sensitization to dopamine uptake inhibitors: unique effects of GBR12909." Pharmacol Biochem Behav **53**(4): 911-918.
- Fouriez, G. (1995). "Temporal integration in self-stimulation: a paradox lost?" Behav Neurosci **109**(5): 965-971.
- Fouriez, G., C. Bielajew, et al. (1990). "Task difficulty increases thresholds of rewarding brain stimulation." Behav Brain Res **37**(1): 1-7.
- Fouriez, G. and R. A. Wise (1984). "Current-distance relation for rewarding brain stimulation." Behav Brain Res **14**(1): 85-89.
- Gallistel, C. R., P. Shizgal, et al. (1981). "A portrait of the substrate for self-stimulation." Psychol Rev **88**(3): 228-273.
- Gallistel, C. R., J. R. Stellar, et al. (1974). "Parametric analysis of brain stimulation reward in the rat: I. The transient process and the memory-containing process." J Comp Physiol Psychol **87**(5): 848-859.
- German, D. C. and D. M. Bowden (1974). "Catecholamine systems as the neural substrate for intracranial self-stimulation: a hypothesis." Brain Res **73**(3): 381-419.

- Gonon, F. G. (1988). "Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry." Neuroscience **24**(1): 19-28.
- Grace, A. A., S. B. Floresco, et al. (2007). "Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors." Trends Neurosci **30**(5): 220-227.
- Hagino, Y., S. Kasai, et al. (2010). "Essential role of NMDA receptor channel epsilon4 subunit (GluN2D) in the effects of phencyclidine, but not methamphetamine." PLoS One **5**(10): e13722.
- Harris, G. C., M. Wimmer, et al. (2004). "Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine." Neuroscience **129**(3): 841-847.
- Herberg, L. J. and I. C. Rose (1989). "The effect of MK-801 and other antagonists of NMDA-type glutamate receptors on brain-stimulation reward." Psychopharmacology (Berl) **99**(1): 87-90.
- Hernandez, G., Y. A. Breton, et al. (2010). "At what stage of neural processing does cocaine act to boost pursuit of rewards?" PLoS One **5**(11): e15081.
- Ikemoto, S. (2007). "Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex." Brain Res Rev **56**(1): 27-78.
- Jhou, T. C., H. L. Fields, et al. (2009). "The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses." Neuron **61**(5): 786-800.
- Jones, S. and A. J. Gibb (2005). "Functional NR2B- and NR2D-containing NMDA receptor channels in rat substantia nigra dopaminergic neurones." J Physiol **569**(Pt 1): 209-221.
- Karreman, M., B. H. Westerink, et al. (1996). "Excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine release in the ventral striatum." J Neurochem **67**(2): 601-607.
- Kauer, J. A. (2004). "Learning mechanisms in addiction: synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse." Annu Rev Physiol **66**: 447-475.
- Kaufling, J., P. Veinante, et al. (2009). "Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat." J Comp Neurol **513**(6): 597-621.
- Lapish, C. C., J. K. Seamans, et al. (2006). "Glutamate-dopamine cotransmission and reward processing in addiction." Alcohol Clin Exp Res **30**(9): 1451-1465.
- Lassen, M. B., J. E. Brown, et al. (2007). "Brain stimulation reward is integrated by a network of electrically coupled GABA neurons." Brain Res **1156**: 46-58.
- Lecca, S., M. Melis, et al. (2011). "Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells." Neuropsychopharmacology **36**(3): 589-602.

- Luo, J. H., Y. H. Wang, et al. (1996). "The majority of cortical NMDA receptors contain three subunits (NR1/NR2A/NR2B)." Faseb Journal **10**(3): 812-812.
- Marcangione, C. and P. P. Rompré (2008). "Topographical Fos induction within the ventral midbrain and projection sites following self-stimulation of the posterior mesencephalon." Neuroscience **154**(4): 1227-1241.
- Mathew, S. J., A. Shah, et al. (2012). "Ketamine for treatment-resistant unipolar depression: current evidence." CNS Drugs **26**(3): 189-204.
- Miliaressis, E. and J. Malette (1987). "Summation and saturation properties in the rewarding effect of brain stimulation." Physiol Behav **41**(6): 595-604.
- Miliaressis, E. and P. P. Rompré (1987). "Effects of concomitant motor reactions on the measurement of rewarding efficacy of brain stimulation." Behav Neurosci **101**(6): 827-831.
- Miliaressis, E., P. P. Rompré, et al. (1982). "Psychophysical method for mapping behavioral substrates using a moveable electrode." Brain Res Bull **8**(6): 693-701.
- Miliaressis, E., P. P. Rompré, et al. (1986). "The curve-shift paradigm in self-stimulation." Physiol Behav **37**(1): 85-91.
- Moisan, J. and P. P. Rompré (1998). "Electrophysiological evidence that a subset of midbrain dopamine neurons integrate the reward signal induced by electrical stimulation of the posterior mesencephalon." Brain Res **786**(1-2): 143-152.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.
- Morissette, M. C. and S. M. Boye (2008). "Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward." Behav Brain Res **187**(1): 17-26.
- Narayanan, S., D. Willins, et al. (1996). "Role of dopaminergic mechanisms in the stimulatory effects of MK-801 injected into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens." Pharmacol Biochem Behav **54**(3): 565-573.
- Okada, K., K. Toyama, et al. (2009). "Different pedunculo-pontine tegmental neurons signal predicted and actual task rewards." J Neurosci **29**(15): 4858-4870.
- Olds, J. and P. Milner (1954). "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain." J Comp Physiol Psychol **47**(6): 419-427.
- Omelchenko, N., R. Bell, et al. (2009). "Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area." Eur J Neurosci **30**(7): 1239-1250.
- Omelchenko, N. and S. R. Sesack (2005). "Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area." J Comp Neurol **483**(2): 217-235.
- Papp, M. and E. Moryl (1994). "Rewarding properties of non-competitive and competitive NMDA antagonists as measured by place preference conditioning in rats." Pol J Pharmacol **46**(1-2): 79-81.
- Pavlov, I. P. (1927). "Conditioned reflexes : An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex." Classics in the History of Psychology (An internet resource developed by Christopher D. Green).

- Phillipson, O. T. (1979). "The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat." J Comp Neurol **187**(1): 85-98.
- Ranaldi, R., P. Bauco, et al. (1997). "Synergistic effects of cocaine and dizocilpine (MK-801) on brain stimulation reward." Brain Res **760**(1-2): 231-237.
- Ranaldi, R., K. Kest, et al. (2011). "The effects of VTA NMDA receptor antagonism on reward-related learning and associated c-fos expression in forebrain." Behav Brain Res **216**(1): 424-432.
- Ranck, J. B., Jr. (1975). "Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review." Brain Res **98**(3): 417-440.
- Rompré, P.-P. and D. Lévesque (2012). "Blockade of ventral midbrain NMDA receptors prevents Neurotensin-induced sensitization to amphetamine (abstract)." Abstracts from the 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Stockholm, Sweden, 3–7 June 2012  
The International Journal of Neuropsychopharmacology, Volume 15, Supplement S1, June 2012,: 75.
- Rompré, P. P. and S. Boye (1989). "Localization of reward-relevant neurons in the pontine tegmentum: a moveable electrode mapping study." Brain Res **496**(1-2): 295-302.
- Rompré, P. P. and E. Miliareisis (1985). "Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation." Brain Res **359**(1-2): 246-259.
- Rompre, P. P. and R. A. Wise (1989). "Opioid-neuroleptic interaction in brainstem self-stimulation." Brain Res **477**(1-2): 144-151.
- Schilstrom, B., R. Yaka, et al. (2006). "Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors." J Neurosci **26**(33): 8549-8558.
- Schultz, W. (1998). "Predictive reward signal of dopamine neurons." J Neurophysiol **80**(1): 1-27.
- Sheng, M., J. Cummings, et al. (1994). "Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex." Nature **368**(6467): 144-147.
- Shizgal, P., C. Bielajew, et al. (1980). "Behavioral methods for inferring anatomical linkage between rewarding brain stimulation sites." J Comp Physiol Psychol **94**(2): 227-237.
- Skinner, B. F. (1934). "A Discrimination without Previous Conditioning." Proc Natl Acad Sci U S A **20**(9): 532-536.
- Skolnick, P., R. T. Layer, et al. (1996). "Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression." Pharmacopsychiatry **29**(1): 23-26.
- Suarez, F., Q. Zhao, et al. (2010). "Functional heterogeneity of NMDA receptors in rat substantia nigra pars compacta and reticulata neurones." Eur J Neurosci **32**(3): 359-367.
- Thorndike, E. L. (1911). "Animal Intelligence." Classics in the History of Psychology (An internet resource developed by Christopher D. Green).



- Tzschentke, T. M. and W. J. Schmidt (1999). "Memantine does not substantially affect brain stimulation reward: comparison with MK-801." Brain Res **845**(2): 192-198.
- Wang, C. C., R. G. Held, et al. (2011). "A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function." Neuron **72**(5): 789-805.
- Wang, Y. H., T. Z. Bosy, et al. (1995). "Characterization of NMDA receptor subunit-specific antibodies: distribution of NR2A and NR2B receptor subunits in rat brain and ontogenic profile in the cerebellum." J Neurochem **65**(1): 176-183.
- Waraczynski, M., M. Perkins, et al. (1999). "Lesions of midline midbrain structures leave medial forebrain bundle self-stimulation intact." Behav Brain Res **103**(2): 175-184.
- Waraczynski, M., J. R. Stellar, et al. (1987). "Reward saturation in medial forebrain bundle self-stimulation." Physiol Behav **41**(6): 585-593.
- Westerink, B. H., H. F. Kwint, et al. (1996). "The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain." J Neurosci **16**(8): 2605-2611.
- Wise, R. A. (1978). "Catecholamine theories of reward: a critical review." Brain Res **152**(2): 215-247.
- Wise, R. A. (1996). "Addictive drugs and brain stimulation reward." Annu Rev Neurosci **19**: 319-340.
- Wise, R. A. and M. A. Bozarth (1987). "A psychomotor stimulant theory of addiction." Psychol Rev **94**(4): 469-492.
- Wise, R. A. and P. P. Rompré (1989). "Brain dopamine and reward." Annu Rev Psychol **40**: 191-225.
- Yamaguchi, T., W. Sheen, et al. (2007). "Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area." Eur J Neurosci **25**(1): 106-118.
- Yeomans, J. S. (1989). "Two substrates for medial forebrain bundle self-stimulation: myelinated axons and dopamine axons." Neurosci Biobehav Rev **13**(2-3): 91-98.
- Yeomans, J. S. and J. K. Davis (1975). "Behavioral measurement of the post-stimulation excitability of neurons mediating self-stimulation by varying the voltage of paired pulses." Behav Biol **15**(4): 435-447.
- Yeomans, J. S., A. Mathur, et al. (1993). "Rewarding brain stimulation: role of tegmental cholinergic neurons that activate dopamine neurons." Behav Neurosci **107**(6): 1077-1087.
- Zellner, M. R. and R. Ranaldi (2010). "How conditioned stimuli acquire the ability to activate VTA dopamine cells: a proposed neurobiological component of reward-related learning." Neurosci Biobehav Rev **34**(5): 769-780.

## Annexe 1.

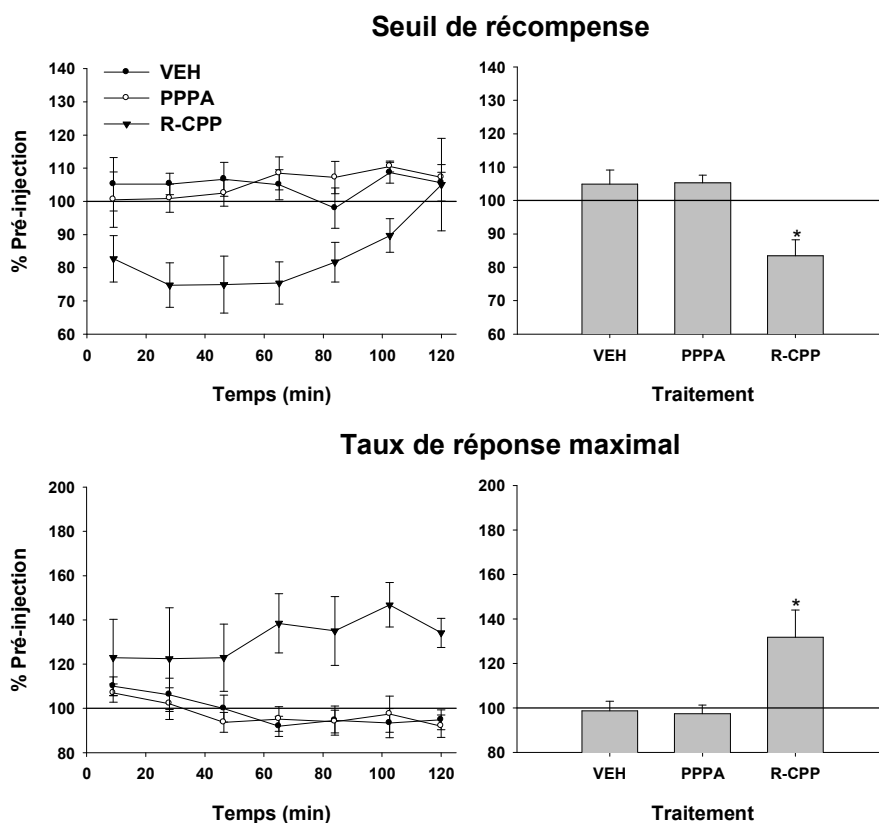


Figure 6. Effets de l'injection mésencéphalique de 82,5 pmol/0,5  $\mu$ l/hémisphère de PPPA et de R-CPP, et du solvant (VEH) sur le seuil de récompense et la réponse maximale (n=5). Les figures de gauche décrivent les variations du seuil (haut) ( $F_{2,8} = 9,89$   $p < 0,05$ ) et de la réponse maximale (bas) ( $F_{2,8} = 7,39$   $p < 0,05$ ) exprimées en % pré-injection à des intervalles de 15 minutes pour chacune des doses. Les figures de droite représentent la variation moyenne des valeurs du seuil ( $F_{12,48} = 1,60$   $p > 0,05$ ) et de la réponse maximale ( $F_{12,48} = 1,60$   $p > 0,05$ ) mesurée au cours de la période de 2 heures suivant l'injection. L'astérisque indique une différence significative avec le groupe VEH ( $p < 0,05$ ).

## Annexe 2.

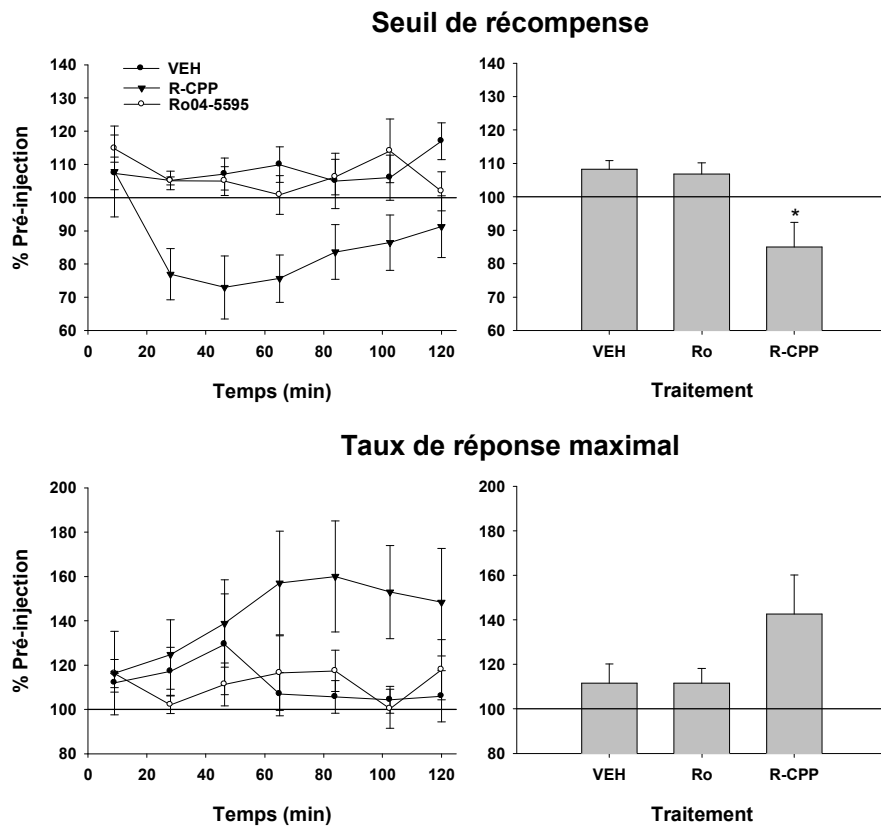


Figure 7. Effets de l'injection mésencéphalique de 82,5 pmol/0,5 $\mu$ l/hémisphère de Ro04-5595 et de R-CPP, et du solvant (VEH) sur le seuil de récompense et la réponse maximale (n=8). Les figures de gauche décrivent les variations du seuil (haut) ( $F_{2,10} = 5,9$   $p < 0,05$ ) et de la réponse maximale (bas) ( $F_{2,10} = 3,55$   $p > 0,05$ ) exprimées en % pré-injection à des intervalles de 15 minutes pour chacune des doses. Les figures de droite représentent la variation moyenne des valeurs du seuil ( $F_{12,60} = 1,45$   $p > 0,05$ ) et de la réponse maximale ( $F_{12,60} = 1,57$   $p > 0,05$ ) mesurée au cours de la période de 2 heures suivant l'injection. L'astérisque indique une différence significative avec le groupe VEH ( $p < 0,05$ ).

## **Annexe 3.**

### **Méthodologie**

Les rats qui ont été inclus dans cette expérience étaient ceux qui n'ont pas pu être entraînés à produire une réponse opérante pour obtenir la stimulation électrique intracérébrale; la stimulation induisait soit des mouvements moteurs, soit un comportement de retrait. Pour cette expérience, le protocole expérimental était le suivant. Les rats ont d'abord été placés dans les enceintes de test pour une période de 60 minutes pour qu'ils s'y habituent. Le jour suivant, ils ont reçu une injection bilatérale de saline (0,9%) stérile (0,5 µl/hémisphère) et ont été placés dans les enceintes de test pour 120 minutes. Une semaine plus tard, ils ont été divisés en quatre groupes, et leurs réponses locomotrices ont été enregistrées après l'un des traitements suivants: véhicule par voie systémique (1 ml/kg, sc) suivi 30 minutes après d'une injection bilatérale de saline (0,5 µl/hémisphère, groupe 1) ou de R-CPP (82,5 pmol/0,5 µl/hémisphère, groupe 2); halopéridol par voie systémique (0.01 mg/kg, sc) suivi 30 minutes après d'une injection bilatérale de saline (0,5 µl/hémisphère, groupe 3) ou de R-CPP (82,5 pmol/0,5 µl/hémisphère, groupe 4). Les réponses locomotrices ont été enregistrées pendant une période de 120 minutes après la seconde injection au moyen du système *OPTO-VARIMEX Auto Track System (Columbus Instr., Columbus, Ohio, USA)*. Les enceintes de test (42x42x35 cm) étaient fabriquées de quatre murs de Plexiglas et d'un plancher grillagé. Sur chaque mur on retrouvait une rangée de 15 cellules photoélectriques sises 1,5 cm au-dessus du plancher permettant de mesurer les mouvements horizontaux. Un autre

ensemble de 15 cellules photoélectriques localisées à 14,5 cm au-dessus du plancher permettait de mesurer les mouvements verticaux. Les données (interruption des cellules photoélectriques) étaient compilées par un logiciel qui permettait de déterminer la distance parcourue au-delà d'une boîte virtuelle de 9,6 par 9,6 cm tracée autour de l'animal; la localisation de l'animal (la boîte virtuelle) était déterminée 10 fois par secondes. Les mouvements détectés à l'intérieur de la boîte étaient quantifiés en seconde et considérés comme des mouvements non-ambulateurs. L'activité verticale était quantifiée par le nombre d'interruptions des cellules photo-électriques. (Voir (Elmer, Brockington et al. 1996) qui ont validé ce système de détection des réponses locomotrices).

## **Histologie**

À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés, les cerveaux prélevés et la localisation des sites d'injection déterminés en utilisant les procédures décrites dans l'article. Les animaux inclus dans l'analyse avaient tous des sites d'injection dans le mésencéphale ventral.

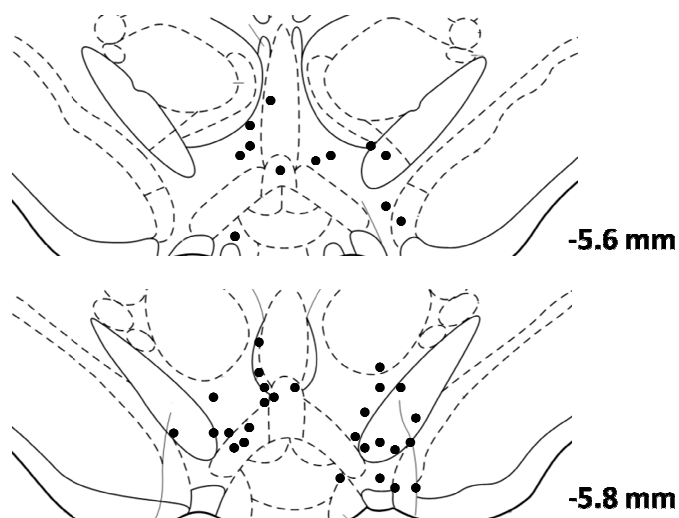
## **Analyse des données**

Les différentes composantes des réponses locomotrices, la distance parcourue, le temps de détection des mouvements non-ambulateurs et le compte des mouvements verticaux, ont été moyennées pour les deux périodes de 60 minutes de test pour chacun des groupes. Les résultats ont été analysés au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (traitement et temps) avec mesures répétées sur le facteur temps. Des

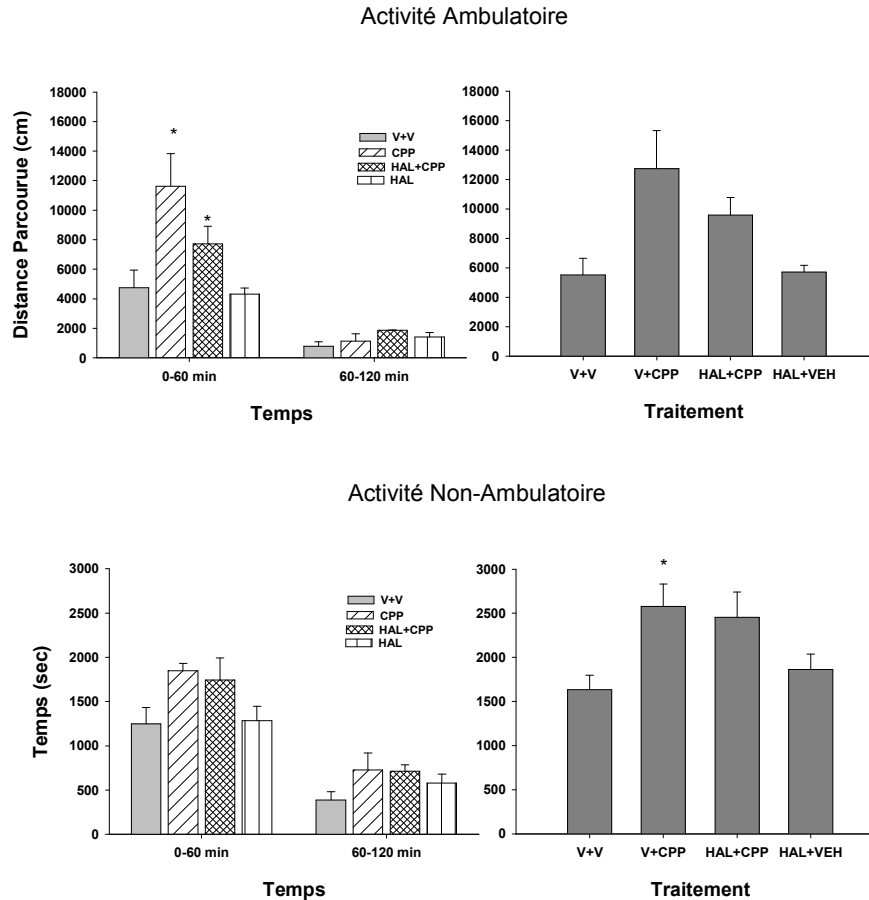
comparaisons entre les moyennes ont été effectuées avec le test de Holm-Sidak et le niveau de signification fixé à 0,05 (SigmaPlot V11.2, Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA).

## **Drogues**

L'halopéridol était dissout dans une solution de saline comprenant 0,3% d'acide tartrique (Sigma-Aldrich, Montréal, CA). Le R-CPP était dissout dans la saline stérile (0,9%). Les doses comprennent l'ensemble de la molécule et non l'agent actif uniquement.

**Annexe 4.**

**Figure 8.** Localisation de chacun des sites d'injection de tous les animaux inclus dans l'étude. Les dessins sont une adaptation des planches de l'atlas du cerveau de rat de Paxinos & Watson (1986). Les chiffres à droite indiquent la distance par rapport au bregma.



**Figure 9.** Illustration des changements de l'activité ambulatoire (graphique du haut) et non-ambulatoire (graphique du bas) mesurés après chaque traitement au cours des deux périodes de 60 minutes (gauche) et au cours de la période totale de 120 minutes (droite). Abréviations : Véhicule + Véhicule : V+V; Véhicule + R-CPP : V+CPP; Halopéridol + R-CPP : HAL+CPP; Halopéridol + Véhicule : HAL+VEH. Le R-CPP a produit une augmentation des mouvements ambulatoires qui est dépendante du temps ( $F_{3,17} = 6,5$ ,  $p < 0,01$ ), un effet qui semble atténuer par l'halopéridol. Le R-CPP a aussi augmenté les mouvements non-ambulatoires indépendamment du temps (traitement,  $F_{3,17} = 4,1$ ,  $p < 0,05$ ; traitement et temps,  $F_{3,17} = 1,39$ ,  $p > 0,05$ ). Les mouvements verticaux n'ont pas été modifiés par les traitements (non illustrés, traitement:  $F_{3,17} = 0,83$ ,  $p > 0,05$ ; traitement et temps :  $F_{3,17} = 1,4$ ,  $p > 0,05$ ). L'astérisque indique une différence significative avec V+V ( $p < 0,05$ ).