

Université PARIS XII- Campus Université PARIS –EST  
U.F.R. DE SCIENCES

Thèse de Doctorat présentée par  
Ouafa ARIB

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'université Paris EST  
Spécialité : Pharmacologie et neurosciences

**Etude électrophysiologique des effets du tabac, de sa fumée et de la nicotine sur des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale *in vivo* chez le rat, la souris sauvage et la souris  $\beta 2$  KO.**

Soutenue le 15 septembre 2009 devant le jury composé de :

Président le Professeur Franck SCHÜRHOFF  
Monsieur le Professeur Simon THORNTON  
Monsieur le Professeur Henri-Jean AUBIN  
Monsieur le Professeur Patrick Mac LEOD  
Monsieur le Professeur Robert MOLIMARD  
Monsieur le Docteur Philippe FAURE  
Monsieur le Docteur Renaud de BEAUREPAIRE

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Psychopharmacologie de l'hôpital Paul GUIRAUD de Villejuif, rattaché à l'unité INSERM 513, en collaboration avec le laboratoire de neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques à l'Institut Pasteur de Paris.

Je tiens à exprimer au Docteur Renaud de Beaurepaire qui dirige le laboratoire de Psychopharmacologie, mes sincères remerciements et ma grande reconnaissance pour son accueil, sa compréhension, sa patience et la confiance qu'il m'a accordée tout au long des années de préparation de cette thèse.

J'exprime également mes sincères remerciements au Docteur Philippe Faure qui m'a accueillie au sein de son laboratoire à l'Institut Pasteur, pour avoir mis tous les moyens de travail à ma disponibilité, pour avoir supervisé mon travail et pour toute l'aide et le temps inestimables qu'il m'a accordés pour mener à bien ce travail de thèse.

Un grand merci au Docteur Pierre-jean Corringer et aux membres de son équipe : Virginie Dufresne et Chantal Lepoupon pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse et la patience dont ils ont fait preuve à mon égard, ainsi qu'aux jeunes docteurs, Fabio Marti et Nicolas Maubourguet pour toute l'aide qu'ils m'ont donnée.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au Professeur Robert Molimard pour sa présence, ses conseils et le soutien dont il a fait preuve à mon égard depuis le début et jusqu'à la fin de ce travail, ainsi que pour tous les travaux que j'ai conduits en parallèle de cette thèse.

Je remercie chaleureusement, le Professeur Simon Thornton et le Docteur Henri-Jean Aubin de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie aussi le Docteur Patrick MacLeod de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Franck Schürhoff d'avoir eu la gentillesse et m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse

Un grand merci à Pascal Rat, technicien du laboratoire de psychopharmacologie pour son savoir faire qu'il m'a fait partager tout au long de mon travail, pour sa présence et son soutien durant toutes mes années de thèse.

Je remercie également la Société Française de Tabacologie qui a financé ce travail pendant trois ans. Ainsi que toutes les personnes qui d'une manière ou d'une autre, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie bien sûr, mes parents, sans qui rien n'aurait été pareil, pour tout ce que je leur dois, pour leur soutien et leur confiance, mes sœurs pour toute leur affection et enfin toute ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

## Résumé de la thèse

La nicotine est considérée comme étant la « molécule » addictogène de la cigarette et du tabac. Mais différentes études cliniques, utilisant notamment des substituts nicotiques, débouchent pratiquement toutes sur une même conclusion : efficacité ne dépassant que de peu celle d'un placebo, et très limitée dans le temps, contrastant avec le pouvoir hautement addictif du tabac, qu'il soit chiqué, prisé ou fumé. Dans ce travail de thèse, nous avons essayé de mettre en évidence le rôle que pourraient avoir certains des autres composés présents dans le tabac ou produits par pyrolyse.

Nous avons d'abord utilisé des extraits aqueux de fumée et de tabac pour approcher un aspect global de ce que les fumeurs absorbent chaque fois qu'ils fument une cigarette, nous rapprochant ainsi des conditions physiologiques du fumeur. Puis nous avons choisi un certain nombre de substances. La cotinine, métabolite de la nicotine. L'harmane, une  $\beta$ -carboline, synthétisée au cours de la combustion et dans l'organisme des fumeurs. La norharmane, une  $\beta$ -carboline, présente en partie dans le tabac et synthétisée dans la fumée par pyrolyse.

La technique utilisée tout au long de ce travail est l'enregistrement électrophysiologique. Cette technique s'applique très bien à l'étude *in vivo* de différents systèmes neuronaux y compris le système dopaminergique. Nous l'avons utilisée chez le rat, la souris WT et la souris Knockout  $\beta 2$  ( $\beta 2$ KO). Nous nous sommes intéressés à deux aspects de l'activité cellulaire des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale : la fréquence de décharge (le firing) et les bouffées (bursts). En parallèle, nous avons conduit des expériences de liaison (binding) sur des cultures de cellules exprimant le récepteur nicotinique  $\alpha 4\beta 2$ .

Nos résultats les plus significatifs ont montré que :

- Les bursts sont le plus souvent absents après les injections d'extraits de tabac et de fumée. Cela pourrait, entre autres, impliquer qu'il existe dans le tabac et la fumée des composés autres que la nicotine qui bloquent les effets de la nicotine sur les bursts.
- Les effets des extraits de tabac et de fumée sur le firing et les bursts ne sont plus présents chez les souris  $\beta 2$  KO, ce qui implique que l'ensemble des composés du tabac agit essentiellement sur les récepteurs nicotiques porteurs de la chaîne  $\beta 2$ , même si des hypothèses alternatives existent.
- L'harmane a des effets activateurs très puissants sur le firing des neurones dopaminergiques, et ces effets sont bloqués à 80% par la mécamylamine, ce qui démontre qu'un des principaux composés du tabac et de la fumée autre que la nicotine agit par un mécanisme essentiellement nicotinique.
- Les expériences de binding confirment que les effets du tabac et de la fumée impliquent les récepteurs nicotiques d'une façon majeure, mais d'une façon qui diffère légèrement de celle de la nicotine.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les effets pharmacologiques du tabac ne se résument pas à ceux de la seule nicotine. Ils peuvent constituer un point de départ pour d'autres travaux, notamment pour étudier de plus près les effets des  $\beta$ -carbolines. Il est nécessaire d'identifier les types de récepteurs sur lesquels elles se fixent, en utilisant des agonistes et antagonistes de récepteurs aux neurotransmetteurs contrôlant l'activité des neurones dopaminergiques. Des expériences sur des souris transgéniques chez lesquelles différents types de sous-unités de récepteurs nicotiques ont été supprimés doivent également être envisagées, pour déterminer les mécanismes d'action des composants autres que la nicotine contenus dans le tabac et sa fumée sur les neurones dopaminergiques.

**Mots Clés:** Neurones dopaminergiques ; activité électrophysiologique ; nicotine ; extrait de tabac ; extrait de fumée ;  $\beta$ -carbolines ; Harmane ; Norharmane.

## **An electrophysiological study of the effects of tobacco, its smoke, and nicotine, on ventral tegmental area dopaminergic neurons *in vivo* in the rat, the wild type mice and the $\beta 2$ KO mice.**

### Abstract

Nicotine is generally considered as the sole tobacco addictive compound. However, nicotine replacement therapy studies almost all end with the same conclusion: the effectiveness of nicotine replacement is very limited on the short-term, and hardly exceeds that of placebo on the long-term. In addition, studies dealing with the effects of denicotinized cigarettes have provided evidence that these cigarettes have an addictive potential.

In the present work, we tried to determine the behavioral role of some tobacco or smoke compounds other than nicotine at the neuronal level. We first compared the effects of nicotine with those of whole tobacco and smoke extracts, given that these preparations closer mimic the smoking situation than nicotine alone. We then examined the effects of a number of selected tobacco or smoke compounds. Cotinine, a major nicotine metabolite. Harmane and norharmane, two  $\beta$ -carbolines synthesized in smoke as well as in the body of smokers.

The technique used consists in the *in vivo* recording of the firing rate and bursts of dopamine neurons in the ventral tegmental area after intravenous injections of compounds in rats and mice. This electrophysiological technique is known to be a useful way to investigate the properties of selected compounds. In the case of mice, we used wild type and  $\beta 2$  KO mice. We also made a series of *in vitro* experiments investigating the binding properties of the compounds on cells expressing high densities of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors.

The main results of our studies are the following:

- Bursts are absent most of the times after the injection of the extracts. These results suggest that tobacco and smoke extracts contain compounds that inhibit the burst-promoting effects of nicotine.
- Increased firing is no longer present in  $\beta 2$  KO mice treated with tobacco or smoke extracts, indicating that tobacco and smoke components, as a whole, primarily acts on nicotinic receptors that carry the  $\beta 2$  chain, although alternative hypotheses may exist.
- Harmane very strongly activates the firing of dopaminergic neurons. Up to 80% of this effect is blocked by mecamylamine, demonstrating that that a major component of tobacco and smoke other than nicotine acts primarily through a nicotinic mechanism.
- The binding experiments confirm that the effects of tobacco and smoke involve nicotinic receptors in a major way, but in a way that slightly differs from that of nicotine.

Our results may constitute a new starting point for further work, especially for a closer look at the effects of  $\beta$ -carbolines. Attempts to identify the types of receptors involved in these effects are needed, using agonists and antagonists of neurotransmitter receptors that control the activity of dopamine neurons. Experiments on transgenic mice with deletion of different types of subunits of nicotinic receptors should also be made, to determine the different mechanisms of action of tobacco and smoke compounds other than nicotine on dopaminergic neurons.

**Keywords: Dopaminergic neurons; electrophysiological activity; nicotine; tobacco extract; smoke extract; harmane; norharmane.**

Sommaire.....	5
Préambule.....	7
<b>I-Introduction.....</b>	<b>9</b>
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
1- Le tabac agit sur les récepteurs nicotiniques .....	9
1-1-Structure des récepteurs nicotiniques .....	9
1-2-Localisation des nAChRs dans le système dopaminergique.....	10
2- La dépendance au tabac est attribuée à une action de la nicotine sur les systèmes dopaminergiques.....	12
3- L'attribution exclusive de la dépendance à la nicotine est insatisfaisante.....	15
4- Il existe plusieurs milliers de composants dans le tabac.....	15
4-1-Les constituants de la fumée de cigarette. ....	15
4-2- Aspects fonctionnels. ....	16
5- La dépendance pourrait faire intervenir des facteurs autres que la nicotine.....	17
<b>II-Matériel et méthode.....</b>	<b>19</b>
6-Animaux .....	19
7-Matériel .....	19
8-Electrophysiologie .....	20
9-Expérience de binding .....	21
9-1-Culture cellulaire.....	21
9-2-Technique de Potentiel de Membrane : Système FLIPR.....	21
10-Statistiques et traitement des résultats.....	21
<b>III-Résultats.....</b>	<b>23</b>
11- Résultats chez le rat.....	23
11-1- Effets de la nicotine chez le rat .....	23
11-2- Effets des $\beta$ -carboline chez le rat .....	26
a-Effets de l'harmane.....	26
b-Effets de la norharmane.....	28
11-3- Effets de la cotinine.....	33
11-4- Comparaison des effets des $\beta$ -carboline avec certains IMAO .....	33
11-5-Effets des extraits de tabacs et de fumée chez le rat.....	39
a-Extrait de fumée.....	39
b-Extrait de tabac.....	41
12-Résultats chez la souris .....	45
12-1-Chez la souris WT.....	45
12-2-Chez la souris $\beta 2^{-/-}$ .....	47
13-Résultats des expériences de binding.....	50
<b>IV-Discussion.....</b>	<b>53</b>
14-La réponse dopaminergique à la nicotine : connaissances actuelles.....	53
15- Effet de la nicotine.....	55
15-1- Effets sur le firing .....	55
15-2-Effets sur les bursts.....	55
15-3-Effets de différentes doses de nicotine chez le rat.....	56
a-Effets sur le firing.....	56
b-Effets sur les bursts .....	57

<b>16-Effets de la nicotine chez les souris (WT et <math>\beta</math>2 KO)</b> .....	<b>58</b>
<b>17-Effets de la cotinine (chez le rat seulement)</b> .....	<b>58</b>
<b>18-Effets des <math>\beta</math>-carbolines : harmane et norharmane</b> .....	<b>59</b>
<b>18-1-Norharmane</b> .....	<b>59</b>
<b>18-2-Harmane</b> .....	<b>59</b>
<b>19-Effets des extraits de tabac et de fumée</b> .....	<b>61</b>
<b>19-1-Extraits de tabac</b> .....	<b>61</b>
<b>19-2-Extraits de fumée</b> .....	<b>62</b>
<b>20-Études sur les cellules HEK293</b> .....	<b>64</b>
<b>V-Conclusions</b> .....	<b>65</b>
<b>VI-Références bibliographiques</b> .....	<b>67</b>

## Préambule

La consommation de tabac est un problème majeur de santé publique. C'est la première cause de mort évitable dans les pays développés. La moitié des fumeurs qui n'arrêtent pas de fumer meurent d'une maladie causée par le tabac. La consommation de tabac est directement liée à la dépendance au tabac, qui est une dépendance extrêmement forte, durable et résistante au désir d'arrêter de fumer. Environ un tiers des fumeurs essaient chaque année d'arrêter de fumer, et moins de 10% réussissent. Dani et Harris rapportent que malgré des raisons médicales aussi évidentes qu'impératives, 50% des personnes qui ont survécu à un infarctus du myocarde lié au tabac recommencent à fumer dans les semaines qui suivent leur sortie de l'hôpital.

On appelle couramment la dépendance au tabac « dépendance à la nicotine », tant il est habituel de penser que la dépendance au tabac chez les fumeurs est exclusivement liée aux effets de la nicotine. Et pratiquement toutes les recherches sur la dépendance au tabac sont focalisées sur la nicotine, et plus précisément sur les effets de la nicotine sur les systèmes dopaminergiques. Il est en effet peu contestable, d'une part que la dépendance au tabac, comme toutes les dépendances, met en jeu les systèmes dopaminergiques, et d'autre part que la nicotine agit sur les systèmes dopaminergiques qui sont en large partie contrôlés par les récepteurs nicotiques. Dans ces conditions, et sachant que la nicotine constitue à elle seule 80 à 90% des alcaloïdes du tabac, il est logique de s'intéresser aux effets de la nicotine sur les systèmes dopaminergiques pour comprendre la dépendance. Ce qui n'exclut pas d'envisager que des composants du tabac autres que la nicotine pourraient être impliqués dans la dépendance, ces composants pouvant théoriquement, soit avoir une activité indépendante de la nicotine sur les systèmes dopaminergiques, soit interagir avec la nicotine (potentialisation ou inhibition) dans le contrôle des systèmes dopaminergiques.

L'idée que des composants du tabac autres que la nicotine pourraient intervenir dans la mise en place de la dépendance au tabac s'est développée progressivement, fondée sur trois principaux ordres de faits cliniques ou expérimentaux. Le premier est qu'autant la dépendance est forte pour le tabac, autant elle est faible pour la nicotine seule (par exemple très peu de personnes deviennent dépendantes aux patches à la nicotine). Le second est que les cigarettes dénicotinisées sont capables de créer une dépendance, moindre que celle créée par le tabac, mais réelle. Le troisième argument a été apporté par des expériences qui ont montré que des extraits de tabac et de fumée, c'est-à-dire des préparations qui contiennent tous les composants qui sont inhalés par les fumeurs, ont des effets différents de ceux de la nicotine seule sur les neurones sérotoninergiques du raphé chez le rat (Touiki et al, 2007), démontrant qu'il existe nécessairement dans le tabac et la fumée des composants qui agissent différemment de la nicotine dans le cerveau. Ces éléments incitent à tester les effets de tels extraits de tabac et de fumée sur les neurones dopaminergiques.

La nicotine agit sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs canaux activés par un ligand. Le récepteur nicotique est formé par l'assemblage de cinq sous-unités. Il existe dans le cerveau douze sous-unités qui peuvent former un large répertoire de récepteurs, dont certains sont particulièrement impliqués dans le contrôle des systèmes dopaminergiques. Les effets de la nicotine sur ces récepteurs, surtout les effets adaptatifs sur le long terme, ne sont pas encore parfaitement compris, mais une grande somme de connaissances a été accumulée sur ces effets, en grande partie grâce à l'utilisation d'animaux chez lesquels certains récepteurs nicotiques, ou certaines sous-unités des récepteurs nicotiques, ont été inactivées. Parmi ces animaux, ceux dépourvus des sous-unités  $\beta 2$  ou  $\alpha 7$  ont été particulièrement intéressants à étudier, parce que les principaux récepteurs impliqués dans le contrôle des neurones dopaminergiques par la nicotine sont les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$ . Ce qui incite à tester les effets

des extraits de tabac et de fumée chez des animaux dépourvus de ces sous-unités ( knock-out ou KO).

Si le tabac et la fumée ont des effets différents de ceux de la nicotine sur les neurones c'est qu'il existe dans le tabac et la fumée des composants qui ont des effets physiologiques qui s'ajoutent à ceux de la nicotine, ou qui interfèrent avec ceux de la nicotine. Il serait important de découvrir quels sont ces composants et de tester leurs propriétés sur les neurones. Mais il existe des milliers de composants dans le tabac, et il est peu envisageable de les tester tous. Il est donc nécessaire de faire des choix, et l'on est guidé pour ces choix par les données de la littérature. Ainsi il a été montré que des alcaloïdes du tabac autres que la nicotine, comme les  $\beta$ -carbolines, ont des effets physiologiques propres, de même qu'ont des effets physiologiques propres certains métabolites de la nicotine, comme la cotinine. Ces substances pourraient donc être testées en priorité.

L'objectif principal de cette thèse est donc de mettre en évidence des différences entre les effets de la nicotine seule et ceux d'extraits de tabac et de fumée sur les neurones dopaminergiques chez l'animal.

Les objectifs secondaires sont de montrer que certains composants du tabac autres que la nicotine ont des effets sur les neurones dopaminergiques, de rechercher jusqu'à quel point l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs nicotiques (la mécamylamine) est capable de bloquer les effets des composants du tabac et de la fumée autres que la nicotine, et, de la même façon, jusqu'à quel point la suppression de la sous-unité  $\beta$  des récepteurs nicotiques chez des souris (souris  $\beta 2$  KO) peut aussi bloquer les effets des composants du tabac et de la fumée autres que la nicotine. Enfin, un dernier objectif, exploratoire, consistera à rechercher les effets des extraits de tabac et de fumée, comparativement à la nicotine, sur le binding nicotinique sur des cultures cellulaires.

# I-INTRODUCTION

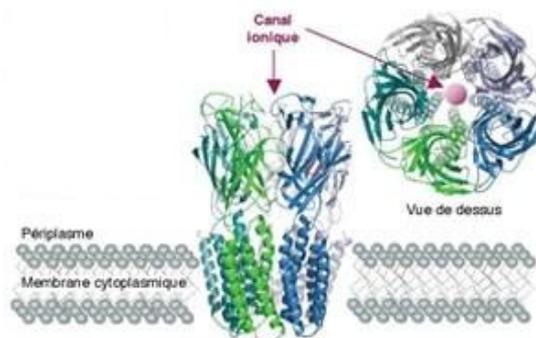
## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1- Le tabac agit sur les récepteurs nicotiques

Ce que l'on connaît actuellement des effets du tabac sur le cerveau conduit à penser que les composants du tabac agissent essentiellement, sinon exclusivement, sur les récepteurs nicotiques.

#### 1-1- Structure des récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques sont des récepteurs-canaux (à la différence de la plupart des récepteurs des neurotransmetteurs, qui sont liés à des protéines G) dont le ligand naturel est l'acétylcholine. L'acétylcholine est sécrétée en abondance dans le cerveau, où elle est assez ubiquitaire, et elle agit sur deux types de récepteurs, muscariniques et nicotiques. Les récepteurs nicotiques (nAChRs) sont constitués par 5 chaînes polypeptidiques, perpendiculaires à la membrane, qui délimitent l'espace d'un canal (Figure 1). Le canal établit un passage entre les compartiments extra- et intracellulaires, qui laisse passer des ions quand le récepteur est activé par ligand (endogène comme l'acétylcholine ou exogène comme la nicotine). Les chaînes sont de 2 types, on distingue les sous-unités  $\alpha$  allant de  $\alpha 1$  à  $\alpha 10$  et les sous-unités  $\beta$  allant de  $\beta 2$  à  $\beta 4$ . Plusieurs combinaisons sont possibles avec différentes propriétés fonctionnelles (McGehee and Role, 1995 ; Role and Berg, 1996, Wonnacott, 1997 ; Jones et al, 1999 ; Wooltroton et al, 2003). Cinq sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) et trois sous-unités  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) assemblées en de multiples combinaisons forment la majorité des récepteurs nAChRs hétéro-oligomériques neuronaux, mais l'association la plus abondante dans le cerveau chez l'homme est l'association  $\alpha 4\beta 2$  (les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  constituent plus de 80% des récepteurs). Un autre récepteur assez abondant est l' $\alpha 7$  Formant lui des récepteurs homomériques.

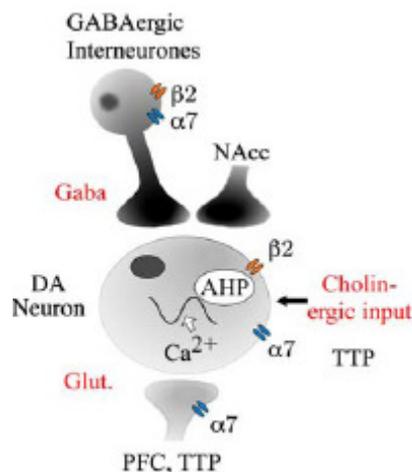


**Figure 1 :** Canal ionique formé de cinq sous-unités protéiques (Internet pub med)

#### 1-2- Localisation des nAChRs dans le système dopaminergique.

Les récepteurs nicotiques ont différentes localisation, nous les rencontrons au niveau somatique, synaptique, dendritique ou au niveau de la plaque motrice du fuseau musculaire.

Dans ce manuscrit, nous allons nous limiter aux nAChRs présents au niveau du système nerveux central. Et plus spécifiquement à la localisation et au rôle des nAChRs au niveau du système dopaminergique et les systèmes qui lui sont associés. Les réponses dopaminergiques sont modulées par l'activité des nAChRs présent sur trois principaux types de cellules (Fig 2).



**Figure 2 :** Localisation des nAChRs au niveau des cellules dopaminergiques et leurs afférences (Mameli-Engvall et al, 2006 (PFC : Cortex préfrontal ; TTP : Noyau tegmental pédonculopontin ; NAcc : Noyau Accumbens ; AHP : Hyperpolarisation post-spike(After spike HyperPolarisation))

Nous pouvons donc distinguer une action appliquée :

Par les nAChRs présents sur le soma des cellules dopaminergiques elles mêmes.

Par les nAChRs exprimés sur les inter-neurons GABAergiques

Par les nAChRs présents sur différentes afférences de structures cérébrales (Cortex préfrontal, noyau tegmental pédonculopontin. (Overton and Clark, 1997; Diana and Tepper, 2001).

Il est généralement avancé que la consommation aiguë de tabac (l'inhalation rapide et répétée à courts intervalles de la fumée) désensibilise les récepteurs nicotiques, ce qui signifie que les récepteurs deviennent rapidement moins sensibles à la nicotine (Dani et Heinemann, 1996). Mais après un certain temps, lorsque la consommation de tabac devient chronique (ce qui est le cas chez le fumeur), un processus se développe, appelé up-régulation, qui consiste en une augmentation du nombre des récepteurs, processus qui semble s'opposer à la désensibilisation des récepteurs. C'est un phénomène très complexe, qui touche de façon variable les différents types de récepteurs, et qui affecte la sensibilité des récepteurs d'une façon encore incomplètement comprise. Il est néanmoins bien établi que les états d'up-régulation des récepteurs nicotiques ont un rôle dans la dépendance et dans la difficulté à arrêter de fumer, en particulier l'up-régulation des récepteurs qui contiennent la sous-unité  $\beta 2$  (Staley et al, 2006).

Il a en effet été montré que les récepteurs qui contiennent la sous-unité  $\beta 2$  sont impliqués dans les effets les plus importants du tabac sur le cerveau, plus particulièrement dans la dépendance. Beaucoup de recherches ont été faites pour caractériser les fonctions des divers types de récepteurs nicotiques dans le cerveau. D'une façon générale, quand on cherche à caractériser la fonction d'un récepteur dans le cerveau, on peut schématiquement utiliser deux techniques, l'une qui consiste à utiliser des ligands pharmacologiques qui ont des propriétés

activatrices (agonistes) ou inhibitrices (antagonistes), et l'autre à utiliser des animaux qui n'expriment pas (ou, à l'inverse, surexpriment) le gène de synthèse du récepteur. Les animaux, en règle générale des souris, qui n'expriment pas un gène sont des souris knockout. Il existe des souris knockout pour la sous-unité  $\beta 2$  du récepteur nicotinique, et ces souris sont très utiles pour comprendre les fonctions de ce récepteur. L'utilisation de ligands est très utile en imagerie fonctionnelle cérébrale (caméra à positrons), où des ligands marqués par une molécule radioactive vont aller se fixer sur les récepteurs, produisant un signal (émission de positrons) susceptible d'être enregistré, et l'intensité de ce signal – dans diverses structures cérébrales – va pouvoir être corrélé à divers paramètres fonctionnels (activité cognitive, symptômes, etc.), ce qui donne des renseignements sur l'implication des récepteurs dans certaines structures cérébrales sur telle ou telle fonction. Des ligands spécifiques pour les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  et pour les  $\alpha 7$  ont été développés et utilisés (Valette et al, 2003 ; Kimes et al, 2008 ; Ogawa et al, 2009). La technique des ligands marqués est aussi utile sur des préparations cellulaires in vitro, où l'occupation des récepteurs par le ligand marqué renseigne sur les propriétés d'une molécule donnée ou sur la présence d'un récepteur donné.

Concernant les récepteurs contenant la sous-unité  $\beta 2$ , ces diverses techniques ont permis sinon d'attribuer avec certitude des fonctions, du moins de proposer des hypothèses sur le rôle fonctionnel de ces sous-unités. Il a été montré que les sous-unités  $\beta 2$  ont un rôle important dans la mise en place de la dépendance. Ainsi les souris dépourvues de sous-unité  $\beta 2$  ne s'auto-administrent pas de nicotine contrairement à la souris sauvage (Picciotto et al, 1998 ; Maskos et al, 2005 ; Pons et al, 2008). L'auto-administration réapparaît si la sous-unité est ré-exprimée dans l'aire tegmentale ventrale (Maskos et al, 2005 ; Pons et al, 2007). Les chaînes  $\beta 2$  seraient essentielles pour que la nicotine exerce ses effets de renforcement – autrement dit de plaisir, ce qui ne serait pas le cas des récepteurs  $\alpha 7$  (Walters et al, 2006). La même observation a été faite pour les comportements motivationnels (Sagara et al, 2008). Néanmoins, pour certains auteurs, les  $\alpha 7$  seraient impliqués dans la dépendance (Nomikos et al, 2000). Les sous-unités  $\beta 2$  auraient aussi un rôle dans les fonctions cognitives (Besson et al, 2008), et plus particulièrement les  $\beta 2$  situés dans l'aire tegmentale ventrale (Maskos et al, 2005 ; Molles et al, 2006), et dans les réactions de peur conditionnée (Davis et Gould, 2007). Enfin, les chaînes  $\beta 2$  participent à l'organisation du sommeil (Léna et al, 2004). En revanche, les chaînes  $\beta 2$  ne semblent pas impliquées dans les réactions au sevrage nicotinique (Besson et al, 2006), les symptômes de sevrage tabagique seraient attribuables aux récepteurs  $\beta 4$ , et non aux  $\beta 2$  (Salas et al, 2004). Il se pourrait néanmoins que la dimension affective des symptômes de sevrage soit dépendante de l'activité des  $\beta 2$ , alors que ce ne serait pas le cas pour les symptômes physiques du sevrage (Jackson et al, 2008). Selon Raybuck et Gould (2009), les chaînes  $\beta 2$  dans l'hippocampe seraient impliquées dans la dimension du sevrage nicotinique qui concerne les interactions entre sevrage et peurs conditionnées. Dans l'étude de Staley et al (2006) citée précédemment, des corrélations ont été retrouvées entre la densité en récepteurs  $\beta 2$  et le délai depuis la dernière cigarette chez les fumeurs abstinents, ainsi qu'avec la difficulté d'arrêter de fumer, mais les auteurs n'ont pas retrouvé de corrélation entre les  $\beta 2$  et l'intensité de la dépendance, ni avec la gravité des symptômes de sevrage, et pas non plus avec le désir de fumer, ce qui a conduit les auteurs à proposer que les  $\beta 2$  ne sont pas impliqués dans le syndrome de sevrage. Par ailleurs, des études de génétique ont retrouvé des corrélations entre la présence de certains variants du gène de la sous-unité  $\beta 2$  et la réponse subjective à la nicotine (Ehringer et al, 2007).

Les mécanismes par lesquels l'activation des récepteurs contenant la chaîne  $\beta 2$  exerce ses effets renforçants sont toujours inconnus. Ils paraissent d'autant plus complexes que l'on trouve des chaînes  $\beta 2$  dans la composition de plusieurs types de récepteurs, sur plusieurs types différents de neurones, et dans de nombreuses régions du cerveau, par exemple sur les neurones gabaergiques et dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, et sur les terminaisons des neurones glutamatergiques et cholinergiques qui projettent du noyau

pédonculaire du pont et du noyau tegmental latérodorsal (voir plus loin). Des interactions étroites entre les récepteurs  $\beta_2$  et les systèmes dopaminergiques sont néanmoins bien établies. Ces interactions sont par exemple déterminantes dans le contrôle de l'activité locomotrice (King et al, 2004 ; Avale et al, 2008). Elles le sont vraisemblablement aussi dans les mécanismes de la dépendance au tabac.

## **2- La dépendance au tabac est attribuée à une action de la nicotine sur les systèmes dopaminergiques.**

Le principal effet de la consommation de tabac est de créer une dépendance. Cette dépendance est extrêmement forte et les mécanismes de cette dépendance ont fait l'objet de nombreuses recherches. On connaît aujourd'hui assez bien le support biologique d'un aspect important de la dépendance, qui est la dépendance à la nicotine. La première étape – l'étape à partir de laquelle il semble que la consommation initiale de tabac va progressivement conduire à une dépendance – consiste en une action de la nicotine sur les récepteurs nicotiques situés dans un ensemble particulier de structures, celle des systèmes dopaminergiques.

Les systèmes dopaminergiques sont aussi appelés « systèmes de plaisir », toutes les substances ayant un potentiel addictif agissent sur ces systèmes, et il est peu contestable que la dépendance à la nicotine soit liée à son action sur les neurones dopaminergiques. Les neurones mis en jeu sont ceux du système dopaminergique méso-cortico-limbique, et plus particulièrement le système méso-accumbens, qui part de l'aire tegmentale ventrale et projette sur le noyau accumbens, une structure clé dans l'établissement de la dépendance. Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale ont des récepteurs nicotiques à leur surface, et l'on sait depuis plus de 20 ans que la nicotine active ces neurones (Corrigall Cohen, 1989). De très nombreuses séries d'expériences ont montré que l'activation de ce système par la nicotine serait source de plaisir. En particulier les expériences d'auto-administration de nicotine, où l'animal semble prendre plaisir à s'administrer de la nicotine, un comportement contemporain d'une activation des neurones dopaminergiques et d'une augmentation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens. Les récepteurs nicotiques impliqués sont les récepteurs de la surface des neurones dopaminergiques, des  $\alpha_4\beta_2$ , mais aussi des récepteurs  $\alpha_4\beta_2$  situés sur les neurones gabaergiques qui projettent sur les neurones dopaminergiques (inter-neurones situés dans l'aire tegmentale ventrale ou projections gabaergiques en provenance du noyau accumbens ([spiny neurons]), ainsi que des récepteurs  $\alpha_7$  situés sur les terminaisons des neurones glutamatergiques qui projettent sur les neurones dopaminergiques (en provenance de cortex préfrontal). Il existe aussi un système très important de projections cholinergiques sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Ces projections cholinergiques, qui activent très fortement les neurones dopaminergiques, proviennent de deux noyaux, le noyau pédonculaire du pont et le noyau latérodorsal du tegmentum. Ces noyaux semblent activés par des fibres myélinisées provenant du faisceau médian du télencéphale. Les récepteurs impliqués sont encore incomplètement connus, ils pourraient être à la fois nicotiques et muscariniques. Mais le rôle de ces projections cholinergiques a été très bien établi expérimentalement, en montrant que l'administration d'un antagoniste cholinergique à un animal bloque le comportement d'auto-administration de nicotine. C'est probablement en bloquant les récepteurs  $\alpha_4\beta_2$  que la varénicline exerce ses effets dans le traitement du sevrage tabagique.

L'action de la nicotine sur le système dopaminergique méso-accumbens semble donc être au cœur de la dépendance, mais il a été montré que d'autres substances pourraient intervenir. Les antagonistes des opiacés sont capables de bloquer l'auto-administration de nicotine chez l'animal (Zarrindast et al, 1997), ce qui conduit à penser que les systèmes opiacés endogènes

sont aussi impliqués dans la dépendance à la nicotine, même si l'importance fonctionnelle de ce mécanisme dans la dépendance à la nicotine est toujours sujette à discussions. Il existe néanmoins de fortes densités en récepteurs aux opiacés dans le noyau accumbens, et il a été proposé que la nicotine libèrerait des opiacés qui iraient se fixer sur ces récepteurs. Il existe aussi des récepteurs aux opiacés de type  $\mu$  dans le noyau pédonculaire du pont qui interfèreraient avec les effets de la nicotine. Un composant non nicotinique de la fumée, l'acétaldéhyde, pourrait aussi avoir un rôle, puisqu'il a été montré que les rats se l'auto-administraient, que l'administration se fasse par voie intraveineuse, intracérébroventriculaire, ou directement dans l'aire tegmentale ventrale (Rodd-Henricks et al, 2002). Enfin, des récepteurs au cannabis, les CB1, interviennent aussi dans ce système. Leur stimulation a un effet activateur sur les neurones dopaminergiques. Ils sont situés dans deux structures, d'une part dans l'aire tegmentale ventrale, sur les terminaisons des interneurons gabaergiques, et d'autre part dans le noyau accumbens, sur les neurones glutamatergiques en provenance du cortex préfrontal (qui projettent sur les neurones gabaergiques). Il a été montré que les antagonistes des récepteurs CB1 bloquent l'auto-administration de nicotine (Cohen et al, 2002). Pour certains auteurs, les récepteurs au cannabis seraient plus particulièrement impliqués dans le comportement de recherche de nicotine (de Vries et Schoffelmeer, 2005). Il existe donc de nombreuses substances non nicotiniennes qui sont susceptibles d'intervenir dans la dépendance au tabac. Néanmoins, les substances citées ci-dessus, en dehors de l'acétaldéhyde, n'entrent pas dans la composition du tabac. L'acétaldéhyde participe à la formation d'inhibiteurs de monoamine-oxydases (IMAO). Il a été montré que les IMAO pouvaient potentialiser les effets de la nicotine (Guillem et al, 2005; Villégier et al, 2006), mais il s'agissait dans ces expériences d'IMAO exogènes (antidépresseurs IMAO irréversibles) qui ne sont pas présents dans le tabac. Des travaux sont donc à faire pour rechercher si des composants du tabac ou de la fumée autres que la nicotine sont capables d'agir sur les systèmes de plaisir, et donc d'avoir un rôle dans la dépendance au tabac.

D'autre part, si l'action de la nicotine sur les neurones dopaminergiques du système méso-accumbens est un préalable indispensable à l'établissement d'une dépendance, d'autres mécanismes interviennent, où la dopamine et les récepteurs nicotiniens n'ont pas nécessairement un rôle majeur. La mise en mémoire de l'expérience de plaisir et la mise en place du besoin de répéter la prise de nicotine impliquent certainement les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, mais impliquent probablement aussi des systèmes de mise en mémoire situés dans d'autres structures du cerveau, tels que le striatum, l'amygdale et le cortex préfrontal. Certains auteurs parlent de « transition du système addictif », où la mise en mémoire de l'expérience initiale de plaisir se déplace du système méso-accumbens vers des structures qui ont un rôle dans l'apprentissage et l'expression des expériences de plaisir, comme le striatum, dans le stockage des expériences émotionnelles, tels que l'amygdale, et des systèmes exécutifs de recherche des moyens ou stratégies pour se procurer la substance qui donne du plaisir, systèmes cognitifs et exécutifs que l'on situe dans le cortex préfrontal (Kalivas, 2003). Autrement dit, la dépendance aurait deux dimensions, une dimension immédiate d'expérience de plaisir, dépendante du système méso-accumbens, et une dimension différée de mémoire affective et exécutive, déterminant l'installation durable des « habitudes » addictives, liée à des systèmes striataux et amygdalo-préfrontaux, et où l'implication de la dopamine et des récepteurs nicotiniens n'est pas toujours démontrée (ce qui ne les exclut pas).

Le cas du striatum dans la mise en mémoire des expériences de plaisir est intéressant. L'installation des habitudes addictives semble, en effet, dépendante du striatum. Il a été montré, pour des drogues autres que le tabac, que les schémas cognitivo-comportementaux qui déterminent les conduites addictives sont inscrites dans le striatum. Le striatum semble être une sorte de réservoir d'attitudes cognitivo-comportementales, et il existe toute une littérature sur la plasticité striatale qui permet l'inscription des habitudes addictives. Cela a bien été montré pour des drogues comme la cocaïne, mais pas, à notre connaissance, pour le

tabac. La mise en évidence de telles inscriptions striatales chez les fumeurs pourrait pourtant expliquer l'essentiel des aspects cognitivo-comportementaux de la dépendance au tabac. Des similitudes entre la dépendance au tabac et la dépendance à d'autres drogues ont néanmoins été observées concernant le statut des récepteurs dopaminergiques dans le striatum en imagerie cérébrale. Il a d'abord été montré que le désir (craving) de prendre des drogues telles que la cocaïne ou les opiacés était associé à une diminution du nombre de récepteurs dopaminergiques D2 dans le striatum, et une observation similaire vient d'être faite chez les fumeurs – et comme avec les autres drogues, plus les D2 sont bas plus l'envie de fumer est forte (Fehr et al, 2008). Ces données, même si elles ne concernent pas le système dopaminergiques méso-cortico-frontal, renforcent en fait l'idée d'une implication majeure des systèmes dopaminergiques dans la dépendance au tabac, qui semble donc impliquer le système dopaminergique nigrostrié en plus du système méso-cortico-frontal.

En réalité, selon certaines données expérimentales, les systèmes de mise en mémoire de l'expérience de plaisir pourraient concerner un fonctionnement particulier des neurones dopaminergiques, celui des décharges en bursts, ou activité phasique, dont les effets concernent simultanément les deux grands sous-systèmes dopaminergiques, les systèmes mésolimbique et nigrostrié. Les signaux en rapport avec des expériences de plaisir (signaux annonceurs d'une récompense) sont traités par les neurones dopaminergiques, qui modifient leur activité en réponse à ces signaux, mais la modification d'activité importante lors du traitement de ces signaux ne semble pas être la modification du firing de base (activité tonique), mais une activation des bursts (Schultz, 2002). Ainsi, les neurones dopaminergiques pourraient mettre en mémoire les informations liées aux expériences de plaisir en passant d'une activité tonique à une activité phasique. La nicotine a cette capacité de changer l'activité des neurones dopaminergiques, en les faisant passer d'une activité tonique à une activité phasique, et cette propriété de la nicotine constitue le fondement des hypothèses explicatives de la dépendance à la nicotine (Mameli-Engvall et al, 2006). Les deux territoires, mésolimbiques et nigrostriés, seraient donc impliqués, mais le rôle respectif de ces deux territoires est toujours discuté (Keath et al, 2007). Les récepteurs nicotiques impliqués dans les phénomènes de désensibilisation et dans le système de récompense seraient principalement les  $\alpha 4$ - $\beta 2$ . En revanche, les bursts seraient dépendants des récepteurs  $\alpha 7$  (Schilström et al, 2003). Nomikos et Schilström (2000) proposent que la nicotine, en stimulant les  $\alpha 7$  présynaptiques dans l'aire tegmentale ventrale, probablement localisés sur des afférences glutamatergiques, produisent une augmentation locale de la concentration en glutamate, qui active les récepteurs au NMDA situés sur les neurones dopaminergiques, responsable d'une forte activation des neurones.

### **3- L'attribution exclusive de la dépendance à la nicotine est insatisfaisante,**

Un problème posé par ce schéma de la dépendance à la nicotine est qu'en pratique, que ce soit en expérimentation animale ou en clinique humaine, la nicotine est assez peu addictogène. Schématiquement, selon Dar et Frenk (2004), on peut retenir les éléments suivants : La dépendance à la nicotine est une dépendance assez difficile à obtenir chez l'animal, alors que la dépendance aux autres drogues (opiacés, cocaïne, amphétamine) est très facile à établir ; Il n'existe pas de dépendance à la nicotine pure chez l'homme (par exemple les patchs ne créent pratiquement jamais de véritable toxicomanie), et l'utilisation de substituts nicotiques (patchs ou autres) n'a qu'un effet thérapeutique limité dans le sevrage au tabac ; Il existe des cigarettes dénicotinisées, et ces cigarettes ont des effets comportementaux chez l'homme, et créent même une dépendance, même si cette dépendance est beaucoup moins importante que celle observée avec les cigarettes habituelles ; La prise de nicotine pure n'a pas d'effet thérapeutique significatif chez les fumeurs ou les personnes abstinentes sur les symptômes anxieux ou dépressifs, alors que les études montrent que l'acte de fumer une cigarette est anxiolytique, voire même a des effets antidépresseurs, chez ces mêmes personnes ; Les

personnes sevrées en tabac à qui l'on donne des cigarettes rechutent très rapidement dans leur dépendance tabagique, alors que les mêmes personnes traitées par des patchs de nicotine pour une maladie somatique (les colites ulcéreuses par exemple) ne rechutent pas. La nicotine apparaît donc peu addictogène, alors que le tabac l'est beaucoup. Il n'y a pas de réponse satisfaisante pour expliquer cette discordance.

Certains éléments du manque de pouvoir addictogène de la nicotine évoqués ci-dessus trouvent peut-être en partie leur explication dans des différences de cinétique d'administration entre la cigarette et les patchs ou autres thérapies de substitution nicotinique. Après une bouffée de cigarette, la nicotine parvient massivement et très rapidement (moins de 10 secondes) au cerveau, alors que, lors de l'administration de substituts nicotiniques, la libération de nicotine est lente et atteint des taux sanguins relativement faibles. Pour beaucoup d'auteurs, c'est l'activation aiguë des récepteurs dopaminergiques liée à l'arrivée brusque d'une grande quantité de nicotine qui serait ce que recherche le fumeur. L'utilisation de la cigarette permettrait aussi au fumeur de mieux contrôler la quantité de substance absorbée en adaptant le rythme de consommation, le volume des bouffées et la profondeur de l'inhalation. Des travaux suggèrent d'ailleurs que les effets thérapeutiques des substituts nicotiniques sont d'autant meilleurs que l'on utilise une combinaison de voies d'administration (cutanée, buccale, inhalation), et doses élevées (Stead et al, 2008). D'un autre côté, des études récentes d'autoadministration chez le rat contredisent l'idée que l'acquisition d'une addiction à la nicotine serait favorisée par l'arrivée rapide et massive de nicotine dans le cerveau. Ainsi, Sorge et Clarke (2009) montrent que les rats préfèrent s'auto-administrer la nicotine à petite dose et délivrée lentement. De même, cette rapidité d'arrivée de la nicotine au cerveau ne peut-être invoquée pour expliquer la très forte dépendance des utilisateurs de tabac non fumé, prise nasale ou surtout tabac oral.

#### **4- Il existe plusieurs milliers de composants dans le tabac**

##### **4-1- Les constituants de la fumée de cigarette.**

La fumée de cigarette est le produit fini du tabac auquel le fumeur est exposé, d'où l'importance de s'intéresser directement à sa composition chimique. La fumée de cigarette est constituée d'une phase vapeur ou gazeuse et d'une phase particulaire. La composition chimique de la fumée de cigarette a été essentiellement étudiée à partir des produits isolés lors des tests de fumage réalisés selon les normes de l'ISO (International Standard Organization). Selon les données de Hoffman et al. (1997) et de Saint-Jalm (2002), les alcaloïdes représentent 6% de la phase particulaire de la fumée de cigarette. Les alcaloïdes sont des molécules organiques basiques d'origine végétale renfermant au moins une molécule d'azote salifiable ; ils dérivent des acides aminés et ont souvent des propriétés pharmacologiques importantes. Les alcaloïdes de la fumée de cigarette sont principalement constitués par la nicotine, avec ses dérivés, et par les  $\beta$ -carbolines dont les principaux sont l'harmane et la norharmane.

**Nicotine et alcaloïdes nicotiniques** : La nicotine représente 85 à 95% de la quantité totale des alcaloïdes du tabac. C'est un alcaloïde comportant un noyau pyridine et un cycle N-méthyl-pyrrolidine ; la biosynthèse se fait à partir de l'acide nicotinique et l'ornithine. La teneur en nicotine diminue fortement lors de la combustion par pyrolyse comparativement à la quantité existante dans la plante du tabac (Lefèvre, 2005).

**Cotinine** : La cotinine est le principal métabolite de la nicotine chez l'homme, elle est présente aussi dans la fumée de tabac mais en faible quantité. Elle s'y forme par oxydation ménagée de la nicotine (Lefèvre, 2005). La nornicotine est un constituant des alcaloïdes de tabac et un métabolite de la nicotine, à la fois dans la plante et chez l'homme chez qui elle se forme par N-déméthylation du cycle N-méthylpyrrolidine de la nicotine (Lefèvre, 2005). L'anabasine et l'anatabine sont deux dérivés nicotiniques qui font aussi partie des alcaloïdes de tabac. Comme la nicotine, l'anabasine se forme à partir de l'acide nicotinique. Par la suite, l'anatabine se forme à partir de l'anabasine (Lefèvre, 2005).

**Les  $\beta$ -carbolines** : harmane et norharmane. L'harmane et la norharmane sont deux  $\beta$ -carbolines présentes en faibles quantités dans la fumée de cigarette (Rommelspacher et al., 1994). Mais à des concentrations plus élevées chez le fumeur (Rommelspacher et al, 2002). L'harmane et la norharmane ont été mises en évidence pour la première fois dans la fumée de cigarette par Poindexter et Carpenter (1962), elles s'y forment par pyrosynthèse. L'harmane et la norharmane sont deux alcaloïdes tricycliques avec un noyau indole. In vivo, chez le fumeur, elles se forment à partir d'une réaction entre les aldéhydes abondants dans la fumée de cigarette et le tryptophane biogène (Fekkes et al, 2001). La réaction de l'acétaldéhyde sur le tryptophane donne comme produit l'harmane. Dans le cas du formaldéhyde, l'homologue correspondant, dépourvu d'un groupement méthyle, s'appelle la norharmane (Lefèvre, 2005). Autres composants majeurs de la fumée de cigarette. Les alcaloïdes semblent jouer un rôle majeur dans la dépendance au tabac. Mais la fumée de cigarette contient des milliers d'autres composants, et il n'est pas exclu que certains de ces composants aient un rôle potentialisateur dans l'addiction au tabac. Par exemple les aldéhydes (principalement l'acétaldéhyde) et de nombreux additifs et aromatisants utilisés par les industriels pour influencer le goût ou changer les facteurs physico-chimiques pour plusieurs raisons, par exemple pour avoir une bonne absorption de la nicotine au niveau alvéolaire.

#### **4-2- Aspects fonctionnels.**

Les effets de la nicotine ont été largement étudiés et discutés. Nous allons discuter ici du rôle fonctionnel potentiel des autres composants du tabac.

L'harmane et la norharmane qui sont deux alcaloïdes très actifs dans le cerveau (Montecrief, 1989 ; Ruiz-Durantez et al, 2001). Ces deux alcaloïdes sont présents dans la fumée de tabac, et ils ont des propriétés IMAO. Les monoamine-oxydases (MAO) sont des enzymes responsables du catabolisme de la sérotonine et des catécholamines. L'harmane et de la norharmane (sont respectivement des inhibiteurs de la monoamine-oxydase de type A (IMAO-A) et de type B (IMAO-B) (May et al, 1991 ; Rommelspacher et al, 1994). L'activité MAO a été trouvée basse chez les fumeurs ex vivo dans les plaquettes sanguines (Berlin et al, 1995) et in vivo dans le cerveau par tomographie par émission de positrons (Fowler et al, 1996).

Ruiz-Durantez et al (2001) ont montré que l'harmane et la norharmane stimulent les neurones noradrénergiques du locus coeruleus. L'harmane et la norharmane activent aussi les neurones dopaminergiques du système mésolimbique (Ergene et Schoener, 1993 ; Sällström Baum et al, 1995). L'administration d'harmane à petites doses par voie intrapéritonéale augmente la libération de DA dans le noyau accumbens, et la diminue à fortes doses. Des petites doses

d'harmane augmentent aussi les taux de 5-HT extracellulaire dans le noyau accumbens (Sällström Baum et al, 1996). L'harmane a aussi une haute affinité pour les récepteurs aux imidazoline (Husbands et al, 2001). Les MAO ont un site de fixation pour les ligands imidazoliniques (Parini et al, 1996), et l'harmane pourrait agir sur ce site pour inhiber les MAO. Selon Ruiz-Durantez et al (2001), ce n'est pas en agissant sur le site imidazolinique que l'harmane active les neurones noradrénergiques.

L'importance potentielle des IMAO présents dans la fumée de tabac a été confirmée par Villégier et al (2003) qui ont montré que la sensibilisation comportementale à la nicotine n'était, contrairement à ce qui est observé avec les psychostimulants et les opiacés, que transitoire, mais qu'elle devenait persistante lorsque les animaux recevaient un IMAO en même temps que la nicotine.

Concernant les interactions avec les systèmes 5-HT, l'administration d'harmane, localement dans l'hippocampe dorsal de rats éveillés, augmente la teneur locale en 5-HT sans changer les taux de son métabolite le 5-HIAA dans le dialysat (Adell et al, 1996). L'administration systémique d'harmane, augmente aussi les taux de 5-HT, accompagnés cette fois d'une réduction des taux de son métabolite le 5-HIAA (Adell et al, 1996). Selon Adell et al (1997), les effets de l'harmane sur la 5HT hippocampique pourraient être liés à son activité IMAO.

Selon certains auteurs, l'harmane a une affinité pour plusieurs types de récepteurs dans le cerveau, en particulier les récepteurs 5-HT de type 5-HT<sub>2</sub>, les récepteurs dopaminergiques de type D2 et les récepteurs aux benzodiazépines (Müller et al, 1981 ; Pawlik et Rommelspacher, 1988 ; Strömbom et al, 1992). Mais des études plus récentes ont montré que l'harmane n'a qu'une très faible affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> et 5-HT<sub>1A</sub>, et pas d'affinité du tout pour les récepteurs dopaminergiques D2 (Glennon et al, 2000). L'harmane, ainsi que d'autres β-carbolines ont démontré un effet antidépresseur dans le test de nage forcée chez la souris (Farzin et Mansouri, 2006). Touiki et al (2005) ont montré que l'harmane (mais pas la norharmane) inhibe fortement l'activité des neurones sérotoninergiques, un effet qui semble indépendant de son effet IMAO, et probablement aussi de son action sur les récepteurs imidazoliniques.

## **5- La dépendance pourrait faire intervenir des facteurs autres que la nicotine.**

Les éléments précédents montrent qu'il existe un certain nombre de composants du tabac et de la fumée qui sont potentiellement actifs dans le cerveau. Néanmoins, la réalité de leur intervention dans les effets physiologiques cérébraux du tabac et de la fumée chez les fumeurs, et en particulier leur rôle dans la dépendance, reste toujours sujets à discussion. Une façon d'aborder cette question est d'étudier les effets physiologiques des extraits de tabac et de fumée en les comparant à ceux de la nicotine. Les extraits de tabac, et surtout de fumée, contiennent tous les composants qui sont inhalés par les fumeurs. D'un certain point de vue, on peut considérer que les effets *in vivo* de la fumée sur les neurones sont beaucoup plus représentatifs de ce qui se passe chez les fumeurs que les effets de la nicotine seule. Or jusqu'à présent toutes les études sur les effets de la consommation de tabac se sont focalisées sur la nicotine seule, à l'exception de deux travaux de recherche, celui de Fà et al (2000) et celui de Touiki et al (2007).

Dans l'étude de Fà et al (2000), il est montré que l'inhalation de la fumée chez le rat stimule les neurones dopaminergiques, et que cette activation est bloquée par la mécamylamine, un antagoniste des récepteurs nicotiques. Dans le travail fait précédemment dans notre laboratoire, Touiki et al (2007) ont étudié les effets des extraits de tabac et de fumée sur les neurones 5HT. Ils ont utilisé la même technique que dans la présente thèse : l'enregistrement de neurones *in vivo* chez l'animal anesthésié, avec les substances administrées par voie veineuse. Ils ont observé que les extraits de tabac et de fumée inhibent très fortement les neurones 5HT, beaucoup plus fortement que la nicotine seule (comparativement à l'étude de Fà et al, l'inhibition des neurones 5HT a été obtenue pour des concentrations en nicotine de 0,04mg/kg, soit 20 fois inférieures à la dose qui a produit un effet dans les expériences de Fà

et al ; ce qui suggère que l'utilisation de la voie intraveineuse est plus sensible et plus adaptée dans ce type d'étude). Ils ont aussi montré que les effets inhibiteurs des extraits sur les neurones, tout comme ceux de la nicotine, sont totalement bloqués par la mécamylamine. Ce qui signifie, d'une part qu'il existe dans le tabac et la fumée des substances autres que la nicotine qui sont actifs sur les neurones 5HT (puisque l'effet des extraits est beaucoup plus puissant que celui de la nicotine seule), et d'autre part que ces substances autres que la nicotine ont la propriété, commune avec la nicotine, d'agir sur les récepteurs nicotiques (sinon les effets des extraits ne seraient pas totalement bloqués par la mécamylamine). Parmi les substances candidates autres que la nicotine, Touiki et al ont individualisé deux substances qui sont la nornicotine et l'anabasine (Touiki et al, 2007). Il a aussi observé que la cotinine, un alcaloïde du tabac présent en petites quantités dans la fumée, et qui a une relativement faible affinité pour les récepteurs nicotiques, n'a pas eu d'effet sur les neurones sérotoninergiques. La nornicotine et l'anabasine sont deux substances qui ont un effet activateur sur les récepteurs nicotiques (pour la nornicotine : Reavill et al, 1988 ; Copeland et al, 1991 ; Zhang et Nordberg, 1993 ; pour l'anabasine : Grady et al, 1992; Meyer et al, 1994), elles pourraient donc participer à l'effet inhibiteur des extraits sur les neurones 5HT. Mais de nombreuses autres substances seraient à tester, parmi lesquelles les  $\beta$ -carboline.

L'objectif primaire de ce travail est donc de montrer que les effets de la nicotine sont différents de ceux du tabac et de la fumée. Les objectifs secondaires sont de montrer que, a) certains composants du tabac autres que la nicotine pourraient avoir des effets propres sur les systèmes dopaminergiques, b) certains récepteurs nicotiques pourraient être plus particulièrement impliqués.

## **II-Matériel et méthode**

### **6-Animaux :**

Les rats et les souris utilisés au cours de toutes les expériences proviennent de l'élevage Charles RIVER (laboratoire France BP 109 - 69592 L'Arbresle CEDEX France). Les rats (mâles Sprague Dawley) étaient généralement livrés par douzaine, pesant entre 175 et 200g à leur arrivée. Ils sont par la suite placés à quatre par cage, en ayant libre accès à la nourriture et à l'eau. L'animalerie offre des conditions standards de température, d'hygrométrie et de lumière (22°C à 23°C, 58% à 63% d'humidité, éclairée de 8h à 20h).

Deux types de souris ont été utilisés dans nos expériences. Des Wild-type (lignée C57BL/6) et mutantes  $\beta 2^{-/-}$ , mâles, pesant entre 25g et 30g et âgées de 4 à 9 mois.

### **7-Matériel :**

Les cathéters utilisés sont achetés chez PHYMEP (Paris) et proviennent de chez A-M Systems, INC (131 Business Park Loop. PO Box 850. Carlsborg WA 98324)

Les microélectrodes en tungstène utilisées durant les enregistrements chez le rat sont achetées chez PHYMEP (Frederic Hear 1201 Main St Bowdoin ME 04287 USA), 26-05-2, impédance entre 2.9 et 3.6 Ohms).

Chez la souris, nous avons utilisé des électrodes en verre. Ces électrodes d'enregistrement ont été fabriquées à partir de capillaires en verre de 1.50mm et 1.17mm de diamètres externe et interne respectivement. Les électrodes ont été étirées à l'aide d'une étireuse Narishige (Harvard Apparatus Ltd.). La pointe a été par la suite cassée sous microscope et présente une épaisseur de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . L'électrode est par la suite remplie d'une solution de bleu de Pontamine à 2% dissous dans une solution d'acétate de sodium à 0.5%. La résistance de chaque électrode est mesurée et oscille entre 3.6 et 8 MOhms.

Les substances utilisées, nicotine (bitartrate), harmane, norharmane, cotinine, nornicotine, sélégiline (R-(-)-Deprenyl hydrochloride), ont été achetées chez Sigma Aldrich, la bécloxatone nous a été gracieusement offerte par les laboratoires Sanofi-Aventis, les extraits de tabac et de fumée quant à eux nous ont été offerts par la société Altadis.

Les extraits de tabac (ET) et de fumée (EF) ont été préparés par macération de tabac (ET) et par barbotage de la fumée de 40 cigarettes (EF) dans une solution de NaCl à 9‰ et tamponnée à pH 7.4. Nous avons effectué des dilutions à partir des solutions mères (contenant respectivement 0.96g/l de nicotine pour l'ET et 1.08g/l pour l'EF) pour préparer des doses de 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$  à 94 $\mu\text{g}/\text{kg}$  de nicotine.

L'harmane et le norharmane ont été dissous dans du NaCl à 9‰ avec quelques gouttes d'acide acétique à 2 % à des doses de (2mg/kg) et (1et 2 mg/kg) respectivement.

La bécloxatone a été préparée dans une solution à 50% d'alcool éthylique et a été injectée à la dose de 0.12mg/kg. La nicotine (doses injectées comprises entre 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$  et 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$  en équivalent base), la cotinine (dose injectée 0.15mg/kg), la nornicotine (dose injectée 0.05mg/kg), la quinpirole (dose injectée 0.03mg/kg), la sélégiline (dose injectée 0.5 mg/kg) et la mécamylamine (dose injectée 4mg/kg) ont été préparées dans du NaCl à 9‰. L'Halopéridol (dose injectée 0.3mg/kg) était en solution injectable (Haldol ampoule (5mg/ml)/ laboratoires Janssen-Cilag).

Ces différentes substances ont été injectées en intraveineuse dans des volumes allant de 10 $\mu\text{l}$  à 40 $\mu\text{l}$  selon la dose.

### **8-Electrophysiologie :**

Les animaux sont anesthésiés avec une solution d'hydrate de chloral (dose de 400 mg/kg).

Des injections périodiques sont faites tout au long des enregistrements pour maintenir le niveau d'anesthésie chez les animaux.

Un cathéter est ensuite implanté dans la veine jugulaire gauche chez rat, et dans la veine saphène gauche chez la souris. Les animaux sont par la suite montés sur les appareils stéréotaxiques (DAVID and Kopf pour la souris, Unimécanique LPC pour le rat), la température corporelle est maintenue autour de 37°C grâce à des plaques chauffantes.

Une incision est pratiquée au niveau du scalp et le crâne est dégagé de manière à visualiser le bregma, le lambda et la suture médiane. La trépanation du crâne est faite à l'aide d'une fraiseuse dentaire. Pour obtenir les enregistrements cellulaires :

Chez la souris : l'électrode de verre est descendue dans le cerveau à 2.9mm-3.8mm postérieur au bregma et entre 0.2-0.8mm latéralement par rapport à la ligne médiane et à 3.5-4.5mm de profondeur à partir de la surface du cerveau en accord avec l'atlas de Paxinos et Franklin (2004).

Le signal électrique est amplifié par un amplificateur d'impédance (Axon Instrument), visualisé sur un oscilloscope (Tektronix TDS 2002) et audible grâce à un moniteur audio (A.M. Systems Inc.). Il est stocké et traité à l'aide du programme Spike2 version 5 (CED, Cambridge Electronic Design, United Kingdom)

Chez le rat, l'électrode en tungstène est introduite dans le cerveau à 5.8mm-6.04mm postérieur au bregma et de 0.3 à 0.7 mm en interaural et à 7.5 à 8.5 mm à partir de la surface du cerveau, coordonnées en accord avec l'Atlas de Paxinos and Watson (1996).

Le signal électrique est filtré par un filtre Neurolog System NL115, amplifié par un amplificateur Neurolog System NL 104 et envoyé au CED 1401 et à un amplificateur audio Neurolog System NL 120 et visualisé sur oscilloscope Tektronix 5111. Le signal est numérisé par le CED1401 puis stocké sur un ordinateur PC et traité à l'aide du programme Spike2 versions 3.2, 4.2 et 5.2. (CED 1401 Cambridge Electronic Design, United Kingdom).

Les cellules dopaminergiques sont identifiées grâce à leurs propriétés électrophysiologiques. En effet les neurones dopaminergiques *in vivo*, présentent des potentiels d'action (PA ou spikes) caractérisés comme suit :

Ils sont triphasiques avec une post-hyperpolarisation marquée, ils sont de longue durée (> 2.0ms), avec une durée entre l'initiation du PA et son minimum > 1.1ms, ils ont une faible fréquence de décharge (< 10Hz), une activité tonique irrégulière et une activité phasique occasionnelle. Cette dernière nommée bouffée ou burst est caractérisée comme suit : initiée par un intervalle entre deux PA consécutifs < 80ms et terminée par un intervalle entre deux PA consécutifs > 160ms (Mameli-Engvall et al. 2006, Grace and Bunney 1984).

Les enregistrements sont ensuite traités en utilisant le logiciel Spike 2(3.2, 4.2 et 5.2).

Ces traitements permettent de comparer :

- l'activité des cellules avant et après injection des différentes substances,
- Les effets des différentes substances testées.

Le principal paramètre étudié est la variation de la fréquence des potentiels d'action des neurones dopaminergiques de l'ATV.

Une fois la cellule trouvée, son activité de base est enregistrée pendant quelques minutes (de 5 à 15 minutes) pour s'assurer de la stabilité du neurone avant de l'injecter en intraveineuse. À la fin de l'enregistrement, un courant électrique d'une intensité de 15 µA est appliqué, pendant 10s environ, afin de marquer l'emplacement de la cellule. Une perfusion intracardiaque d'une solution de formol à 10% est pratiquée. Le cerveau est ensuite extrait et conservé dans la même solution de perfusion. Des coupes de 60µm d'épaisseur sont réalisées et colorées suivant la méthode de Nissl. Cette manipulation nous a permis de vérifier sous microscope l'emplacement de la pointe de l'électrode.

## **9-Expériences de binding**

### **9-1-Culture cellulaire**

Nous avons utilisé une lignée de cellules HEK293 exprimant de façon stable les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  de souris. Ces cellules sont cultivées à 37°C dans un environnement humide avec 5% de CO<sub>2</sub> dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (41965 Invetrogen) complété à 10% de sérum veau foetal inactivé et des antibiotiques (100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine). Pour maintenir la lignée stable, de la Zéocine et de l'hygromycine sont ajoutés au milieu de culture (0,1mg/ml et 0,5mg/ml respectivement). Les réactifs de culture ont été achetés chez Biowhittaker (East Rutherford, NJ, USA) ou Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La lignée stable nous a gracieusement été offerte par le professeur Jerry STITZEL.

### **9-2-Technique de Potentiel de Membrane : Système FLIPR**

La pharmacologie de cette lignée stable a été caractérisée par FMP (FLIPR Membrane Potentiel) en accord avec le protocole du constructeur (Molecular Devices). Cette technique est basée sur la détection de fluorescence via le changement de potentiel de membrane de la cellule. Un colorant (le bis-oxonol) lipophile et anionique contenu dans le kit est excité à 530 nm; sa distribution au sein de la membrane plasmique est dépendante du potentiel de membrane de la cellule. Ainsi, la dépolarisation de la cellule va entraîner l'entrée du colorant qui va se lier aux protéines intracellulaires et aux lipides causant une augmentation du signal de fluorescence.

Les HEK293- $\alpha 4\beta 2$  stables sont distribuées dans des plaquettes de 96 puits à fond transparent recouvert de poly-D-Lysine à raison de 20 000 cellules par puit dans 100µl de milieu de culture. On ajoute cent microlitres du colorant 'Red Reagent' (Molecular Device) dans chaque puit puis on incube 30 minutes à 25°C.

La plaque 96 puits est lue 72h après division des cellules grâce au Tecan Inifinit 2000 C'est un lecteur de plaque qui va nous permettre de mesurer la fluorescence (en RFU : Réponse en unités de Fluorescence) à 560 nm causée par l'excitation à 530 nm avant et jusqu'à 45 secondes après addition de 20µl d'une solution d'agoniste (préparée en PBS1X, pH 7).

## **10-Statistiques et traitement des résultats**

Les résultats des différentes expériences ont été obtenus après traitement des données recueillies sous les logiciels Excel et R. Pour les données qui ont été traitées sous Excel, les résultats sont comparés en utilisant la méthode d'analyse de variance à une seule voie (ANOVA). Par la suite chaque groupe étudié est comparé à son groupe témoin par test t de student. Le test est considéré significatif pour  $p < 0,05$ .

Les données traitées sous R sont à leur tour testées sous Wilcoxon pour voir leur signification statistique. La différence est considérée significative pour  $p < 0,05$ .

### **Présentation des résultats :**

Sur les histogrammes et les courbes continues, les résultats sont exprimés en pourcentage de moyenne  $\pm$  SEM de la fréquence de décharge cellulaire (firing rate) et de l'activité en bouffée (bursts) par rapport au rythme de la ligne de base après injection des différentes substances

utilisées. Sur les courbes d'excitation/inhibition, les variations sont exprimées en pourcentage de moyenne avec leur intervalle de confiance. Concernant les fréquences :

Quand la ligne de base=0, cela signifie que les calculs des variations ont été faits en utilisant la formule :

$$\frac{(\text{Fréquence moyenne après injection} - \text{Fréquence moyenne de base})}{\text{Fréquence moyenne de base}}$$

Quand la ligne de base= 100 : les calculs des variations ont été faits suivant la formule

$$\frac{\text{Fréquence moyenne après injection}}{\text{fréquence moyenne avant injection}}$$

Les variations des bursts quand à elles sont exprimées selon la formule :

$$\Delta\% \text{ bursts} = \% \text{ des bursts près injection} - \% \text{ des bursts avant injection}$$

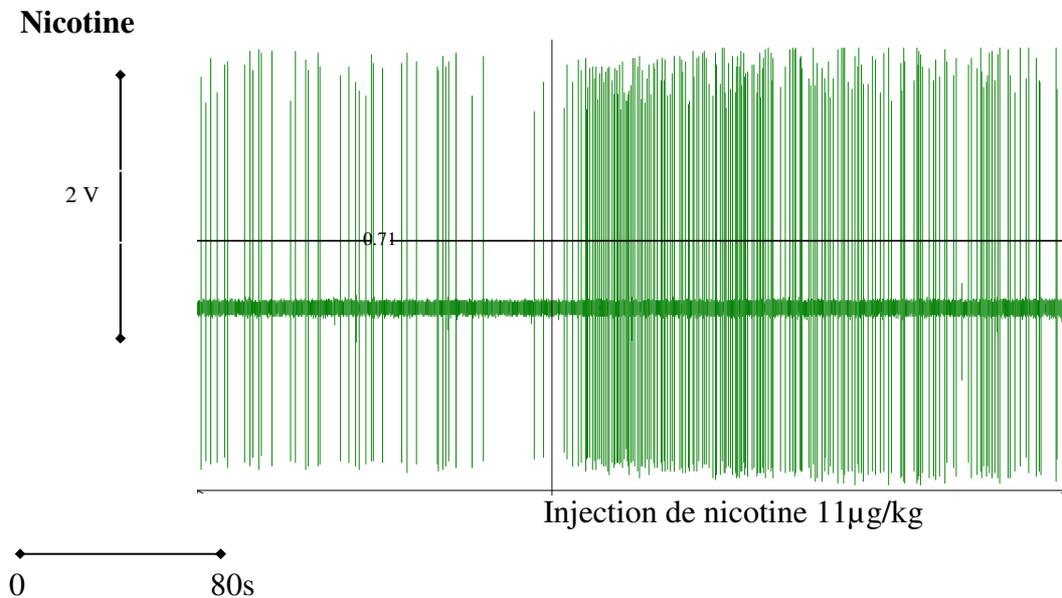
### III- Résultats

#### 11- Résultats chez le rat

##### 11-1- Effets de la nicotine chez le rat :

L'injection de nicotine à différentes doses allant de  $5\mu\text{g/kg}$  à  $45\mu\text{g/kg}$  en équivalent base de nicotine bitartrate, provoque en général une activation des cellules dopaminergiques de l'ATV. On observe une augmentation du firing rate et des bursts. Les plus grandes augmentations en firing et en bursts sont observées après une injection de  $11\mu\text{g/kg}$ . Les augmentations du firing sont statistiquement significatives après injections de toutes les doses, avec les plus fortes augmentations après les injections de  $11\mu\text{g/kg}$  et de  $45\mu\text{g/kg}$ .

L'augmentation de la fréquence en bursts n'est observée qu'après les injections de  $11\mu\text{g/kg}$  et  $45\mu\text{g/kg}$ , elles sont respectivement, de moyenne et de faible importance, mais statistiquement significatives.

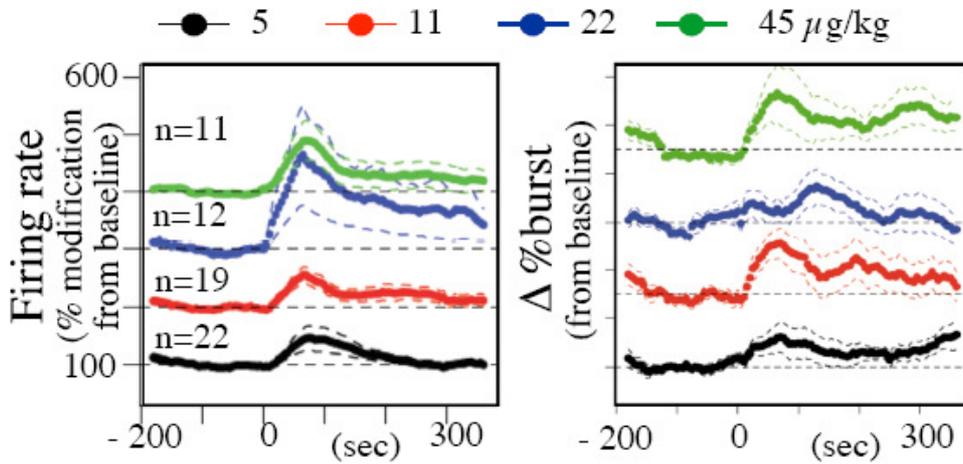


**Figure 1 :** Enregistrement extracellulaire de l'activité d'un neurone dopaminergique de l'ATV, montrant la variation de la fréquence de décharge des cellules dopaminergiques de l'ATV avant et après injection de nicotine.

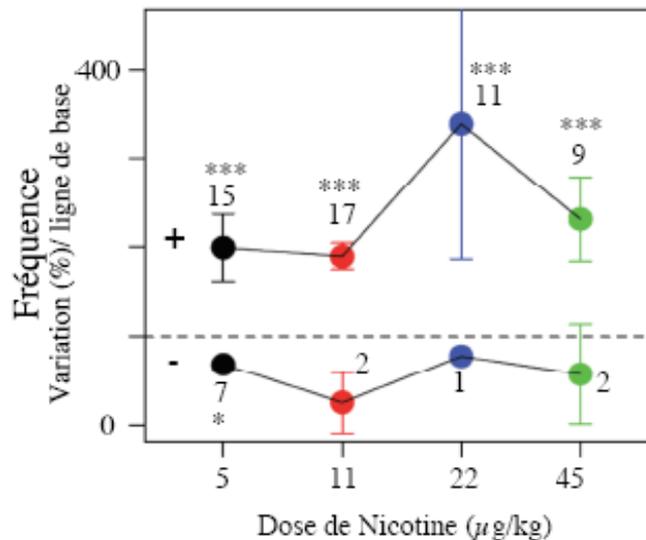
## Nicotine

A

B



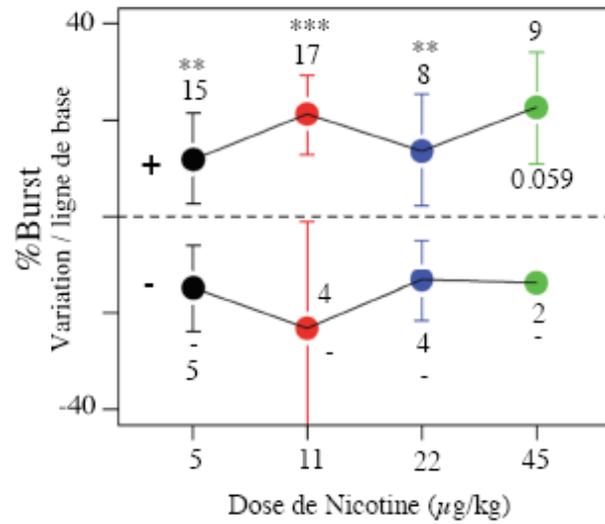
**Figure 2 :** Moyennes de variations de fréquence de firing (A) et des bursts (B) après injection des 4 doses de nicotine en équivalent base de nicotine bitartrate dans les neurones dopaminergiques de l'ATV.



**Figure 3 :** Ratio des activations/inhibitions provoquées par les différentes doses de nicotine bitartrate exprimées en nicotine base, sur le firing rate observé sur les cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat. 5μg/kg (na=15/ni=7) ; 11μg/kg (na=17/ni=2) ; 22μg/kg (na=11/ni=1) ; 45μg/kg (na=9/ni=2).

En terme de pourcentage, la dose 22μg/kg, montre un effet plus intense sur l'activation du firing rate (fig 2A et 3). Mais statistiquement, l'augmentation du firing rate est aussi significative avec toutes les doses ( $p < 0.005$ ) (fig3). La dose de 45μg/kg a également un effet activateur significatif ( $p < 0.005$ ), visible chez les cellules qui répondent par une activation mais un effet global nul

Pour les bursts, les doses de 5μg/kg, 11μg/kg et 22μg/kg ont un effet activateur sur les cellules qui répondent en s'activant. (fig 2B et 4) mais seules les doses de 11μg/kg et 22μg/kg ont un effet moyen statistiquement significatif ( $p < 0.05$ ).

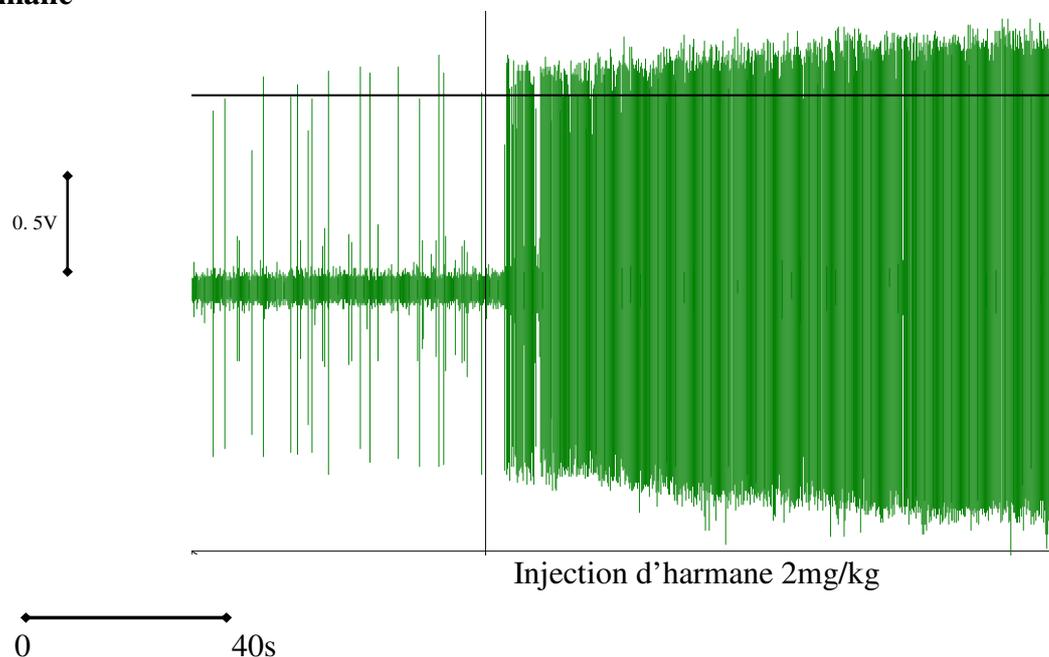


**Figure 4 :** Ratio des activations/inhibitions provoquées par les différentes doses de nicotine bitartrate exprimées en nicotine base, sur la variation en pourcentage de bursts observée sur les cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat. 5µg/kg (na=15/ ni=5) ; 11µg/kg (na=17/ni=4) ; 22µg/kg (na=8/ni=4) ; 45µg/kg (na=9/ ni=2).

## 11-2- Effets des $\beta$ -carbolines chez le rat :

### a- Effets de l'harmane

#### Harmane

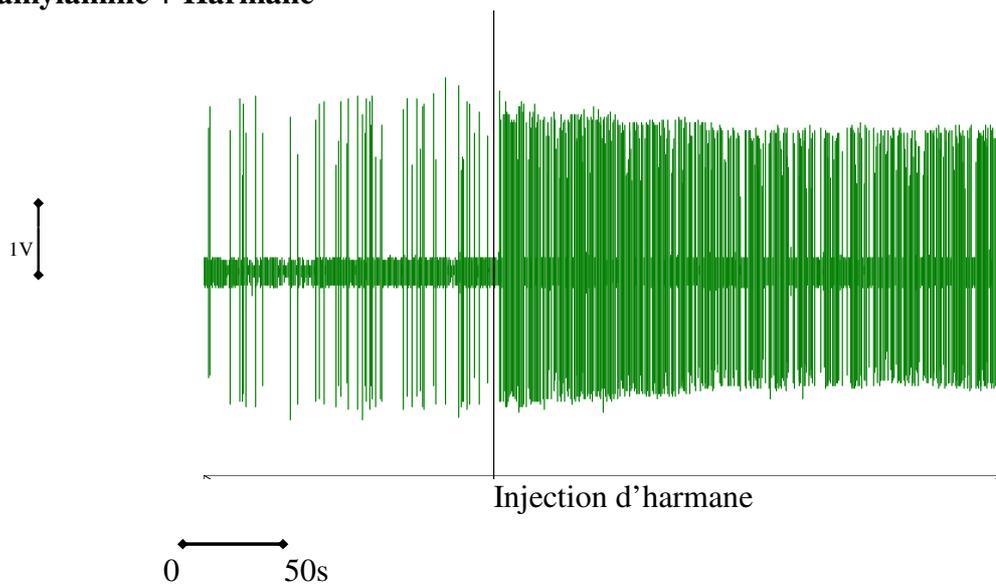


**Figure 5:** Enregistrement extracellulaire de l'activité électrophysiologique de neurone dopaminergique de l'ATV, montrant l'augmentation de la fréquence de décharge après une injection intraveineuse d'harmane à 2mg/kg.

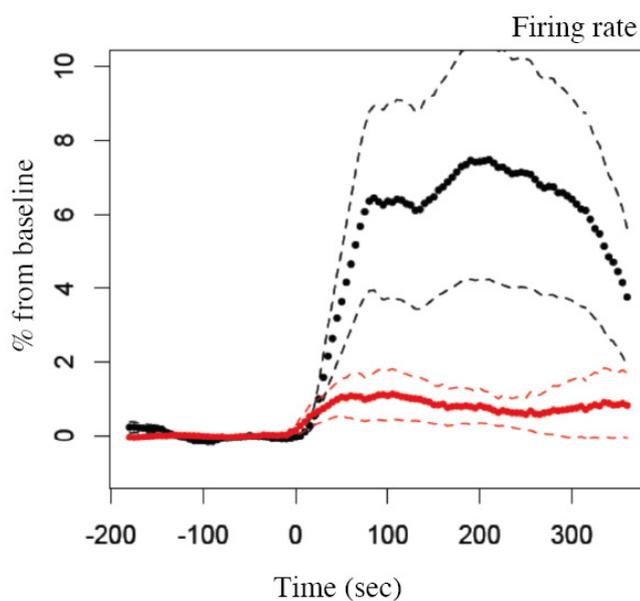
Nous avons par la suite réalisé une série d'expérimentations en associant la mécamylamine, un antagoniste des nAChRs, afin de voir si l'effet de l'harmane est lié à l'activation des nAChRs, ou s'il passe par une autre voie sachant que l'harmane est un IMAO- A.

La mécamylamine a été injectée aux animaux par voie intrapéritonéale 30minutes avant le début des enregistrements.

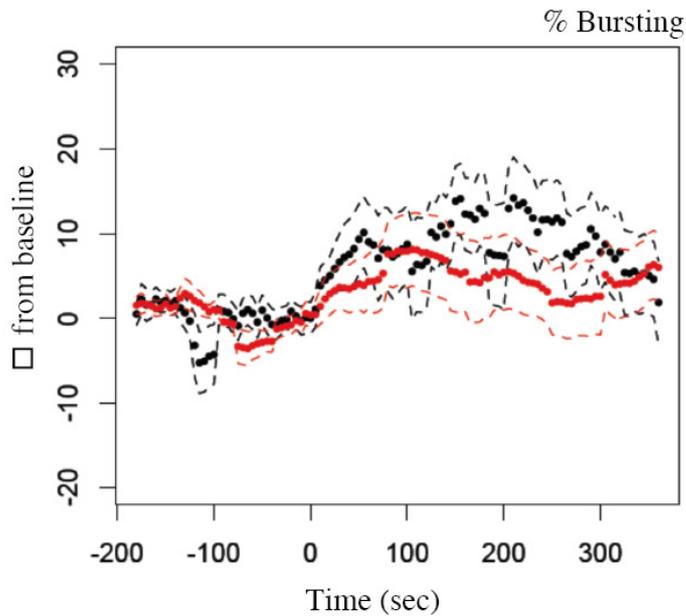
## Mécamylamine + Harmane



**Figure 6 :** Enregistrement extracellulaire d'un neurone dopaminergique de l'ATV, montrant la réponse cellulaire à l'injection en aiguë de l'harmane à 2mg/kg, après injection de mécamylamine à 4mg/kg.



**Figure 7 :** L'effet de l'harmane à 2mg/kg (en noir) fortement diminué par la mécamylamine (en rouge mécamylamine à 4mg/kg (n=23), injectée 30min avant le début de l'enregistrement, l'harmane est injectée 5 à 6 min après le début de l'enregistrement.



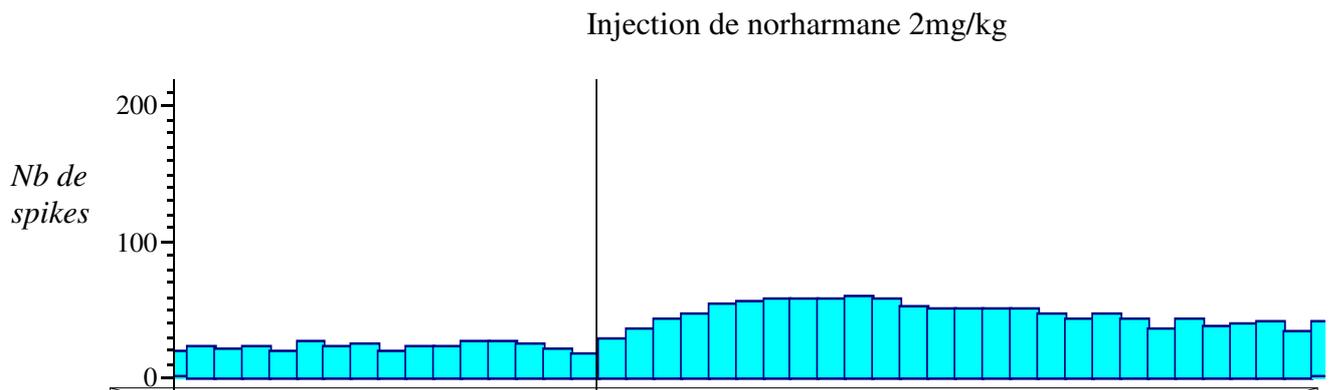
**Figure 8 :** Les bursts induits par l'harmane à 2mg/kg (en noir) sont fortement diminués. (Presque de 50%) par la mécamylamine à 4mg/kg (en rouge), néanmoins l'activité résiduelle reste statistiquement significative.

### **b-Effets de la norharmane**

La norharmane est un IMAO-B formé par pyrolyse dans le cône de combustion de la cigarette et par conséquent présente essentiellement dans la fumée ; nous l'avons testée sur deux lots de rats à deux doses 2mg/kg, puis 1mg/kg.

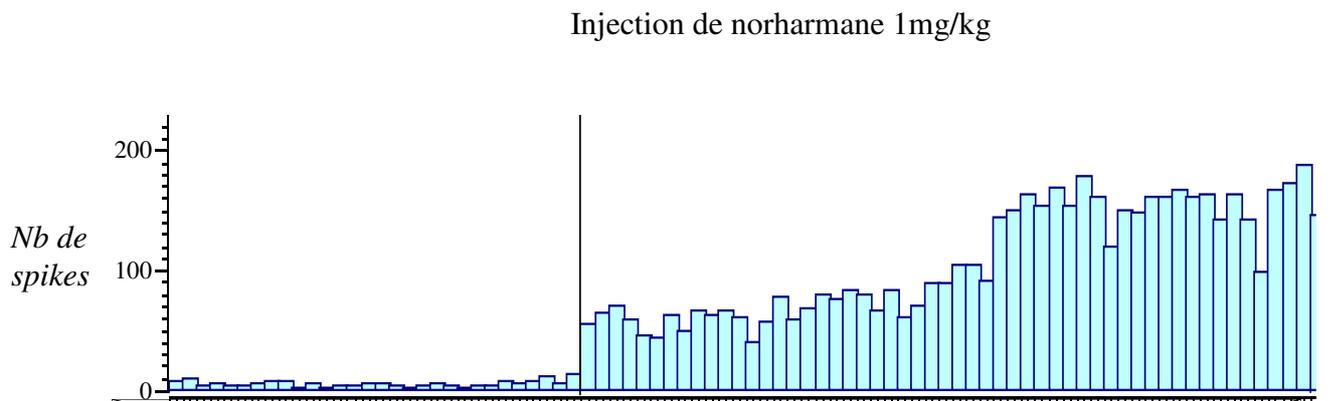
Nous remarquons sur les enregistrements que l'administration de la dose la plus faible (1mg/kg) provoque une réponse statistiquement plus significative ( $p < 0.01$ ) que celle obtenue en réponse à l'injection de la dose de 2mg/kg ( $p < 0.05$ ) (Fig. 9 ; 10 et 11).

## Norharmane 2mg/kg



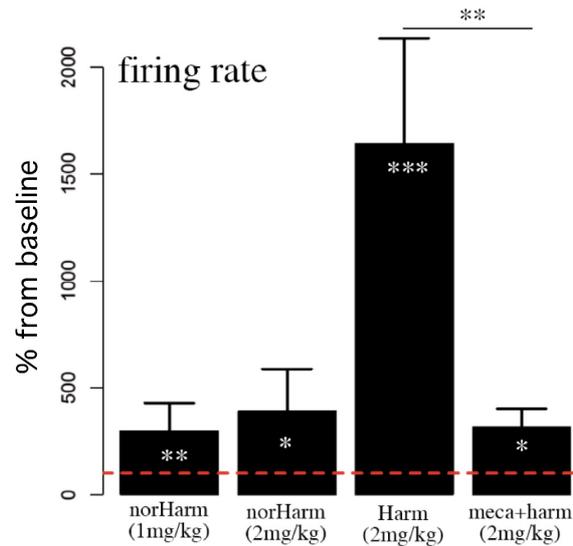
**Figure 9 :** *Intégral de l'enregistrement extracellulaire de l'activité de neurone dopaminergique de l'ATV montrant une légère augmentation de la fréquence du firing après injection de 2mg/kg de norharmane en aigu (Chaque bâtonnet est une tranche de 10 secondes).*

## Norharmane 1mg/kg

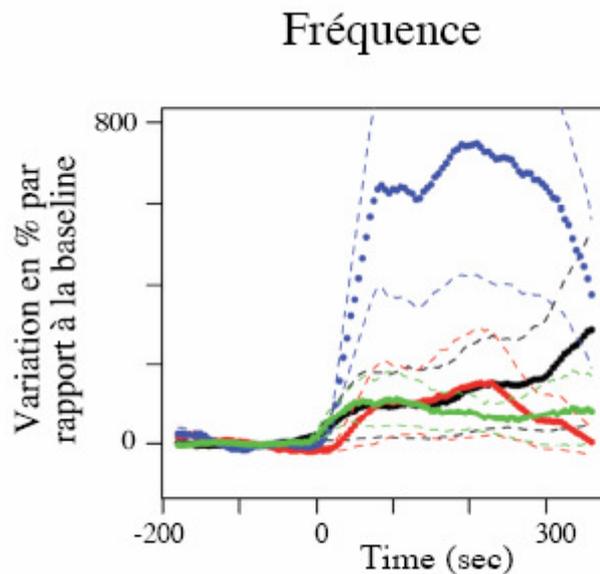


**Figure 10 :** *Intégral de l'enregistrement extracellulaire de l'activité de neurone dopaminergique de l'ATV montrant l'augmentation de la fréquence du firing après injection de 1mg/kg de norharmane en aigu (Chaque bâtonnet est une tranche de 10 secondes).*

A



B

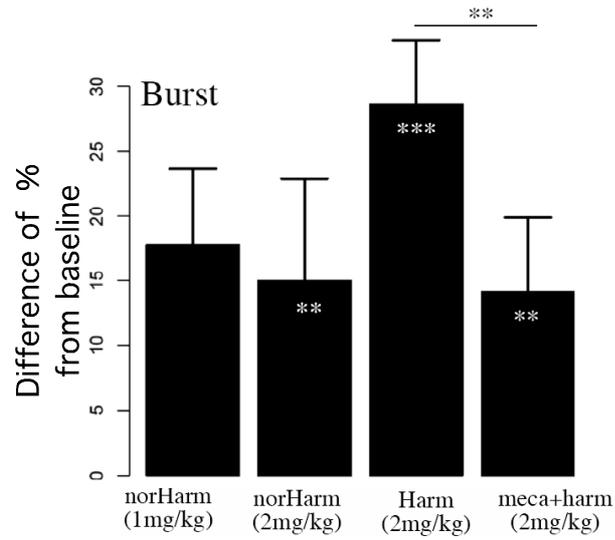


○NorHarm (1 mg/kg), n=14    ○NorHarm (2 mg/kg), n=16    ○Harm., n=26    ○Meca+Harm, n=23

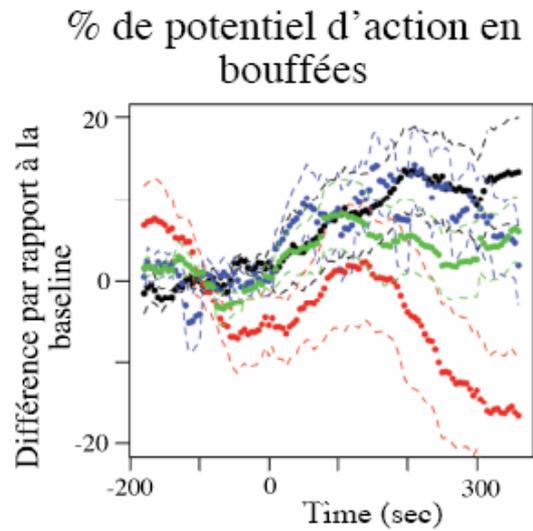
**Figure 11 :** Effets de l'harmane à 2mg/kg, de la norharmane à 1 et 2 mg/kg et de la mécamylamine (4mg/kg) + harmane (2mg/kg) sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

L'harmane à 2mg/kg, la norharmane à 1 et 2mg/kg, et la mécamylamine + harmane, tous ces composés induisent une augmentation statistiquement significative du firing. (Fig11 A et B). Concernant les bursts, l'augmentation est également significative sauf pour la norharmane à 1mg/kg. (Fig. 12 A et B)

**A**



**B**

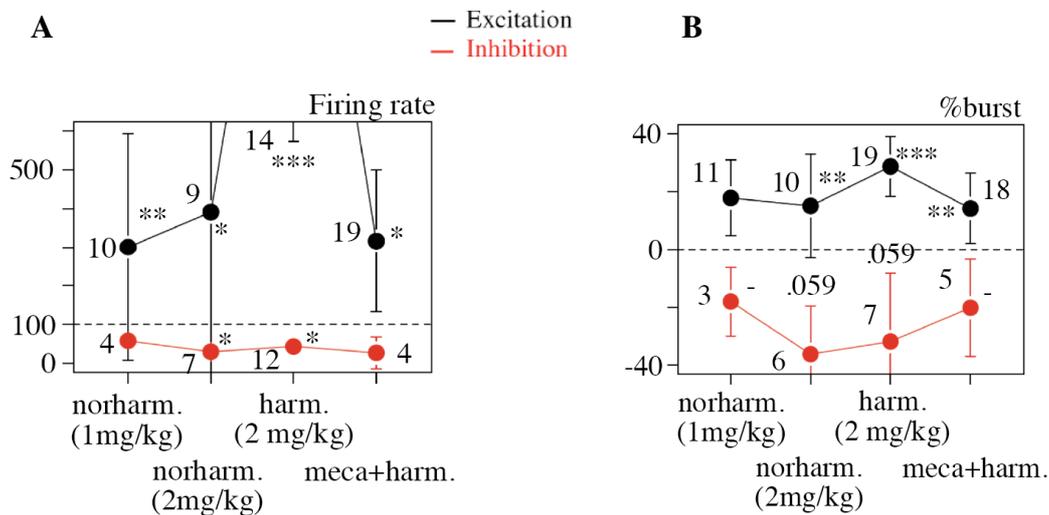


oNorHam (1 mg/kg), n=14   oNorHam (2 mg/kg), n=16   oHarm., n=26   oMeca+Harm, n=23

**Figure 12 :** Effets de la norharmane (2mg/kg), de l'harmane (2mg/kg) et de la mécamylamine (4mg/kg) + harmane (2mg/kg) sur les bursts des cellules dopaminergiques de l'ATV chez le rat.

Deux groupes de neurones ont été identifiés pour chaque substance, un groupe de neurones qui sont activés et un groupe de cellules qui s'inhibent. L'inhibition provoquée par la norharmane à 2mg/kg et l'harmane à 2 mg/kg sur le firing rate, observée dans le groupe des cellules qui répondent en s'inhibant, est statistiquement significative ( $p < 0.05$ ). Néanmoins ces neurones sont moins nombreux et l'activation provoquée par ces deux doses sur les neurones qui répondent par une activation est beaucoup plus importante que l'effet inhibiteur observé. ( $p < 0.001$  pour l'harmane). L'augmentation du firing rate est également très significative pour la norharmane à 1mg/kg ( $p < 0.01$ ) et reste significative pour l'harmane en présence de la mécamylamine ( $p < 0.05$ ), tandis que l'effet inhibiteur est non significatif pour ces deux derniers cas. (fig13A).

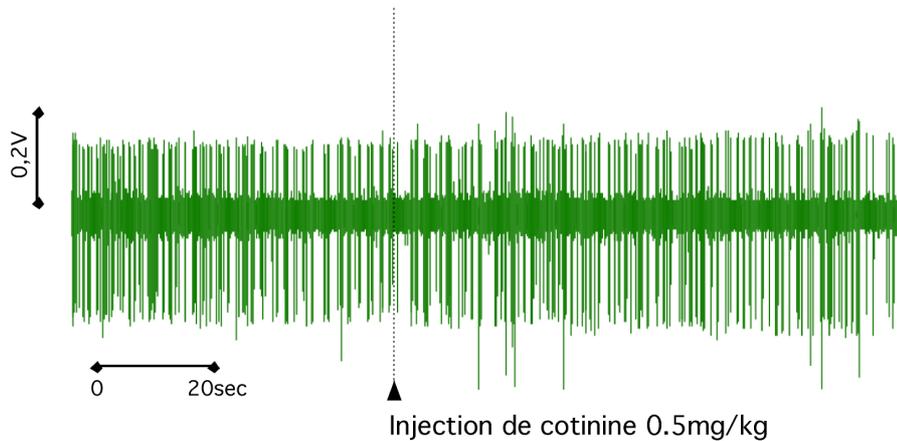
Pour les bursts, tous les composés provoquent une variation positive statistiquement significative dans les pourcentages des spikes en bursts :  $p < 0.005$  pour l'harmane,  $p < 0.01$  pour la norharmane à 2mg/kg et la mécamylamine (4mg/kg) + harmane (2mg/kg) sauf pour la norharmane à 1mg/kg. L'effet inhibiteur reste non significatif pour tous les composés. (Fig13 B)



**Figure 13 :** Réponses des différents groupes de neurones aux injections aiguës d'harmane 2mg/kg, norharmane 1 et 2mg/kg, et mécamylamine 4mg/kg + harmane 2mg/kg.

### 11-3- Effets de la cotinine

La cotinine est le principal métabolite de la nicotine chez le fumeur et dans la plante. Nous avons réalisé une série d'expériences en injectant une dose de 0,5 mg/kg de cotinine.

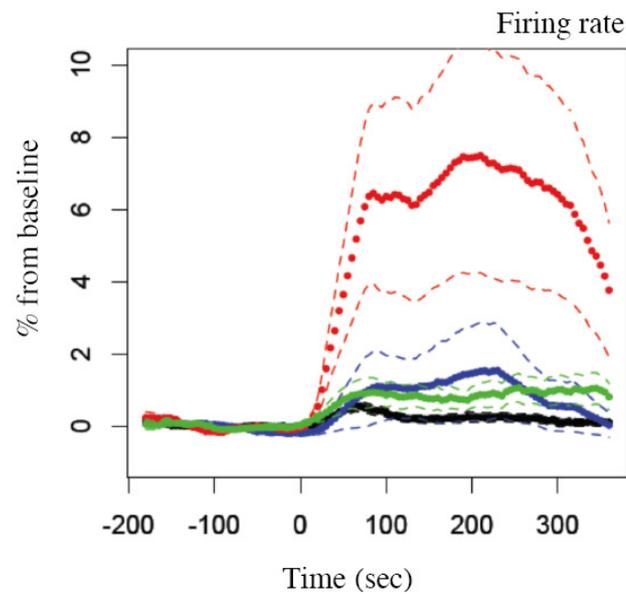
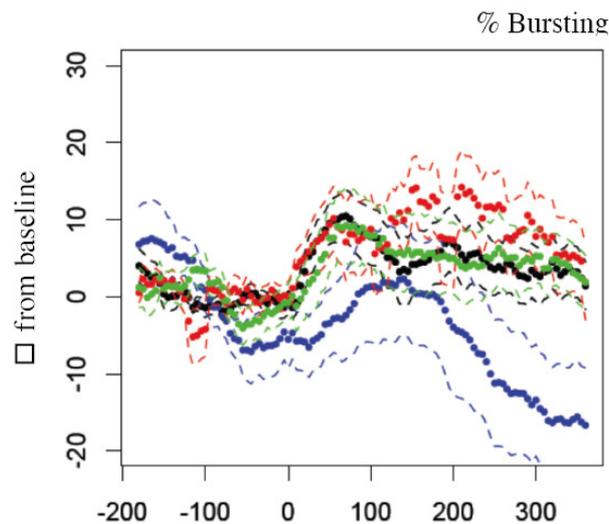


**Figure 14 :** Enregistrement extracellulaire de l'activité d'un neurone dopaminergique de l'ATV. L'injecton de la cotinine n'a eu aucun effet notable sur la fréquence des décharges de la cellule.

### 11-4- Comparaison des effets des $\beta$ -carbolines avec certains IMAO :

Sachant que l'harmane et la norharmane sont des IMAO A et B respectivement, nous avons donc voulu comparer leurs effets à ceux de deux IMAO : la sélégiline un IMAO B et la béfloxatone un IMAO A.

L'effet de l'harmane a été comparé à celui de la sélégiline, de la norharmane à 2mg/kg et à celui de la nicotine à 11 $\mu$ g/kg. Cette dernière a été choisie parce que parmi toutes les doses de nicotine que nous avons testées, elle est celle qui provoque une augmentation statistiquement significative aussi bien sur le firing rate que sur les bursts.

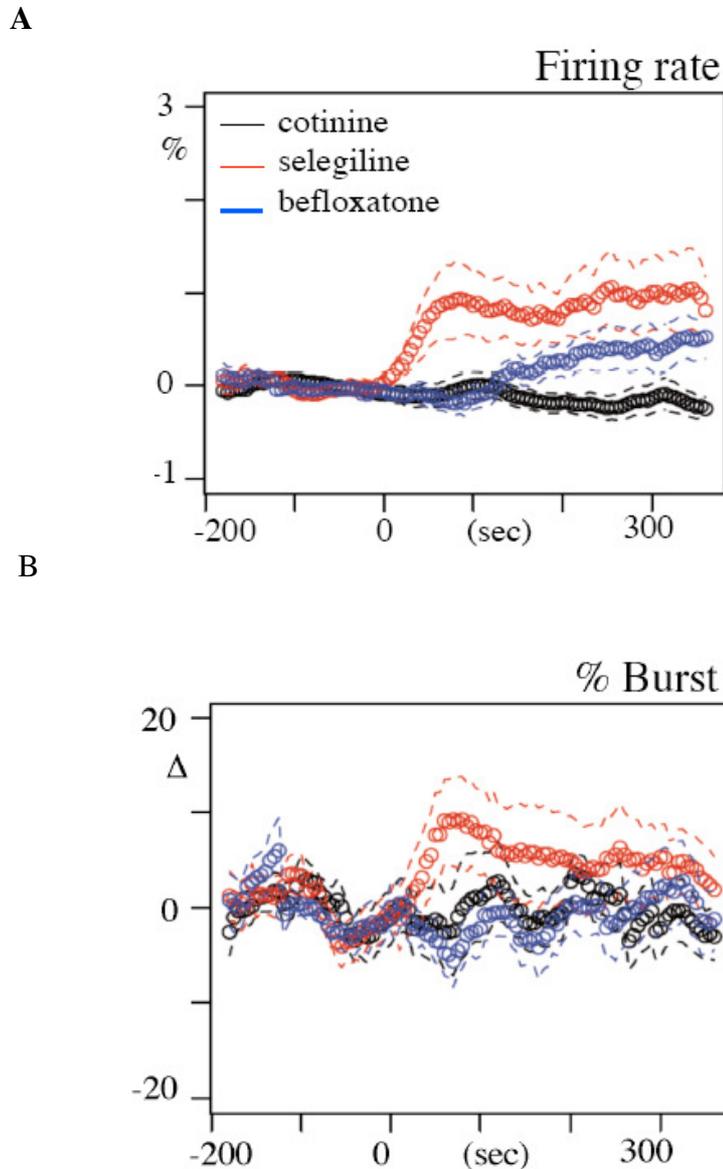
**A****B**

**Figure 15:** Effets de l'harmane 2mg/kg (rouge, n=26), de la norharmane 2mg/kg (bleu, n=16), de la nicotine 11 $\mu$ g/kg (noir n=19) et de la sélégiline 0,5mg/kg (vert, n=18) sur les cellules dopaminergique de l'ATV chez le rats. **A:** % du firing rate par rapport à la baseline. **B :** variation du % des spikes en bursts par rapport à la baseline.

L'harmane, la norharmane 2mg/kg, la nicotine 11 $\mu$ g/kg et la sélégiline augmentent de manière statistiquement significative aussi bien le firing rate que les bursts.

Nous avons observé que l'augmentation du firing rate et en bursts provoquée par la sélégiline est plus forte que celle due à la norharmane. Bien qu'ils soient tous les deux des IMAO B. Notons aussi que les concentrations utilisées pour les deux substances ne sont pas tout à fait égales, mais nous les avons choisies, surtout en ce qui concerne la sélégiline, en se référant aux valeurs utilisées dans différents travaux publiés.

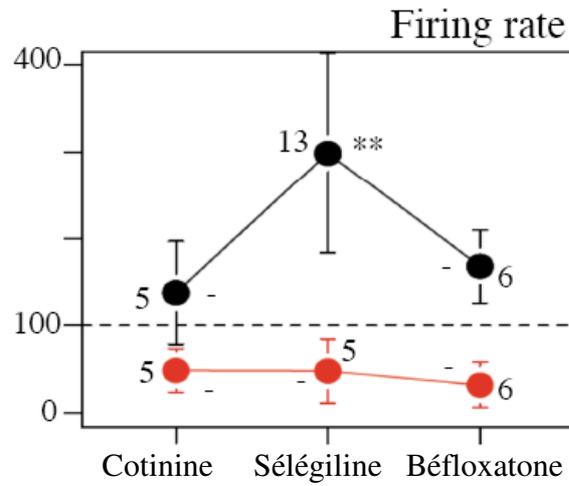
La béfloxatone, IMAO-A a été testée afin de comparer ses effets à ceux de l'harmane. Sur les figures suivantes, nous avons distingué deux groupes de cellules, un groupe de cellules avec des réponses positives et un groupe de cellules ayant une réponse négative à chacune des substances (cotinine, befloxatone et sélégiline)



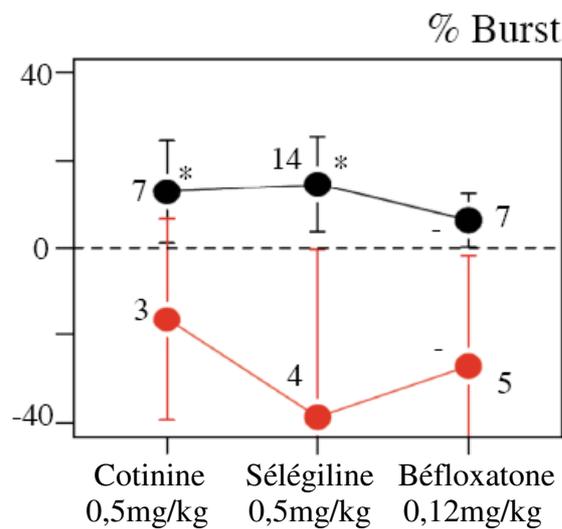
**Figure 16 :** Effets de la cotinine 0,5mg/kg, de la sélégiline 0,5mg/kg et de la béfloxatone 0,12mg/kg sur le firing rate (A) et les bursts (B) des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

— Excitation  
 — Inhibition

A



B



**Figure 17 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par les différentes substances injectées. Sur le firing rate (A) et sur les bursts (B).

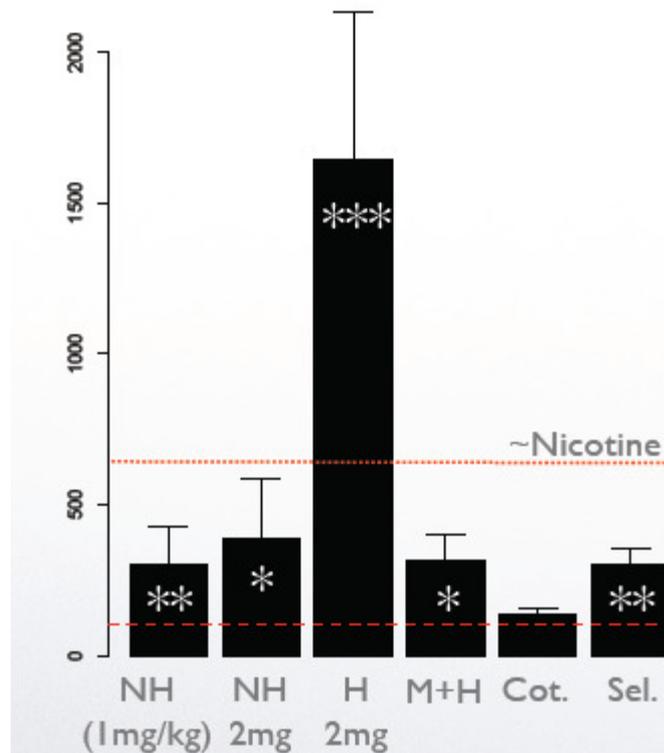
La cotinine n'a pas d'effet sur le firing rate des cellules dopaminergiques, en revanche elle induit une augmentation statistiquement significative en bursts ( $p < 0.05$ ).

La sélégiline induit une augmentation statistiquement significative du firing rate ( $p < 0.01$ ), ainsi que sur les bursts ( $p < 0.05$ ).

Quant à la béfloxatone, elle ne semble avoir aucun effet ni sur le firing rate ni sur les bursts.

En récapitulation :

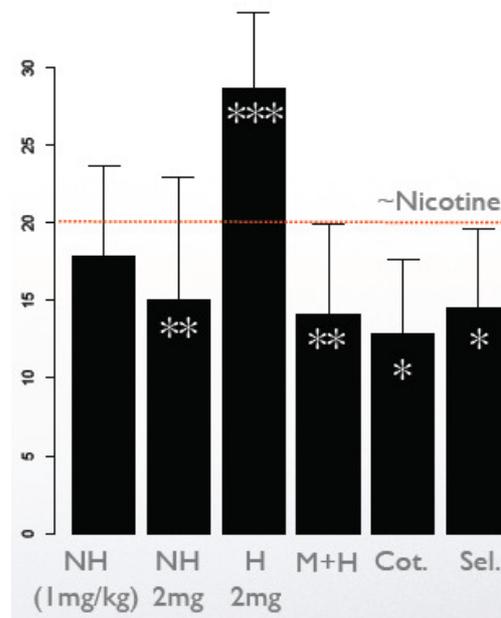
### Firing rate



**Figure 18 :** Histogramme récapitulatif des effets de l'harmane (2mg/kg), de la norharmane (1 et 2mg/kg), de la mécamylamine (4mg/kg), de la cotinine (0,5mg/kg) et de la sélégiline (0,5mg/kg) sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat, exprimé en pourcentage par rapport à la baseline.

Toutes les substances, à part la cotinine et la bécloprate (non représentée sur l'histogramme), ont un effet activateur statistiquement significatif sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'ATV.

## Bursts



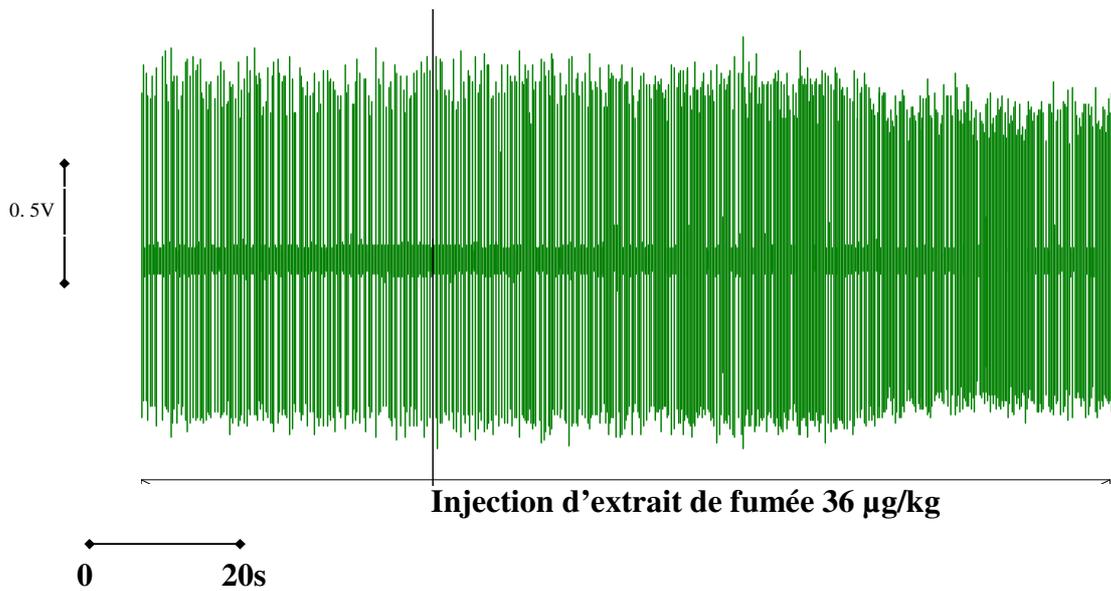
**Figure 19 :** Histogramme récapitulatif des effets de l'harmane (2mg/kg), de la norharmane (1 et 2mg/kg), de la mécamylamine (4mg/kg), de la cotinine (0,5mg/kg) et de la sélégiline (0,5mg/kg) sur les bursts des cellules dopaminergiques activées de l'aire tegmentale ventrale chez le rat, exprimés en variation de pourcentage de potentiel d'action en burst part rapport a la baseline.

Toutes les substances, excepté la norharmane à 1mg/kg, provoquent une augmentation dans la fréquence des spikes en bursts dans les cellules dopaminergiques de l'ATV.

Sachant que dans les cigarettes, les fumeurs consomment du tabac, inhalent sa fumée, et donc ne consomment pas de la nicotine purifiée nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences en injectant des doses différentes de nicotine, d'extrait de tabac et de fumée en intraveineuse, sur deux modèles animaux, le rat et la souris.

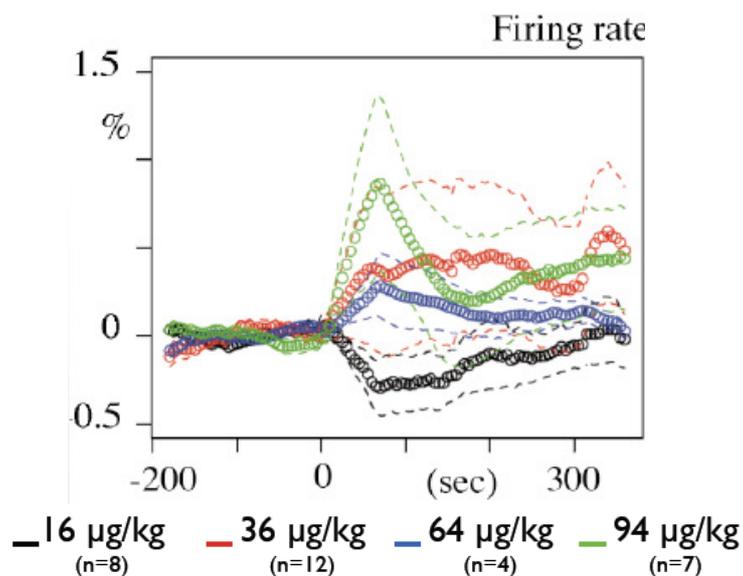
## 11-5- Effets des extraits de tabac et de fumée chez le rat

### a-Extrait de fumée

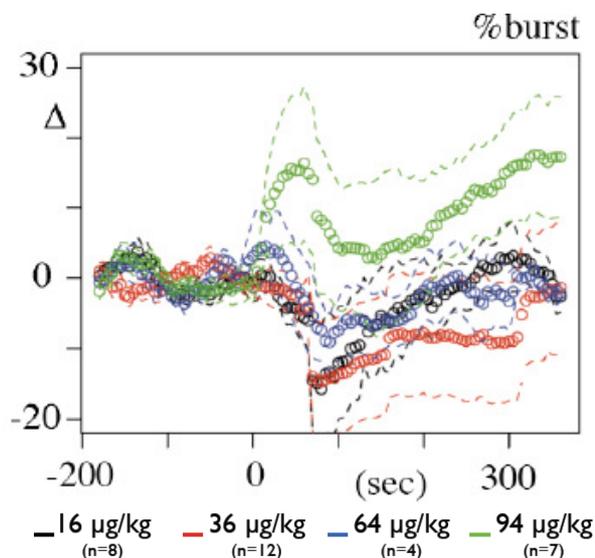


**Figure 20 :** Enregistrement extracellulaire de l'activité électrophysiologique montrant l'effet d'une injection d'extrait de fumée sur une cellule dopaminergique de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

Nous avons testé quatre doses d'extrait de fumée exprimées en équivalent nicotine chez le rat.

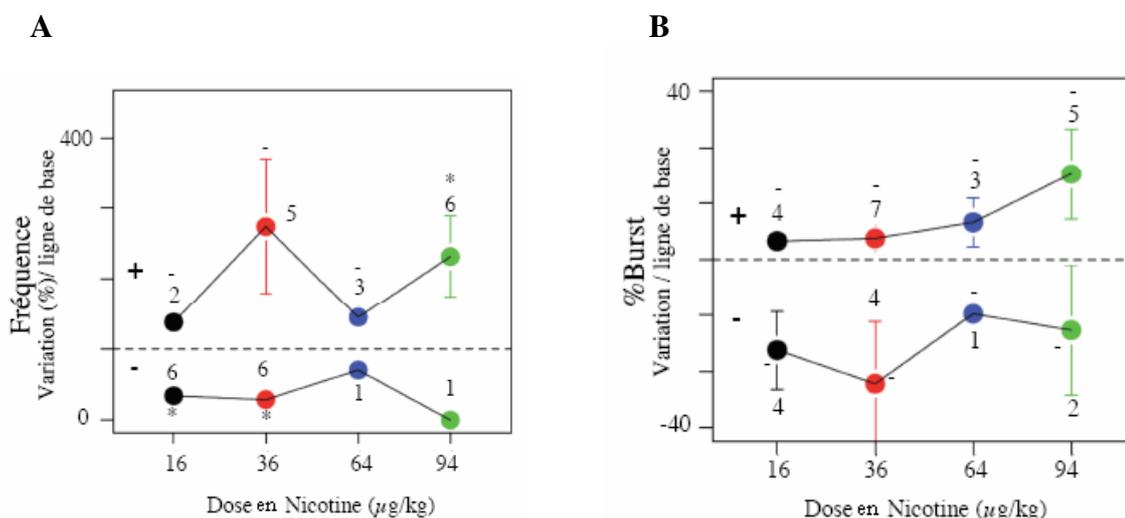


**Figure 21 :** Effets des différentes doses d'extrait de fumée exprimées en équivalent nicotine, sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.



**Figure 22 :** Effets des différentes doses d'extrait de fumée exprimées en équivalent nicotine, sur la variation des fréquences en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

Les cellules testées pour les extraits de fumée ont été divisées en deux groupes selon leur type de réponse, un groupe de cellules qui répondent par une activation et des groupes de cellules répondant par une inhibition. Les ratios des réponses sont représentés sur les figures

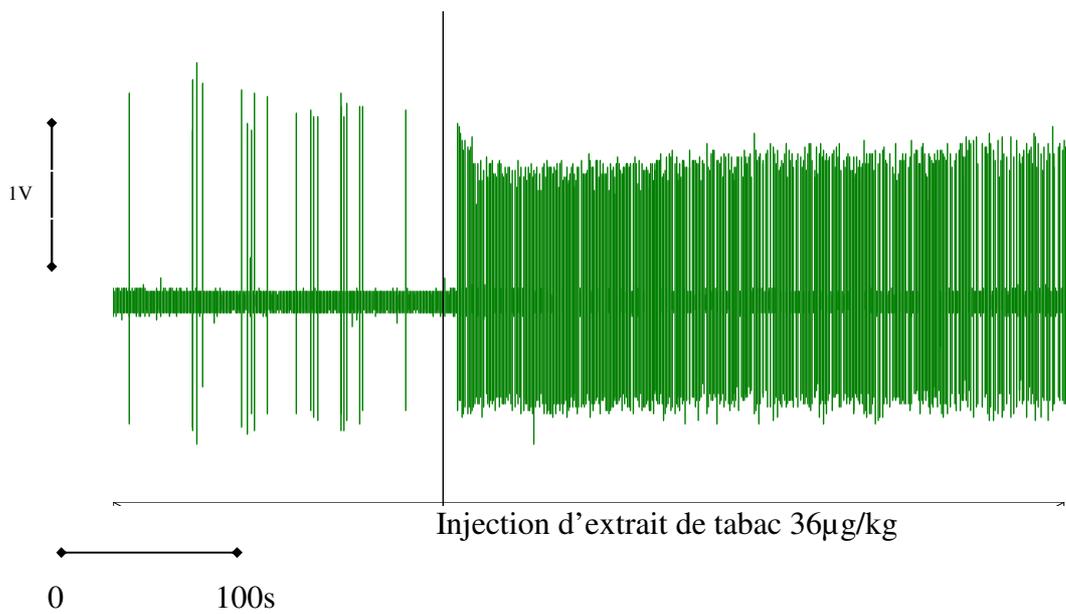


**Figure 23 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par les différentes doses d'extraits de fumée exprimées en équivalent nicotine base. Sur le firing rate (A) ; et sur les bursts (B).

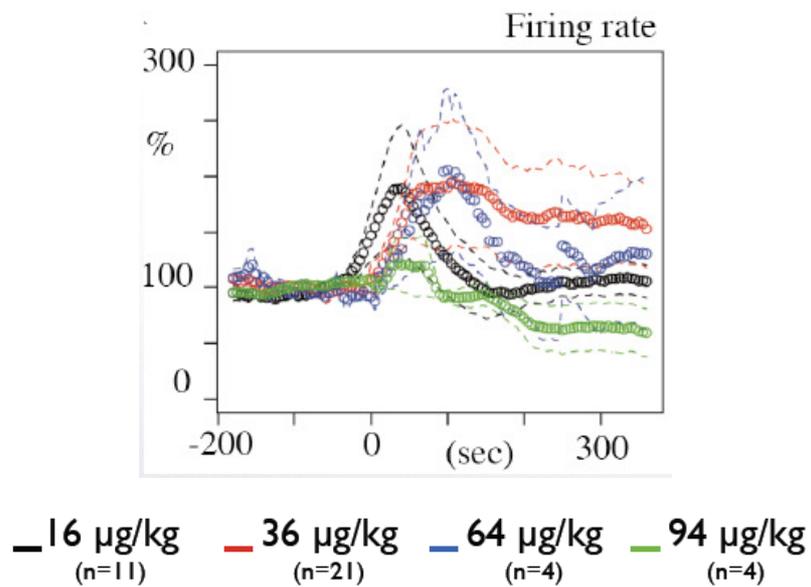
Pour le firing rate, seule la dose de 94µg/kg provoque une activation statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), les autres doses n'ont pas d'effet activateur notable. En revanche les doses 16µg/kg et 36 µg/kg ont un effet inhibiteur du firing rate qui est statistiquement significatif ( $p < 0.05$ ).

En ce qui concerne les bursts aucune des quatre doses testées ne présentent d'effet significatif.

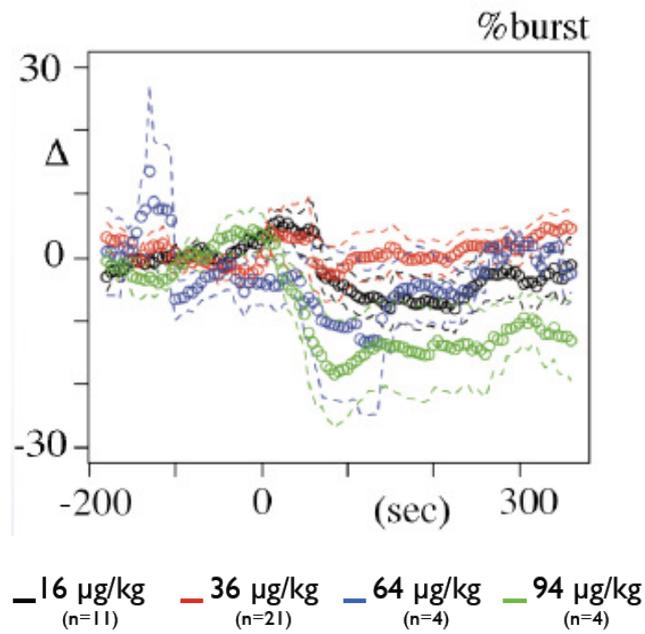
### b-Extrait de tabac



**Figure 24 :** Enregistrement extracellulaire de l'activité électrophysiologique montrant l'effet d'une injection d'extrait de tabac sur une cellule dopaminergique de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

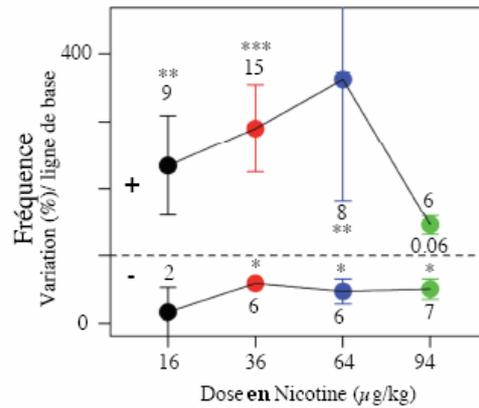
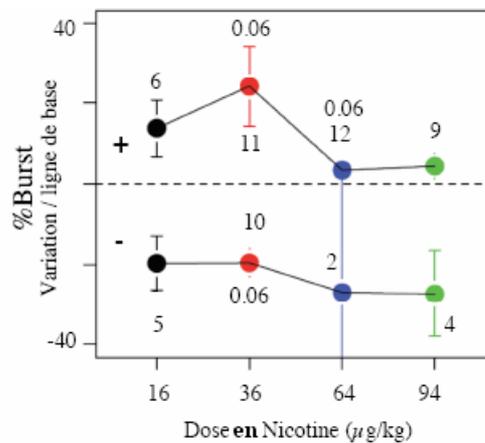


**Figure 25 :** Effets des différentes doses d'extrait de tabac exprimées en équivalent nicotine, sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.



**Figure 26 :** Effets des différentes doses d'extrait de fumée exprimées en équivalent nicotine, sur la variation des fréquences en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

Pour mieux visualiser les effets de chaque dose, nous présentons les ratios des réponses cellulaires pour le firing rate et les bursts.

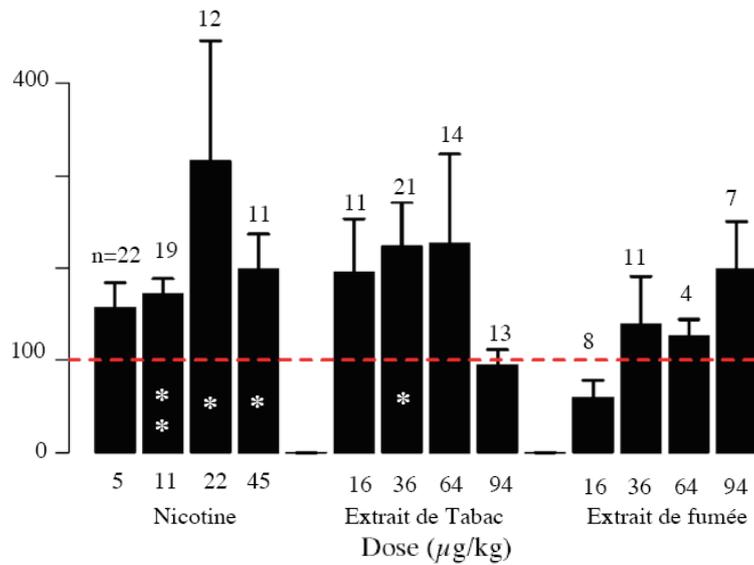
**A****B**

**Figure 27 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par les différentes doses d'extraits de tabac exprimées en équivalent nicotine base. Sur le firing rate (A) ; et sur les bursts (B).

Seule la dose de 36µg/kg d'extraits de tabac exprimée en équivalent nicotine a des effets activateurs globaux statistiquement significatifs sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'ATV ( $p < 0.05$ ), alors que les doses de 16, 64 et 94µg/kg n'ont pas d'effets notables en moyenne.

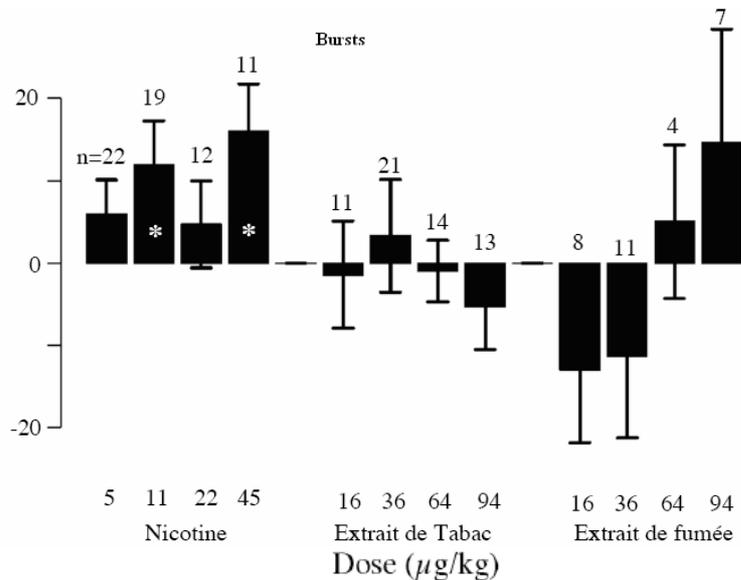
Néanmoins, si l'on observe de plus près les deux populations de cellules, activées et inhibées, nous observons que toutes les doses provoquent une augmentation du firing rate statistiquement très significative sauf la dose de 94µg/kg. Alors que seules les doses de 36, 64 et 94µg/kg ont des effets inhibiteurs significatifs et pas la dose de 16µg/kg.

D'un autre côté, aucune des quatre doses étudiées n'a d'effet sur les variations en bursts de l'activité cellulaire dans l'ATV. Pour résumer, les figures 28 et 29 récapitulent les effets de la nicotine, des extraits de tabac et de la fumée, sur les cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale sur le firing rate et sur les bursts.



**Figure 28 :** Histogramme récapitulatif des effets activateurs de chacune des quatre doses testé de nicotine, d'extraits de tabac et de fumée sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat, exprimé en pourcentage par rapport à la baseline.

Nous observons que la nicotine a des effets activateurs sur le firing rate, statistiquement significatifs à trois doses (11µg/kg, 22µg/kg et 45µg/kg), alors que seule la dose de 36µg/kg provoque une activation statistiquement significative pour l'extrait de tabac, et aucune dose d'extrait de fumée ne donne de réponse significative.



**Figure 29 :** Histogramme récapitulatif des effets de chacune des quatre doses testées de nicotine, d'extraits de tabac et de fumée sur les bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat, exprimé en variation de pourcentage de potentiel d'action en burst part rapport a la baseline.

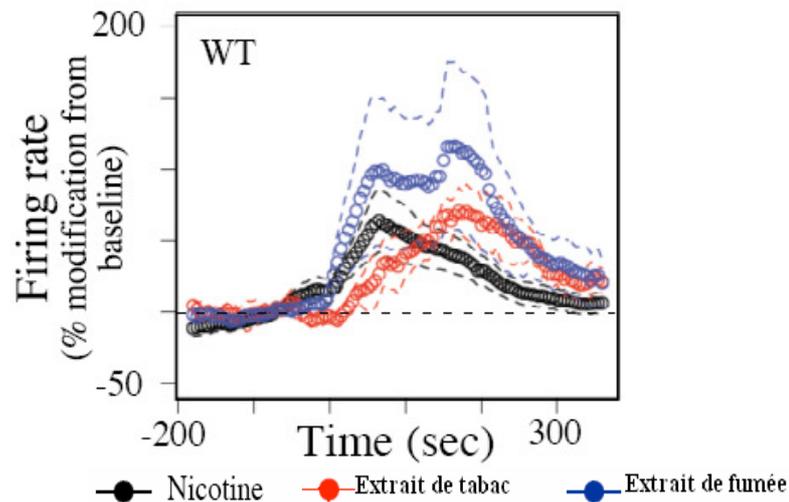
Seules deux doses de nicotine, 11 $\mu$ g/kg et 45 $\mu$ g/kg, provoquent une variation positive statistiquement significative de la fréquence des spikes en bursts. En revanche aucune des doses d'extraits de fumée ni de tabac ne provoque de variation significative de l'activité en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez le rat.

## 12- Résultats chez la souris :

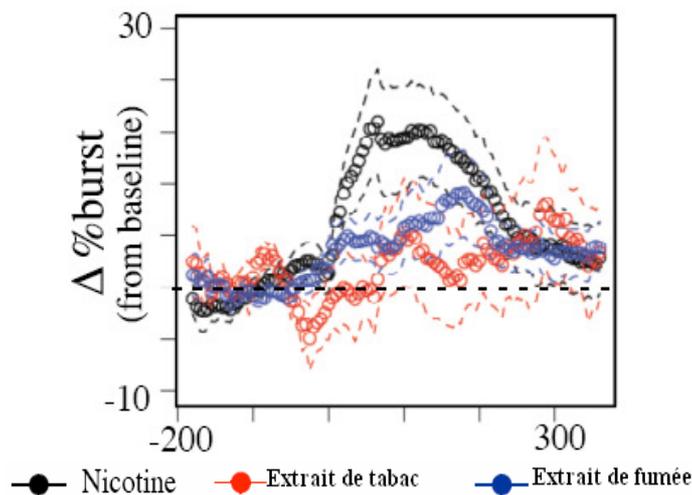
### 12-1- Chez la souris WT

Nous avons également testé la nicotine, l'extrait de tabac et l'extrait de fumée sur un deuxième modèle animal : la souris. Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures qui suivent.

Nous avons testé une seule dose de nicotine, 30  $\mu$ g/kg, les extraits de tabac et de fumée ont été préparés pour obtenir des doses équivalentes en nicotine. Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures 30



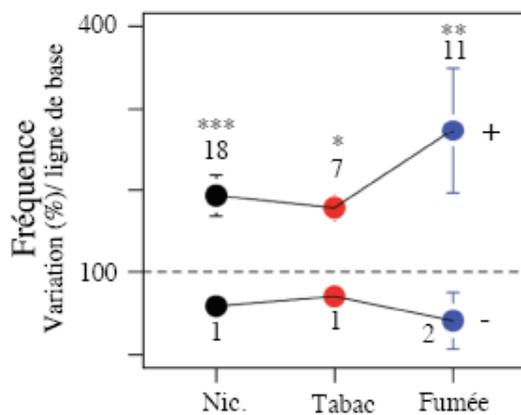
**Figure 30 :** Effets d'extrait de tabac, d'extrait de fumée et de nicotine à 30 $\mu$ g/kg, exprimées en équivalent nicotine, sur la variation du firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez la souris.



**Figure 31 :** Effets d'extrait de tabac, d'extrait de fumée et de nicotine à 30 $\mu$ g/kg, exprimées en équivalent nicotine, sur la variation en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez la souris. Pour mieux visualiser les effets des substances nous avons séparé les groupes de cellules selon leur réponse.

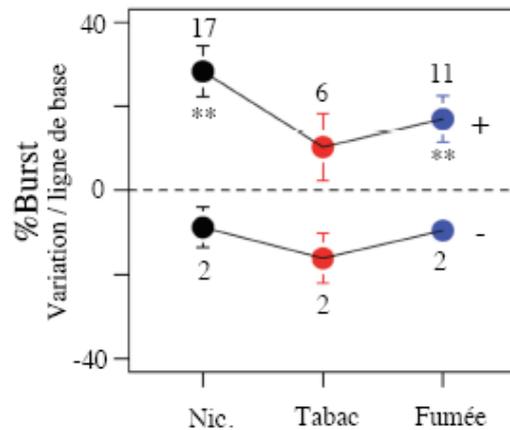
**A**

**Firing rate**



**B**

**Bursts**



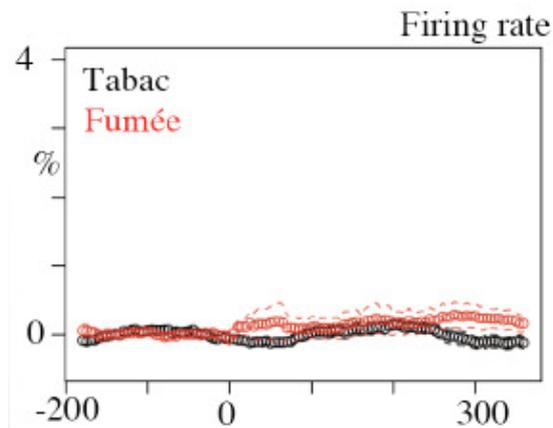
**Figure 32 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par l'extrait de tabac, de fumée et la nicotine à 30 $\mu$ g/kg exprimés en équivalent nicotine base. Sur le firing rate (A) ; et sur les bursts (B).

L'extrait de fumée induit une augmentation du firing rate plus importante que celle provoquée par l'extrait de tabac et la nicotine seule. Les augmentations dues à l'extrait de tabac et à la nicotine sont de même intensité. Néanmoins toutes les augmentations sont statistiquement significatives ( $p < 0,005$  pour la nicotine et  $p < 0,05$  pour le tabac et la fumée).

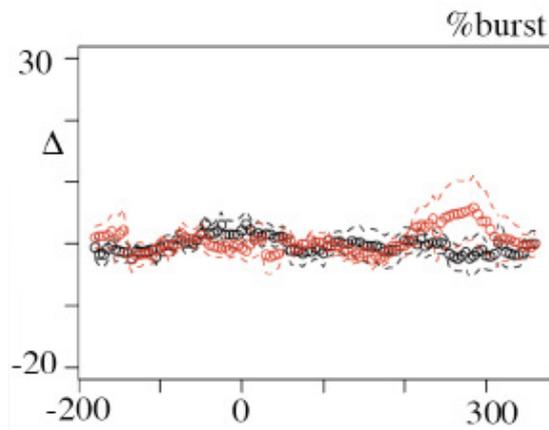
Concernant les bursts, la nicotine et l'extrait de fumée ont un effet activateur statistiquement significatif sur l'activité en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez la souris ce qui n'est pas le cas de l'extrait de tabac.

## 12-2- Chez la souris $\beta 2^{-/-}$

Afin d'essayer de déterminer par quel type de récepteurs les extraits de fumée et de tabac agissent sur les cellules dopaminergiques, nous avons donc testé les mêmes doses chez les souris  $\beta 2$  Knock out.



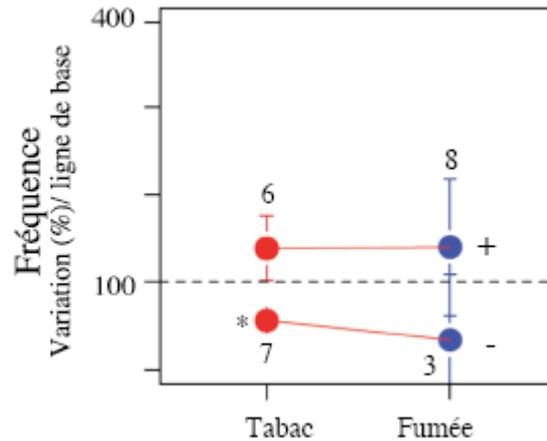
**Figure 33 :** Effets d'extrait de tabac et d'extrait de fumée à  $30\mu\text{g}/\text{kg}$ , exprimées en équivalent nicotine, sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez la souris  $\beta 2^{-/-}$ .



**Figure 34 :** Effets d'extrait de tabac et d'extrait de fumée à  $30\mu\text{g}/\text{kg}$ , exprimées en équivalent nicotine, sur la variation en bursts des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale chez la souris  $\beta 2^{-/-}$ .

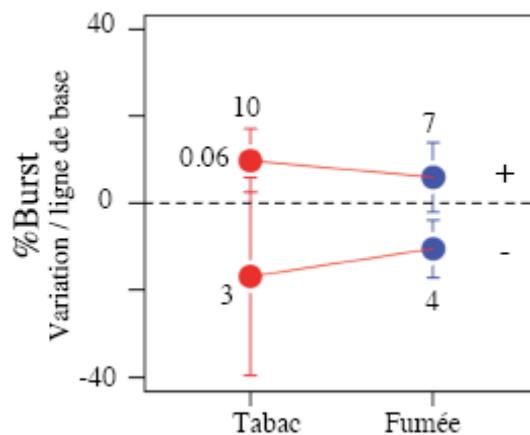
Nous avons ressorti les différents groupes de cellules en fonction de leur réponse aux substances injectées.

## Firing rate



**Figure 35 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par l'extrait de tabac et de fumée à 30 $\mu$ g/kg exprimés en équivalent nicotine base sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'ATV chez la souris  $\beta 2^{-/-}$ .

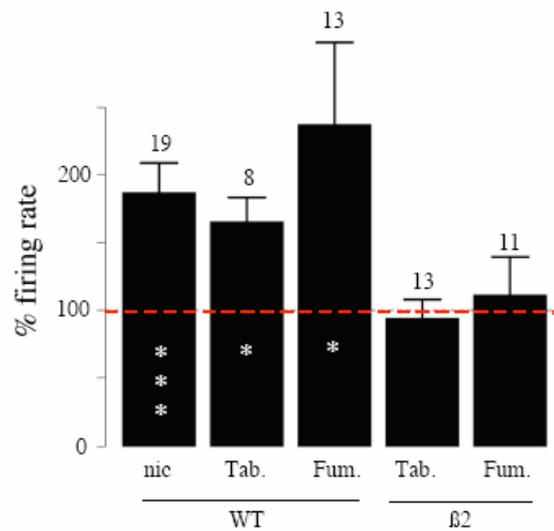
## Bursts



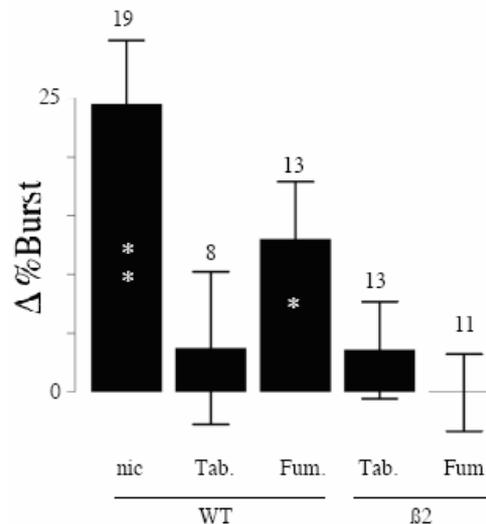
**Figure 36 :** Ratio du nombre d'activations/inhibitions provoquées par l'extrait de tabac et de fumée à 30 $\mu$ g/kg exprimés en équivalent nicotine base sur la variation de la fréquence en bursts des cellules dopaminergiques de l'ATV chez la souris  $\beta 2^{-/-}$ .

Nous n'avons relevé aucun effet dû aux extraits de fumée ou de tabac, ni sur le firing rate ni sur les bursts des cellules dopaminergiques de l'ATV chez les souris  $\beta 2^{-/-}$ . Rappelons que les souris  $\beta 2^{-/-}$  sont dénuées de l'unité  $\beta 2$  du récepteur nicotinique. Donc les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  ne sont pas fonctionnels.

Sur les figures 37 et 38 nous avons une récapitulation des effets observés chez les souris sauvages et le KO  $\beta 2^{-/-}$ .



**Figure 37 :** Histogramme récapitulatif montrant les effets de la nicotine et des extraits de tabac et de fumée sur le firing rate des cellules dopaminergiques de l'ATV chez la souris sauvage et  $\beta 2$  KO.

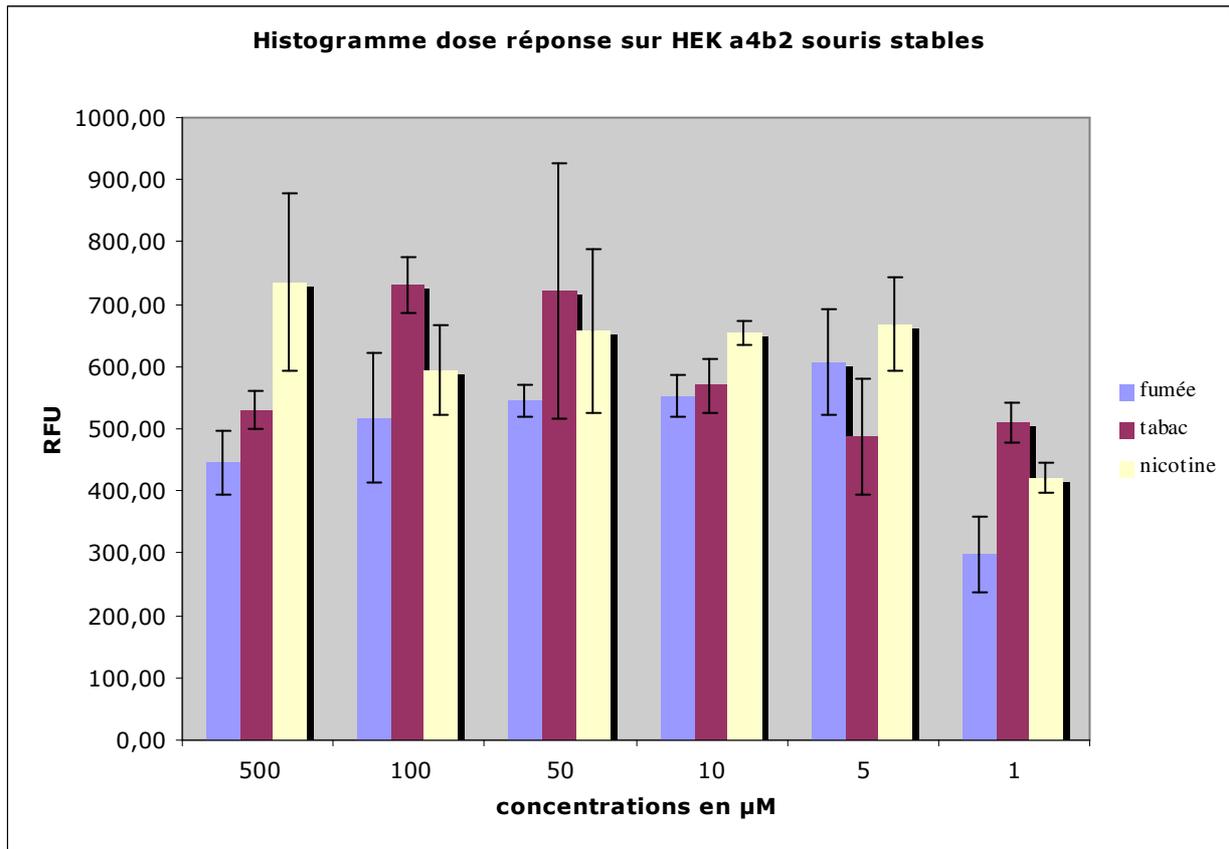


**Figure 38 :** Histogramme récapitulatif montrant les effets de la nicotine et des extraits de tabac et de fumée sur la variation en bursts des cellules dopaminergiques de l'ATV chez la souris sauvage et  $\beta 2$  KO.

Chez les souris sauvages, l'extrait de fumée provoque une augmentation du firing rate avec une modification en amplitude plus importante que celle provoquée par les extraits de tabac et la nicotine, elles aussi statistiquement significatives ( $p < 0,05$  et  $< 0,005$  respectivement). Ces effets ne sont pas obtenus chez les souris  $\beta 2^{-/-}$ . Sachant que l'unité  $\beta 2$  est un des constituants du récepteur  $\alpha 4\beta 2$  et est donc indispensable à son bon fonctionnement. Le fait que les réponses obtenues chez les souris sauvages ne soient pas observées chez les souris  $\beta 2$ KO, nous pousse à penser que les effets des extraits de tabac et de fumée sont dus principalement à la nicotine présente dans ces extraits.

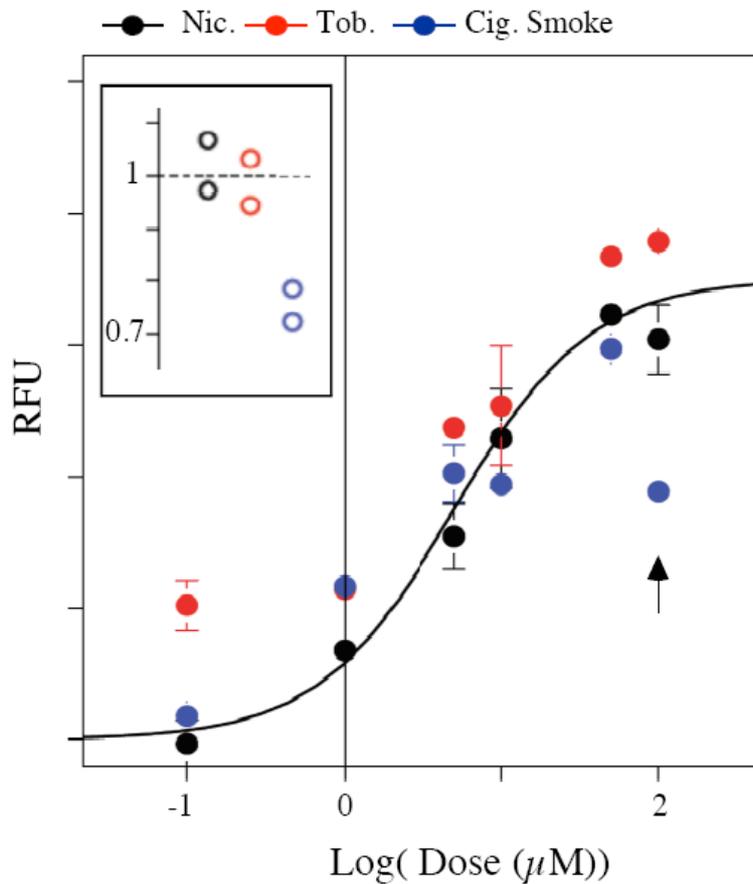
Pour les bursts, la nicotine et les extraits de fumée ont des effets activateurs statistiquement significatifs alors que l'extrait de tabac n'a aucun effet chez les souris WT. Chez les souris  $\beta 2^{-/-}$ , aucune substance n'a d'effet sur les bursts.

### 13-Résultats des expériences de binding



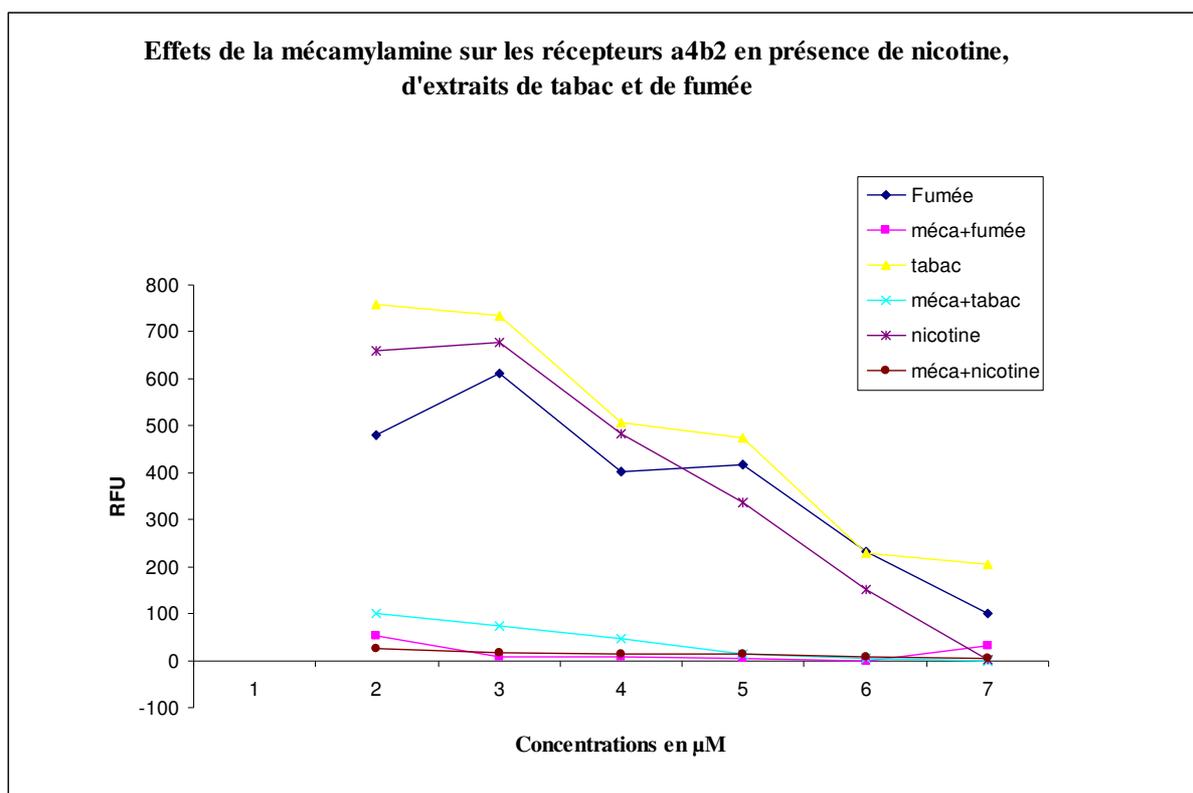
**Figure 39 :** Histogramme montrant les effets de la nicotine, des extraits de tabac et de la fumée sur les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$ , transfectés sur les cellules HEK 293, exprimés en unité de fluorescence à différentes concentrations.

Nous pouvons voir sur ce graphique que le tabac induit une réponse plus intense que celle de la nicotine et de l'extrait de fumée à trois concentrations différentes, à 100μM, à 50μM et à 1μM. Mais à ce stade de la manipulation, nous ne pouvons en tirer aucune conclusion, car rien ne nous semble pouvoir indiquer qu'elles puissent être dose dépendantes.



**Figure 40 :** Courbe dose réponse montrant les effets des extraits de tabac, de fumée et de la nicotine sur les canaux ioniques couplés aux récepteurs nicotiniques  $\alpha 4\beta 2$  exprimés sur les cellules HEK293 (doses : 0.1, 1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ).

Sur cette figure nous observons une réponse dose dépendante que nous n'avons pas obtenue in vivo, les courbes de réponses des extraits de tabac et de fumée sont semblables à celle de la nicotine. Même si l'extrait de tabac induit une réponse plus forte à faible dose (0.1 $\mu\text{M}$ ) et qu'il y a une chute de la réponse de la fumée pour la plus grande concentration (100 $\mu\text{M}$ ), nous ne pouvons en tirer aucune conclusion à ce stade des expérimentations.



concentrations $\mu\text{M}$	Fumée	méca+fumée	tabac	méca+tabac	nicotine	méca+nicotine	
2	100	480,78	51,89	757	101,55	659,75	25,85
3	50	612,22	9,11	733,6	73,5	678,6	16,55
4	10	402,06	7,11	507,1	46,05	482,6	12,5
5	5	416	5,61	474,15	13,2	337,8	14,6
6	1	232,22	-0,22	228,45	5,45	152,3	8,3
7	0,1	100,33	32,33	203,9	-1,5	1,3	3,95

**Figure 41 :** Comparaison de l'intensité de la fluorescence sous l'effet de la nicotine et des extraits de tabac et de fumée à différentes concentrations.

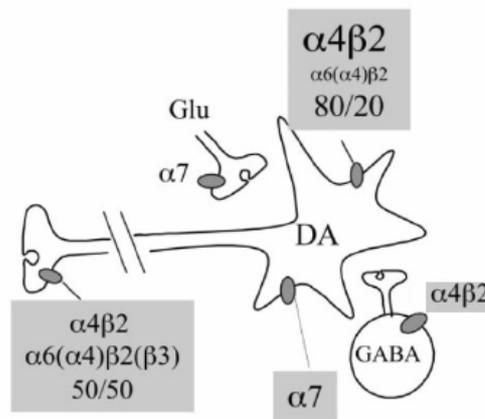
Les effets activateurs de la nicotine, de l'extrait de tabac et de l'extrait de fumée diminuent sensiblement en présence de la mécamylamine. Ceci signifie à priori que l'action des extraits de tabac et de fumée passe principalement par les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$ , et donc vraisemblablement que c'est la nicotine présente dans ces deux substances qui est responsable de leurs effets observés sur l'activité des cellules dopaminergiques de l'ATV. Mais il est aussi possible que d'autres substances (autres que la nicotine) ayant une affinité pour les récepteurs nicotiniques soient en partie responsables des effets observés.

## IV-Discussion

### 14-La réponse dopaminergique à la nicotine : connaissances actuelles.

Nous nous sommes intéressés tout au long de ce travail au rôle des récepteurs nicotiques dans la réponse des neurones dopaminergiques à la nicotine, aux extraits de tabac et de la fumée et à certains alcaloïdes purifiés présents dans ces derniers. Nous rappelons que dans l'état des connaissances actuelles, la nicotine agit spécifiquement via les nAChRs.

L'augmentation de l'activité cellulaire des neurones dopaminergiques au niveau de l'ATV consécutive à une injection aiguë de la nicotine traduit une action directe de la nicotine sur ces cellules. Nous savons actuellement que la nicotine agit sur les nAChRs présents dans l'ATV à trois niveaux.



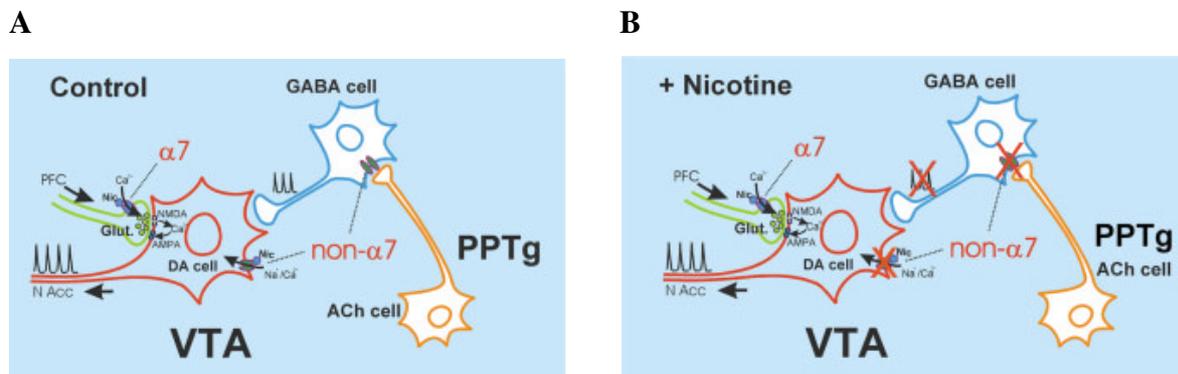
**Figure 1** : Distribution des sites d'action de la nicotine au sein du système de la récompense (Extrait Champtiaux et al, 2003)

- 1- **Une action somatique directe sur les neurones dopaminergiques** via les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  présents à leur surface. Les nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  ont la plus grande affinité pour la nicotine (Flores et al, 1992 Picciotto et al, 1995). La nicotine peut également agir par le biais des récepteurs  $\alpha 6\beta 2$  (Mameli-Engvall et al, 2006 ; Maskos et al, 2005 ; Champtiaux et al, 2003). L'activation de ces récepteurs provoque une augmentation de la fréquence des décharges cellulaires et des bouffées sur les cellules dopaminergiques (Mameli- Engvall et al, 2006, Nomikos et al, 2000, Schilstrom et al, 2003).
- 2- **Une action somatique sur les inter-neurones GABAergiques** via les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  présents à leur surface (Klink et al, 2001). Ainsi la nicotine module l'activité de ces inter-neurones. Notons que ces inter-neurones exercent leur action en permanence sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, étant eux même sous l'action de l'acétylcholine endogène. Dans les études de Mansvelder et al (2002) réalisées *in vitro*, l'application de la nicotine sur les neurones GABAergiques conduit à une augmentation de leur fréquence de décharge, ceci provoque une augmentation transitoire de leur effet inhibiteur sur les neurones dopaminergiques de l'ATV. Comme tous les récepteurs non  $\alpha 7$ , ces nAChRs se désensibilisent rapidement, ainsi cette augmentation d'activité disparaît et l'effet inhibiteur des inter-neurones GABAergiques sur les cellules dopaminergiques de l'ATV diminue. Cet effet inhibiteur n'est pas observé *in vivo*. La nicotine a plutôt pour effet l'augmentation du firing rate des neurones dopaminergiques. L'augmentation de l'effet inhibiteur des inter-neurones GABAergiques sous l'effet de la nicotine pourrait ainsi venir contrebalancer l'effet activateur de cette dernière qui pourrait être simultanément et direct

sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, ce qui expliquerait le paradoxe de l'effet GABAergique.

- 3- **Une action pré-synaptique sur les terminaisons glutamatergiques** et ce via les homo-pentamères  $\alpha 7$ . Schilstrom avait stipulé dans ses travaux publiés en 2003 que les nAChRs à  $\alpha 7$  sont responsables de la réponse en bouffées des neurones dopaminergiques. Les nAChRs à  $\alpha 7$  sont impliqués dans la réponse en bouffées mais ils ne sont probablement pas les seuls. En effet les travaux de Mameli et al (2006), ont montré que les souris  $\alpha 7^{-/-}$ , dépourvues de la sous-unité  $\alpha 7$  ont 50% des neurones dopaminergiques qui réagissent en bouffées comparé à ce qui est observée chez des souris sauvages. Cette réponse, quand elle est présente, dure aussi longtemps que chez les témoins sauvages.

Les afférences glutamatergiques jouent un rôle clé dans la régulation du firing rate des neurones dopaminergiques de l'ATV. L'activation de ces afférences ou l'application sur les cellules de l'ATV d'agonistes des récepteurs au glutamate induisent une augmentation du firing rate et des bursts in vivo (Grace and Bunney, 1984 ; Johnson et al, 1992, Chergui et al, 1993 ; Murase et al, 1993).



**Figure 2 :** Représentation schématique des afférences contrôlant le système dopaminergique mésolimbique (D'après Mansvelder et al, 2002). ( PPTg : Noyau Tegmental pédonculontin ; VTA : Aire Tegmentale Ventrale ; ACH Cell : cellules libérant l'Acétylcholine ; DA Cell, cellule dopaminergique, Glut : Afférence glutamatergique ; PFC ; Cortex Préfrontal ; N Acc : Noyau Accumbens)

Nous pouvons voir sur cette figure construite à partir de travaux réalisés *in vitro* qu'en absence de la nicotine (Fig. 2A) les neurones dopaminergiques de l'ATV subissent l'effet inhibiteur spontané et continu des inter-neurones GABAergiques qui sont eux sous l'effet de l'acétylcholine endogène ainsi que l'effet direct de celle-ci via les nAChRs non  $\alpha 7$ . En même temps, l'action des  $\alpha 7$  provoque une augmentation de la fréquence des cellules glutamatergiques.

En présence de la nicotine (Fig. 2B), les nAChRs non  $\alpha 7$  se désensibilisent rapidement diminuant ainsi et de manière efficace l'effet inhibiteur des neurones GABAergiques. Les nAChRs à  $\alpha 7$ , quant à eux, ne se désensibilisent pas autant, cela signifie que les afférences glutamatergiques vont continuer à activer les cellules dopaminergiques alors que l'effet inhibiteur du GABA baisse. Ceci conduirait à l'augmentation de la fréquence des neurones dopaminergiques aussi bien en firing qu'en bursts.

A côté de tout ceci, le glutamate agit également par ses mécanismes classiques AMPA et NMDA (Mansvelder et al, 2002)

## **Nos travaux :**

Les résultats de nos expériences montrent que la nicotine, ainsi que les extraits de tabac et de fumée, activent les cellules dopaminergiques de l'ATV chez le rat et la souris sauvage. Cependant ni la nicotine, ni les extraits de tabac et de fumée n'ont montré d'effets chez la souris  $\beta 2$  KO.

L'harmane (connue pour ses effets IMAO-A), présente principalement dans la fumée du tabac, ainsi que la norharmane (IMAO-B, présente dans la fumée) et la sélégiline (IMAO-B non présent dans le tabac ni la fumée), ont également des effets activateurs significatifs sur les neurones dopaminergiques de l'ATV chez le rat, aussi bien sur le firing que sur la fréquence en bursts. La cotinine provoque une petite activation statistiquement significative des bursts sur les neurones qui répondent en s'activant, et est sans effet sur le firing. La béfloxatone (IMAO-A non présent dans le tabac ni dans la fumée) n'a aucun effet sur les cellules dopaminergiques de l'ATV chez le rat.

La nicotine a un effet instantané sur les neurones dopaminergiques de l'ATV chez le rat et la souris sauvage.

### **15- Effet de la nicotine.**

#### **15-1-Effets sur le firing**

**Chez le rat**, cet effet est d'abord fort et court, et l'on observe, juste après l'injection de nicotine, une forte augmentation du firing qui peut atteindre près de 180% de la fréquence de base, et qui dure de 100 à 200 secondes. Cette forte augmentation s'estompe par la suite, mais il faut plus de 300 secondes à la cellule pour qu'elle puisse retrouver son rythme de base. En revanche, nous n'avons pas observé de phénomène de désensibilisation suite à des injections multiples de nicotine, et cela pour aucune des différentes doses testées. De même, des travaux ont montré qu'un traitement chronique à base de nicotine à 1mg/kg et par jour durant 10 jours n'a induit aucune modification significative sur l'activité basale des cellules dopaminergiques ni dans la substance noire pars compacta ni dans l'ATV (Pierucci et al, 2004).

Cette absence de désensibilisation tranche avec ce qui a été observé sur les neurones sérotoninergiques du noyau raphé dorsal (Touiki et al, 2005), sachant que la nicotine a un effet inhibiteur sur ces derniers, l'intensité de ses effets diminue avec la répétition des injections.

**Chez la souris sauvage**, l'augmentation du firing avoisine les 70 %, elle est intense durant à peu près 300 secondes, puis baisse graduellement. Il faut à peu près entre 800 et 1000 secondes pour que le neurone retrouve sa fréquence de base. Là encore, nous n'avons pas observé de phénomène de désensibilisation, lors d'injections multiples.

#### **15-2- Effets sur les bursts :**

L'augmentation de la fréquence des bursts est de faible intensité aussi bien chez le rat que chez la souris sauvage, elle n'en reste pas moins statistiquement significative chez nos deux modèles animaux.

### 15-3- Effets de différentes doses de nicotine chez le rat

Nous avons testé quatre doses de nicotine chez le rat.

#### a- Effets sur le firing.

L'intensité de la réponse à la nicotine a augmenté pour chacune des doses utilisées de 5µg/kg, 11µg/kg et 22µg/kg et de 45µg/kg, (50%, 90%, 180% et 100% par rapport à la fréquence de base respectivement). Ces résultats sont conformes à la littérature, les expériences électrophysiologiques publiées précédemment ayant montré que la nicotine augmente le firing des cellules dopaminergiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Grenhoff et al, 1986 ; Pidoplichko et al, 1997 ; Piccioto et al, 1998).

L'intensité des réponses semble varier avec les doses, mais l'analyse n'a pas mis en évidence de réponse dose-dépendante. Les doses testées – 5µg/kg, 11µg/kg, 22µg/kg et 45µg/kg de nicotine bitartrate exprimées en nicotine base – provoquent chacune des activations statistiquement significatives. On rappelle aussi que les études *in vivo et in vitro* montrent la complexité des mécanismes des réponses à la nicotine. Le principal effet de la nicotine passe par l'activation post-synaptique des nAChRs présents sur le soma des neurones dopaminergiques (Calabresi et al, 1989 ; Pidoplichko et al, 1997 ; Piccioto et al, 1998). Toutefois, l'ATV reçoit des projections activatrices d'acides aminés activateurs provenant du cortex préfrontal (Christie, 1985), du noyau subthalamique (Phillipson, 1979), et du noyau mésopontin (Clement et al, 1990). Les afférences GABAergiques sont intrinsèques à l'ATV. (Di Chiara, 1979 ; Stanford et Lacey, 1996 ; Steffensen et al, 1998 ; Carr et Sesack 2000). D'autres afférences sont des boucles régulatrices provenant des régions du cerveau antérieur, comme le noyau accumbens, le striatum, le globus pallidus et le pallidum ventral. (Fonnum et al, 1978 ; Ribak et al, 1980 ; Wallas et Fonnum, 1980 ; Kalivas et al, 1993). L'administration systémique de la nicotine produit simultanément plusieurs effets antagonistes, d'un côté elle augmente la libération du glutamate et d'aspartate qui ont des effets activateurs sur les neurones dopaminergiques, et de l'autre elle active les neurones GABAergiques (Toth et al, 1992 ; Shilstrom et al, 2000 ; Alkondon et al, 1992 ; Frazier et al, 1998 ; Jones et Yakel, 1997) qui eux inhibent les cellules dopaminergiques. Cela dit, l'effet activateur de la nicotine sur les cellules GABAergiques peut être qualifié de passager car, les nAChRs à  $\alpha 4\beta 2$  présents sur leur soma se désensibilisent assez rapidement, baissant ainsi l'activation nicotinique des inter-neurones GABAergiques et levant, par la même occasion, l'inhibition qu'ils exercent sur les neurones dopaminergiques de l'ATV. (Mansvelder et al, 2002)

S'ajoute à ceci, l'effet de l'aspartate mis en évidence par Shilstrom et al (2000) dont le blocage des récepteurs au niveau de l'ATV diminue la libération de la dopamine induite par la nicotine dans le noyau accumbens *in vivo*.

Donc nous pouvons penser que l'intensité de l'activation d'un neurone dopaminergique dans l'ATV peut être la résultante des effets combinés de mécanismes très complexes comprenant les effets inhibiteurs du GABA suivis de la levée de leur inhibition sur la libération de dopamine et les effets activateurs de cette libération dus à l'aspartate et/ou au glutamate. À ces difficultés s'ajoute celle des propriétés individuelles de chaque neurone dopaminergique, qui pourrait être programmé pour répondre différemment aux stimulations. En effet les travaux de Mameli et al (2006) ont montré que les cellules dopaminergiques se subdivisaient en quatre grandes catégories présentant des décharges toniques et des bouffées spontanées avec des rythmes variés ; ces rythmes sont caractérisés par la fréquence de décharge moyenne et le pourcentage des potentiels d'action en bouffées. Les auteurs ont ainsi décrit des LFLB (basse fréquence, peu de bouffées), des HFLB (haute fréquence, peu de bouffées), des LFHB (basse fréquence, bouffées importantes) et des HFHB (haute fréquence, bouffées importantes), ces différentes catégories répondent différemment à la nicotine. Il est possible que nous ayons recruté des neurones appartenant à des populations différentes à chaque fois.

Sur les cellules HEK 293, nous avons observé un effet de réponse dose-dépendant que nous n'avons pas constaté *in vivo*, ceci témoigne aussi, de la complexité des mécanismes de réponses basés sur les nAChRs.

### **b-Effets sur les bursts**

Nous ne pouvons pas parler d'un phénomène de réponse dose-dépendante. Seules les doses de 11µg/kg et de 45µg/kg induisent des augmentations en bursts statistiquement significatives. Il est connu que la nicotine augmente la fréquence des bursts des cellules dopaminergiques chez le rat (Grenhoff et al, 1986). Il a été proposé que les bursts résultent de l'activation des récepteurs nAChRs de type  $\alpha 7$ , localisés au niveau présynaptique au niveau des afférences glutamatergiques. Ces dernières induiraient une augmentation de la libération du glutamate au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques agissant sur les récepteurs à l'aspartate qui activent les neurones dopaminergiques, conduisant à une libération de la dopamine dans les structures cibles (Schilström et al, 1998 ; 2000 et 2003). Il a été également avancé que la pulsation en bursts donne lieu à une accumulation plus importante de dopamine dans l'espace inter-synaptique (Gonon, 1988 ; Bean et al, 1991 ; Nissbrandt et al, 1994 ; Floresco et al, 2003 ; Venton et al, 2003), alors que l'accumulation de dopamine après le seul firing pourrait être inexistante (Schilström et al, 2003). Seulement des travaux réalisés sur des souris  $\alpha 7$ -/- KO, ont montré qu'elles avaient des neurones dopaminergiques qui répondaient en bouffées, ils sont 50% moins nombreux que chez la souris sauvage mais leur réponse existe et elle dure aussi longtemps que chez les souris WT, de plus, ces souris  $\alpha 7$ -/- sont capables de développer des comportements d'auto-administration et il n'est pas toujours vérifié que la quantité de dopamine libérée par les bursts soit plus importante que celle libérée par le firing rate. (Mameli-Engvall et al. 2006)

L'activité en bursts dépend étroitement des afférences des neurones dopaminergiques. La réponse en bursts disparaît sur les enregistrements réalisés sur des coupes privées de toute afférence (Grace et Onn, 1989 ; Seutin et al, 1990 ; Johnson et al, 1992). L'utilisation du DH $\beta$ E, antagoniste des récepteurs nicotiques dépourvus de sous unité  $\alpha 7$  (donc antagoniste essentiellement des récepteurs  $\alpha 4\beta 2$ ), en présence de la nicotine, produit une augmentation de la fréquence des bursts mais pas du firing. Cela signifierait que les sous-unités  $\alpha 7$  sont bien impliquées dans l'augmentation de la fréquence des bursts (Schilström et al, 2003) mais pas forcément nécessaires.

Le fait que deux doses seulement, parmi les quatre doses de nicotine que nous avons utilisées, aient provoqué des augmentations de bursts alors que toutes ont induit une augmentation de firing confirme encore une fois que les mécanismes qui sous-tendent la réponse en firing sont indépendants de ceux qui sous-tendent les bursts. Des travaux ont d'ailleurs démontré qu'*in vivo* la nicotine peut activer, et de manière sélective, la fréquence en bursts, sans aucun effet significatif sur le firing (Grenhoff et al, 1986 ; Mereu et al, 1987). Sachant qu'en testant différentes doses sur des lots cellulaires différents, nous avons vraisemblablement recruté des populations cellulaires hétérogènes, qui réagissent potentiellement différemment à la stimulation nicotinique comme il a été cité précédemment.

## 16- Effets de la nicotine chez les souris (WT et $\beta 2$ KO)

Nous n'avons testé qu'une seule dose de nicotine chez les WT (nicotine seule et équivalent en nicotine dans le tabac et la fumée) et les  $\beta 2$  KO (chez lesquels la nicotine seule n'a pas été testée au cours de ce travail, parce qu'elle l'a déjà été précédemment dans le même laboratoire [Mameli-Engvall et al, 2006], donc seuls ont été testés les effets du tabac et de la fumée, voir plus loin). La dose de  $30\mu\text{g}/\text{kg}$  que nous avons injectée a provoqué une augmentation de firing de plus 70% et de plus de 20% en bursts chez la souris WT. L'augmentation du firing est attribuée là aussi aux récepteurs nicotiques à  $\beta 2$ , ceci est étayé par le fait que la nicotine ne provoque aucun effet chez la souris  $\beta 2$  KO, comme cela a été montré dans la littérature (Piccioto et al, 1998 ; Mameli-Engvall et al, 2006). Toutefois, dans certains cas les courants ioniques dus à la nicotine peuvent être détectés chez des souris  $\beta 2$  KO, mais ils restent bien plus faibles que ceux observés chez la souris sauvage (Matsubayashi et al, 2003).

## 17- Effets de la cotinine (chez le rat seulement)

La cotinine, métabolite principal de la nicotine, n'a été testée que chez le rat. Elle est surtout connue pour sa faible affinité pour les récepteurs nicotiques. Dans le présent travail, elle a un effet activateur statistiquement significatif sur les cellules qui répondent en s'activant, uniquement sur les bursts et pas sur le firing, ce qui fait penser qu'elle peut activer les mécanismes impliqués dans les réponses en bursts et sans avoir d'effet sur ceux impliqués dans les réponses en firing.

La cotinine, avec une demi-vie de 15-19h, a soulevé de nombreuses interrogations concernant son implication éventuelle dans les phénomènes de dépendance à la nicotine. Plusieurs études ont montré que la cotinine a une activité pharmacologique *in vivo*, elle influence des fonctions automatiques comme la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la respiration et la régulation hormonale (Borzelleca et al, 1962 ; Dominiak et al, 1985 ; Andersson et al, 1993 ; Buccafusco et al, 2007). Elle affecte également le comportement et les performances cognitives (Risner et al, 1985 ; Boccafusco et Terry, 2003). Bien que les effets de la cotinine semblent être indépendants de ceux de la nicotine, ils semblent néanmoins être dus à l'activation des récepteurs nAChRs. D'une façon générale, il est reconnu que la cotinine n'a qu'une faible affinité pour les récepteurs nicotiques (Abood et al, 1985), en effet des travaux ont démontré que la cotinine déplaçait différents ligands radioactifs de nAChRs au niveau de cerveau de rat avec une efficacité 100 fois inférieure à celle de la nicotine (Sloan et al, 1984; Anderson et Arneric, 1994 ; Vainio et Tuominen, 2001). Néanmoins, des travaux chez le singe au niveau du striatum ont montré que la cotinine se lie aux récepteurs  $\alpha 3/\alpha 6\beta 2$  de manière sélective dans le noyau caudé latéral et médian provoquant ainsi la libération de dopamine à ce niveau (O'Leary et al, 2008). La cotinine stimule la libération de la dopamine également par le biais des récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  au niveau du striatum notamment dans des préparations *in vitro*, ce qui laisse supposer qu'elle peut avoir des effets fonctionnels au niveau de la voie nigrostriatale (O'Leary et al, 2008).

Le fait que la cotinine provoque chez le rat une augmentation de la fréquence des bursts sur des cellules qui répondent par une activation, sans avoir d'effet sur leur firing, peut nous laisser penser qu'il puisse exister certaines populations cellulaires avec des récepteurs ayant plus d'affinité pour ce composé que la majorité des nAChRs.

## 18- Effets des $\beta$ -carbolines : harmane et norharmane

Les  $\beta$ -carbolines sont des alcaloïdes d'origine végétale, et qui ne sont pas exclusifs au tabac. La norharmane par exemple a été identifiée dans certains aliments, ainsi que chez l'animal et chez l'homme. (Adachi et al, 1991 ; Rommelspacher et al, 1991). Les  $\beta$ -carbolines ont des effets multiples et complexes, par exemple certaines  $\beta$ -carbolines provoquent une augmentation de la prise d'alcool chez le rat. (Myers et al, 1977 ; Rommelspacher et al, 1991 ; Tuomisto et al, 1982.)

### 18-1-Norharmane :

Il a été montré que la norharmane interagit avec différents types de récepteurs chez les mammifères, parmi lesquels les récepteurs aux benzodiazépines (May et al. 1994 ; Müller et al. 1981). Néanmoins, plus récemment, d'autres auteurs n'ont retrouvé aucune affinité de la norharmane pour les récepteurs des neurotransmetteurs (Glennon et al, 2000). Il a été montré indirectement que la norharmane active les neurones dopaminergiques, l'injection systémique de norharmane augmentant la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Sällström-Baum et al, 1995). Nos expériences préliminaires sur les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  exprimés sur les cellules HEK (résultats non représentés dans le chapitre Résultats), laissent aussi penser que l'effet de la norharmane ne passe pas entièrement par les nAChRs. Il se pourrait que d'autres types de récepteurs non cholinergiques soient responsables de ce type de réponses. En effet, certaines études ont montré que l'injection du flumazénil, un antagoniste du récepteur aux benzodiazépines, injecté 15 min avant la norharmane, diminue de manière significative l'augmentation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Sällström-Baum et al, 1995). D'un autre côté, d'après des études comportementales et d'autoradiographie, il est concevable que la norharmane puisse avoir une influence directe sur les neurones du noyau accumbens. Sachant que ces derniers occupent une position cruciale au sein du circuit de la récompense, cet effet de la norharmane sur le noyau accumbens pourrait constituer une « interface » entre le système de récompense et les bêta-carbolines (Swerdlow et al, 1987 ; Koob, 1992 ; Imperato et al, 1990). Ainsi, l'activation des neurones dopaminergiques mésolimbiques pourrait contribuer à l'apparition du comportement de recherche de la drogue observé chez l'animal et pourrait jouer un rôle dans le mécanisme de manque chez l'homme. (Sällström-Baum et al, 1995).

Dans nos résultats, les deux doses que nous avons testées 1mg/kg et 2mg/kg provoquaient toutes les deux des augmentations statistiquement significatives du firing, mais seule la dose de 2mg/kg induisait une augmentation significative des bursts. L'effet IMAO-B de la norharmane peut être évoqué pour expliquer nos résultats. En effet, l'injection de la sélégiline, un IMAO-B, provoque une activation statistiquement significative sur le firing ainsi que sur les bursts. Mais il faut noter que l'activation due à la sélégiline est beaucoup plus forte et plus intense que celle induite par la norharmane. Donc nous pouvons dire que l'activation due à la norharmane est partiellement due à son effet IMAO-B mais d'autres mécanismes doivent aussi intervenir. Leur identification nécessiterait la réalisation d'autres expériences.

### 18-2-Harmane :

L'harmane (ou 1-méthyle- $\beta$ -carboline) est une  $\beta$ -carboline naturelle, d'origine végétale, isolée pour la première fois à partir de *Peganum harmala* (El Bahri, 1991 ; Holmstedt et al, 1982). Il a été rapporté que l'ingestion d'harmane et d'autres  $\beta$ -carbolines isolées à partir de cette plante peut provoquer des troubles de comportement chez l'homme, avec des hallucinations, une excitation, ou une euphorie (Burger, 1970 ; Naranjo et al, 1979). L'absorption d'une grande quantité de  $\beta$ -carbolines peut causer un état d'intoxication caractérisé par des tremblements et des convulsions (Naranjo et al, 1979). Chez l'animal, des travaux ont montré

que l'harmane peut induire une baisse de la locomotion, une hypothermie ainsi que des tremblements et des convulsions (Airaksinen et al, 1987 ; El Bahri 1991 ; Fuentes et al, 1992 ; Pranzatelli et al, 1987 ; Rommelspacher et al, 1981 ; Sigg et al, 1964) et même une hypotension chez le rat attribuée à sa fixation sur les récepteurs à l'imidazole de type I<sub>1</sub> (Musgrave et Badoer, 2000). Il a également été démontré qu'elle interagit dans le cerveau des mammifères avec différents types de récepteurs comprenant ceux de la sérotonine, de la dopamine et des benzodiazépines (Muller et al, 1981), mais ces effets n'ont pas été retrouvés par Glennon et al (2000). L'harmane renforce aussi la consommation d'alcool chez le rat (Myers et Melchior, 1977 ; Rommelspacher et al, 1987). Dans nos travaux nous avons utilisé une dose de 2mg/kg, cette dose peut paraître trop importante comparée à la teneur moyenne en harmane dans la fumée d'une cigarette estimée entre 10 et 20µg/cigarette, mais cette dose est injectée en intraveineuse et nous avons estimé que, arrivée au cerveau après une dilution dans le volume sanguin, elle serait juste assez importante pour « faire ressortir » et permettre d'observer clairement les effets physiologiques de l'harmane.

L'harmane induit une augmentation intense du firing moyen alors qu'elle n'a pas d'effet moyen significatif sur les bursts ( $p=0.052$ ). L'augmentation moyenne en firing est égale à presque 7 fois celle de base et est de 10% par rapport à celle de base pour les bursts.

D'un autre côté, quand on répartit des cellules en deux groupes : celles qui répondent par une activation et celle qui répondent par une inhibition, que ce soit pour le firing ou pour les bursts, la réponse après l'injection de l'harmane est toujours statistiquement très significative, qu'elle soit positive ou négative. Néanmoins, les activations qu'elles soient en firing ou en bursts sont statistiquement plus significatives que les inhibitions (firing activation  $p = 0.0003$ , inhibition  $p = 0.009$ / bursts activation  $p= 7.00.10^{-6}$ , inhibition  $p=0.02$ ).

Il nous semble peu vraisemblable que cette action soit due à l'effet IMAO-A de l'harmane (Rommelspacher et al, 1994). En effet nous avons testé la béfloxatone, un IMAO-A, nos résultats concluent qu'elle n'a aucun effet significatif sur l'activité des cellules dopaminergiques de l'ATV.

Nous avons pensé que cet effet activateur pourrait être dû à l'activation des nAChRs par l'harmane. Nous avons donc utilisé la mécamylamine, un antagoniste des nAChRs. La mécamylamine à 4mg/kg était injectée 30min avant le début de l'enregistrement, l'harmane est injectée de manière aiguë après 6 à 7 min d'enregistrement d'une ligne de base stable. Nous avons observé une baisse de près de 80% de l'intensité d'activation des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Néanmoins, l'activation résiduelle moyenne est statistiquement significative ( $p = 0.035$ ) pour le firing. De même pour les sous-groupes cellulaires, les effets activateurs et inhibiteurs de l'harmane sur le firing restent statistiquement significatifs même en présence de la mécamylamine, en revanche sur les bursts, l'effet activateur reste significatif tandis que l'effet inhibiteur ne l'est pas.

La baisse de l'intensité de l'effet de l'harmane en présence de la mécamylamine fait penser que l'action de ce composé passe par les nAChRs. L'harmane inhibe les cellules sérotoninergiques du noyau raphé dorsal (Touiki et al, 2005), tout comme la nicotine, mais le mécanisme de ces différentes actions reste inconnu. Dans les expériences de Touiki et al, l'inhibition due à la nicotine est forte, de courte durée et réversible, alors que l'inhibition due à l'harmane est également forte, mais dure plusieurs minutes et est non réversible. On sait que le système sérotoninergique module la libération de la dopamine dans le système nerveux central (Pierucci et al, 2004), et des études utilisant des agonistes et des antagonistes des récepteurs 5-HT ont montré que le RO 60-0175 ((S)-2-(Chloro-5-fluoro-indol-1-yl)-1-méthylamine), un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>2C</sub>, réduit le firing basal des neurones dopaminergiques de l'ATV (Di Matteo et al. 1999 ; Di Matteo et al. 2000 ; Gobert et al. 2000), alors que le SB- 242084 [(6-chloro-5-méthyl-1-[2-(2-méthylpyridiyl-3-oxy)-pyrid-5-yl carbomoyl] indoline), un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>2C</sub>, (Kennet et al, 1997) provoque une augmentation du firing de base des neurones dopaminergiques de l'ATV (Di Matteo et al, 1999 ; Millamn et al, 1998 ; Di Giovanni et al, 1999 ; Gobert et al, 2000). Ces

éléments peuvent conduire à proposer que l'effet activateur de l'harmane sur le firing des neurones dopaminergiques de l'ATV, serait dû à une levée d'inhibition du système sérotoninergique. D'un autre côté, l'effet de l'harmane sur les neurones dopaminergiques est immédiat, ce qui serait plus compatible avec un effet direct sur les neurones dopaminergiques qu'à un effet indirect par l'intermédiaire des systèmes 5-HT.

## **19- Effets des extraits de tabac et de fumée**

Dans nos extraits, nous ne connaissons que la concentration de la nicotine, elle est de 0.96g/l dans l'extrait de tabac et de 1.08g/l dans l'extrait de fumée. Mais nous savons par les données de littérature qu'il existe plus de 4000 composés dans le tabac et sa fumée, et par conséquent, nos extraits doivent en contenir une bonne fraction.

### **19-1- Extraits de tabac :**

Comme pour l'EF, nous avons testé l'extrait de tabac (ET) à différentes doses chez le rat et à une seule dose chez la souris sauvage et  $\beta 2^{-/-}$ . Les doses sont toujours exprimées en équivalent nicotine base.

#### **Chez le rat.**

**Firing.** Parmi les quatre doses d'ET testées, une seule dose, à savoir la dose de 36 $\mu$ g/kg exprimée en équivalent nicotine, a eu des effets moyens activateurs statistiquement significatifs sur le firing des cellules dopaminergiques de l'ATV ( $p < 0.01$ ), alors que les doses de 16, 64 et 94 $\mu$ g/kg n'ont pas eu d'effets. Ceci tranche avec nos résultats avec l'EF qui, lui, n'a pas eu d'effets moyens significatifs. Nous pouvons attribuer cette réponse à la nicotine. Nous pouvons remarquer aussi que, bien qu'ils soient plus faibles que ceux de la nicotine, les effets activateurs enregistrés après les injections d'ET sont de plus grande amplitude que ceux obtenus après les injections d'EF chez le rat. Nous pourrions supposer la présence, dans l'ET d'un composé ayant un effet activateur, bien que faible, sur les neurones dopaminergiques, et qui serait dégradé par pyrolyse.

**Bursts.** Aucune des quatre doses étudiées n'a eu d'effet sur les variations en bursts de l'activité cellulaire dans l'ATV, comme pour l'EF, donc nous pourrions en déduire que des composés présents dans l'ET auraient des effets inhibiteurs de ceux de la nicotine, soit se fixant sur les nAChRs avec plus d'affinité que la nicotine, soit désensibilisant moins les nAChRs, maintenant ainsi l'effet inhibiteur de certains systèmes comme le système GABAergique par exemple.

#### **Chez la souris sauvage.**

L'ET augmente le firing de manière statistiquement significative, alors qu'il n'induit aucun changement pour les bursts. Nous pourrions donc penser que ce que nous avons avancé pour les rats est valable également chez la souris.

#### **Chez la souris $\beta 2$ KO**

Nous n'avons observé aucun changement notable au niveau du firing. Néanmoins quand on regarde de plus près au niveau des groupes cellulaires, nous remarquons que, sur les cellules qui ont répondu en s'inhibant à l'injection de l'ET, cet effet inhibiteur était statistiquement significatif, bien que l'effet moyen ait été nul. Mais cette observations reste anecdotique et ne nous permet pas vraiment de tirer de conclusion. Tout ce que nous pourrions dire c'est que la

sous-unité  $\beta 2$  nécessaire pour un fonctionnement normal des nAChRs, est nécessaire pour avoir des réponses aux extraits de tabac et de fumée.

En **résumé** de cette partie, nous avons observé aussi bien chez le rat que chez la souris que l'action de la nicotine est moins forte après injection de l'ET qu'après une injection de nicotine bitartrate. Nous pouvons avancer plusieurs hypothèses pour expliquer cela :

**Première hypothèse** : il se peut que la nicotine présente dans l'ET soit associée à un autre composé, comme une protéine, ou tout autre, ce qui limiterait sa biodisponibilité. Et par conséquent, il n'y aurait qu'une fraction de la nicotine contenue dans les volumes injectés qui pourrait se lier aux nAChRs et les activer.

**Deuxième hypothèse** : il est probable que parmi tous les composés présents dans l'ET, certains ont un effet inhibiteur des nAChRs, par action directe sur les récepteurs et ayant une affinité comparable à celle de la nicotine, et dans ce cas la réponse provoquée par la nicotine serait la résultante d'un rapport d'équilibre d'affinité entre la nicotine et d'autres composés.

**Troisième hypothèse** : il peut y avoir des composés dans l'ET qui pourraient se lier à d'autres sites dans le cerveau, et induire la libération de neurotransmetteurs régulateurs de la libération de dopamine dans les régions du mésencéphale. Comme des zones de projections GABAergiques ou sérotoninergiques, inhibant la libération de dopamine dans l'ATV. C'est l'hypothèse qui nous semble être la plus plausible.

**Quatrième hypothèse**, très plausible également, c'est qu'il est possible que certaines molécules contenues dans l'ET puissent avoir une affinité pour les récepteurs dopaminergiques  $D_2$  et par conséquent enclenchent un mécanisme de recapture de la dopamine inhibant ainsi les neurones dopaminergiques au niveau de l'ATV. En effet, des travaux ont montré que l'autorécepteur  $D_2$  est au cœur d'une puissante boucle de feedback négatif régulant la libération de dopamine (DA). Il est également la cible principale de la plupart des antipsychotiques. Au début de nos travaux, nous injectons de la quinpirole, un agoniste des récepteurs  $D_2$ , à la fin de chaque manipulation, pour s'assurer que la cellule qui a été enregistrée, était bien un neurone dopaminergique. La quinpirole a un effet inhibiteur de la libération de dopamine. Ceci rejoint d'autres travaux réalisés par des équipes canadiennes qui ont trouvé que la quinpirole induisait une diminution de la teneur extracellulaire en DA de l'ordre de 50% (Fortin et al, Source Internet).

Donc, il est possible qu'il existe dans l'ET une ou plusieurs substances ayant une structure moléculaire comparable à celle de la quinpirole, de l'apomorphine ou d'un autre antipsychotique, et qui par conséquent, pourrait se fixer aux récepteurs  $D_2$ , activer les canaux calciques et modifier le fonctionnement de la protéine G qui leur est associée.

## 19-2- Extraits de fumée

L'extrait de fumée (EF) a été testé à plusieurs doses chez le rat et à une seule dose chez la souris sauvage et la souris  $\beta 2$  KO. Toutes les doses utilisées sont exprimées en équivalent nicotine base.

**Chez le rat.** Plusieurs doses d'EF plus importantes que celles de nicotine ont été utilisées mais leurs effets sont globalement un peu plus faibles en intensité que ceux de la nicotine.

Pour le **firing**, toutes les doses d'EF ont provoqué une augmentation du firing mais seule la dose la plus forte (94 $\mu$ g/kg) a eu un effet activateur statistiquement significatif alors que l'effet moyen est nul. Notons que nous avons perdu tous nos neurones durant les enregistrements, après injection de la même dose en nicotine bitartrate exprimée en nicotine

base. De plus, l'intensité des augmentations provoquées par l'EF est plus faible que celle due à la nicotine seule pour des doses plus fortes. Pour les **bursts** Aucune des doses d'EF injectées n'ont eu d'effet significatif, alors que deux des doses de nicotine ont eu des effets activateurs statistiquement significatifs.

**En conclusion** : nous pourrions attribuer l'effet de l'extrait de fumée chez le rat à celui de la nicotine qu'il contient. Cela dit, il nous a fallu utiliser des doses d'EF trois fois plus importantes que celles utilisées pour la nicotine seule pour pouvoir obtenir des amplitudes de réponses comparables en firing rate. Cela pourrait signifier qu'il puisse exister dans l'EF des composés ayant un effet inhibiteur direct sur les nAChRs, ou activateur de systèmes modulant la réponse dopaminergique par un mécanisme d'inhibition notamment sur les bursts puisque deux de nos doses (16 et 36µg/kg) ont montré un effet moyen inhibiteur sur ce mode de réponse dopaminergique. Ceci reste une simple supposition, étant donné que nous n'avons pas de données bibliographiques à ce sujet, nous permettant de comparer nos résultats ou d'expliquer nos observations.

**Chez la souris sauvage**, la dose d'EF injectée était de 30µg/kg, la même que celle utilisée pour la nicotine bitartrate exprimée en équivalent base. Nous avons obtenu une augmentation du firing et de la fréquence en bursts statistiquement significative et d'amplitude comparable à celle obtenue après des injections de nicotine en ce qui concerne le firing, ce qui diffère de ce que nous avons observé chez le rat. Ceci nous laisserait penser que les effets de l'EF observés ici sont d'abord dus à la nicotine présente dans l'EF. Le fait que cette augmentation n'a pas été obtenue dans des proportions comparable après injection d'ET, pourrait nous faire penser qu'il aurait pu y avoir un composé dans l'ET inhibant ou concurrençant l'effet de la nicotine et qui aurait pu être pyrolysé lors de la combustion. Mais rien n'exclut l'hypothèse que d'autres substances apparaissant sous l'effet de la chaleur, puissent venir renforcer l'effet de la nicotine, soit par une action concomitante et de même nature que celle de la nicotine, soit en désactivant des systèmes inhibiteurs de la réponse dopaminergique. Ceci est d'autant plus probable que chez le rat l'EF a eu des effets plus faibles que ceux obtenus après injection de nicotine. Ceci reste un ensemble de suppositions, car nous n'avons pas trouvé de références bibliographiques nous permettant de l'étayer.

#### **Chez la souris $\beta 2$ KO.**

Nous avons injecté l'EF à la même dose que chez la souris sauvage, à savoir 30µg/kg en équivalent nicotine, et nous n'avons pas observé d'effet ni sur le firing ni sur les bursts.

Ces résultats conduisent à penser que l'effet de l'EF observé chez le rat et la souris sauvage est vraisemblablement dû à l'activation des nAChRs sous l'effet de la nicotine présente dans l'EF, et que l'unité  $\beta 2$  est nécessaire pour obtenir une réponse, ne serait-ce que pour la déclencher.

## 20- Études sur les cellules HEK293

L'EF et l'ET provoquent un déplacement du fluorochrome à l'intérieur des cellules, et cela à toutes les doses. Nous pouvons en déduire que l'EF et l'ET activent les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$ , ce qui provoque l'ouverture des canaux et donc l'entrée du fluorochrome et cela via la nicotine qu'ils contiennent.

Nous avons pu faire une autre observation assez intéressante ; nous pouvons voir sur la figure 40 qu'à des concentrations très faibles de l'ordre de  $1\mu\text{M}$  et  $0,1\mu\text{M}$ , l'ET induit un déplacement plus important de la fluorescence, ce qui signifie qu'il active les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  et ce à des concentrations où la nicotine est peu ou pas active. Ceci nous permet de penser qu'il pourrait y avoir un ou plusieurs composés présents à de très faibles concentrations, ayant de l'affinité pour les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  et qui ne peuvent entrer en action que lorsque la nicotine est en très faible quantité dans le milieu.

Une autre hypothèse peut être envisagée, c'est que ces composés peuvent avoir une action sur d'autres types de récepteurs présents à la surface des cellules, et dont l'effet n'est visible que si les nAChRs à  $\alpha 4\beta 2$  sont silencieux. Cette théorie est d'autant plus plausible que sur la figure 41, en présence de mécamylamine, l'ET a induit un déplacement de la fluorescence à des concentrations où l'EF et la nicotine ne provoquaient plus aucune réponse.

## V-Conclusions :

Nous rappelons que jusqu'à maintenant, la nicotine est considérée comme étant la « molécule » addictogène de la cigarette et du tabac. Mais il faut signaler que certaines personnes, comme le professeur Robert Molimard, remettent en question depuis longtemps cette façon d'attribuer à la nicotine un rôle exclusif dans la dépendance au tabac. Dès 1982, Robert Molimard dénonçait ce dogme (Molimard, 1982). En 1995, il écrivait « J'ai bondi d'indignation lorsque j'ai reçu le rapport 1988 du Surgeon General: *Nicotine Addiction*. Quelqu'un a-t-il jamais vu un drogué à la nicotine? » (Molimard, 1995). En effet, les études ayant pour objectif de quantifier l'efficacité et la fiabilité des substituts nicotiques, qui ne contiennent et ne délivrent que de la nicotine seule, débouchent pratiquement toutes sur une même conclusion : efficacité ne dépassant que de très peu celle d'un placebo, avec une tendance à s'estomper à long terme.

Nous avons donc essayé tout au long de ce travail de thèse de mettre en évidence le rôle que pourraient avoir certains des autres composés présents dans le tabac ou produits par pyrolyse. Pour cela nous avons choisi un certain nombre de substances. La cotinine, le plus important métabolite de la nicotine et dont la demi-vie est nettement plus longue que celle de la nicotine. L'harmane, une  $\beta$ -carboline, synthétisée au cours de la combustion et dans l'organisme des fumeurs. La norharmane, une  $\beta$ -carboline, présente en partie dans le tabac et synthétisée dans la fumée par pyrolyse. En plus de ces substances purifiées, nous avons aussi utilisé des extraits aqueux de fumée et de tabac pour traiter un aspect plus global de ce que les fumeurs absorbent à chaque fois qu'ils fument une cigarette et ainsi se rapprocher des conditions physiologiques du fumeur. La technique d'enregistrement électrophysiologique est une technique qui s'applique très bien à l'étude *in vivo* de différents systèmes neuronaux y compris le système dopaminergique. Nous avons choisi la structure de l'aire tegmentale ventrale (ATV) comme zone d'étude pour la place qu'elle occupe au sein du circuit de la récompense.

Cette technique est très intéressante pour faire des enregistrements locaux et instantanés mais dans notre laboratoire, elle a aussi ses contraintes et ses limites techniques, parmi ceux là :

- L'animal doit être anesthésié pour pouvoir faire les enregistrements, nous n'avons pas pu envisager de faire des enregistrements sur des animaux éveillés,
- Elle est longue à mettre en place, et les séances de manipulation sont également longues,
- Nécessite beaucoup de répétitions pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

### Synthèse des résultats les plus significatifs.

- Les extraits de tabac et de fumée ont des effets différents de ceux de la nicotine sur l'activité des neurones dopaminergiques. Cela est particulièrement le cas pour les bursts, qui ne sont pas activés par les extraits de fumée et de tabac chez le rat, et qui ne sont activés que par les extraits de fumée chez la souris. Cela implique qu'il existe dans le tabac et la fumée des composés autres que la nicotine qui bloquent les effets de la nicotine sur les bursts notamment chez le rat.
- Les effets des extraits de tabac et de fumée sur le firing et les bursts ne sont plus présents chez les souris  $\beta 2$  KO, ce qui implique que l'ensemble des composés du tabac agit essentiellement sur les récepteurs nicotiques porteurs de la chaîne  $\beta 2$ , même si des hypothèses alternatives existent.
- Les effets activateurs de l'harmane sur le firing des neurones dopaminergiques sont extrêmement puissants, et ils sont bloqués à 80% par la mécamylamine, ce qui démontre qu'un des principaux composés du tabac et de la fumée autre que la nicotine est actif sur le système de récompense et agit par un mécanisme essentiellement nicotinique. Ce résultat doit être pondéré car les doses que nous

avons utilisées sont beaucoup plus importantes que celle délivrée par la fumée de cigarette.

- Les expériences de binding confirment que les effets du tabac et de la fumée impliquent les récepteurs nicotiques d'une façon majeure, mais d'une façon qui diffère légèrement de celle de la nicotine surtout *in vivo*.

L'hypothèse de départ, était que les effets du tabac et de la fumée sont différents de ceux de la nicotine, puisque nous trouvons des cas d'addiction au tabac et à la cigarette, alors qu'il n'y a pas de cas d'addiction à la nicotine seule ou très rarement. Nous supposons que les effets du tabac et de la fumée pouvaient être plus importants au niveau du système dopaminergique. Nos résultats montrent bien que les effets des extraits de tabac et de fumée sur l'activité des cellules dopaminergiques peuvent être différents de ceux de la nicotine, mais en règle générale, ils sont plus faibles, alors que les doses utilisées pour ces extraits, sont plus fortes dans certains protocoles que celle de la nicotine. Donc la question concernant le pouvoir addictif du tabac et de sa fumée reste presque entière, et d'autres travaux doivent être entrepris pour essayer de mettre à jour son fonctionnement.

### **Perspectives.**

Les résultats que nous avons obtenus peuvent constituer un point de départ pour d'autres travaux, notamment pour étudier de plus près les effets des  $\beta$ -carbolines, et plus particulièrement les effets de l'harmane à différentes doses, en aigu et en chronique, pour identifier les types de récepteurs sur lesquels elle se fixe, par exemple en utilisant des agonistes et antagonistes de récepteurs GABAergiques, glutamatergiques ou à l'imidazoline. En effet, des études ont montré que les  $\beta$ -carbolines peuvent avoir de l'affinité pour ce type de récepteurs, ces derniers étant impliqués dans plusieurs troubles psychiatriques comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la dépression et la maladie d'Huntington (Husbands et al, 2001).

Il serait aussi possible d'envisager des expériences avec les  $\beta$ -carbolines chez les souris sauvages et transgéniques  $\beta 2^{-/-}$ ,  $\alpha 4^{-/-}$ ,  $\alpha 6^{-/-}$  et  $\alpha 7^{-/-}$ , pour essayer de voir s'il y a un effet lié à la présence ou l'absence de ces différentes sous-unités. Et si elles ont un rôle dans la réponse des cellules dopaminergiques à l'harmane et à la norharmane.

Pour les extraits de tabac et de fumée ainsi que pour les  $\beta$ -carbolines, on pourrait envisager des enregistrements de l'activité des neurones dopaminergiques après des applications locales au niveau de l'ATV, en chronique et en aiguë et en auto-administration et ceci à différentes doses. Et envisager aussi leur application sur les cellules HEK293 exprimant des nAChRs. Ainsi il serait possible de voir les différentes modifications que peuvent produire les différents modes d'administration afin de mieux comprendre les mécanismes de renforcement de la consommation de tabac.

## VI-Références bibliographiques :

- Aboud LG, Grassi S, Noggle HD (1985). Comparison of the binding of optically pure (~) and (+)[<sup>3</sup>H]nicotine. *Neurochem. Res.*10: 259-267
- Adachi J, Mizoi Y, Naito T, Yamamota K, Fujiwara S (1991). Determination of beta-carbolines in foodstuffs by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*538: 331-339
- Adell A, Biggs T, Myers RD (1996). Action of harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) on the brain: body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. *Neuropharmacology*35: 1101-1107
- Adell A, Casanovas JM, Artigas F (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*36: 735-741
- Airaksinen M.M, Lecklin A, Saano V, Tuomisto L, Gynther J (1987). Tremorigenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by  $\beta$ -carbolines. *Pharmacol. Toxicol.*60: 5-8
- Alkondon M, Pereira EF, Wonnacott S, Albuquerque EX (1992). Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.*41: 802-808
- Andersson K, Jansson A, Kuylenstierna F and Eneroth P (1993). Nicotine and its major metabolite cotinine have different effects on aldosterone and prolactin serum levels in the normal male rat. *Eur. J. Pharmacol.*228: 305-493
- Anderson DJ, Arneric SP (1994). Nicotinic receptor binding of [3H] cytosine, [3H] nicotine and [3H] methylcarbamylcholine in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*253: 261-267
- Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, Gardier AM, Maldonado R, Granon S, Changeux JP, Maskos U (2008). Interplay of beta2\* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15991-15996
- Bean AJ and Roth RH (1991). Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex in vivo; effects of median forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern, and dopamine autoreceptors. *J. Neurosci.*11: 2694-8109
- Berlin I, Saïd S, Spreux-Varoquaux O, Launay JM, Olivares R, Launay JM, Puech AJ (1995). Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biol. Psychiatry*38: 756-761
- Besson M, David V, Suarez S, Cormier A, Cazala P, Changeux JP, Granon S (2006). Genetic dissociation of two behaviors associated with nicotine addiction: beta-2 containing nicotinic receptors are involved in nicotine reinforcement but not in withdrawal syndrome. *Psychopharmacology*187: 189-199
- Besson M, Suarez S, Cormier A, Changeux JP, Granon S (2008). Chronic nicotine exposure has dissociable behavioural effects on control and beta2-/- mice. *Behav. Genet.*38: 503-514

- Borzelleca JF, Browman ER, McKennis H Jr (1962). Studies on the respiratory and cardiovascular effects of(-)-cotinine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*137: 313-318
- Buccafusco JJ, Terry AV Jr (2003). The potential role of cotinine in the cognitive and neuroprotective actions of nicotine. *Life Sci.*72: 2931-2942
- Buccafusco JJ, Shuster LC, Terry AV Jr (2007). Disconnection between activation and desensitization of automatic nicotinic receptors by nicotine and cotinine. *Neurosci. Lett.* 413: 68-71
- Burger A (1970). Hallucinogenic agents. In : Burger A, ed. *Medicinal chemistry*. New York : Wiley :1519
- Calabresi P, Lacey MG, North RA (1989). Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurons in vitro studied by intracellular recording BR. *J. Pharmacol.*98: 135-140
- Carr DB, Sesack SR (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse*38:114-123
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F Moretti M, Rossi FM, Le Novere N et al (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J. Neurosci.*23: 7820–7829
- Chergui K, Charlety PJ, Akaoka H, Saunier CF, Brunet JL, Buda M, Svensson TH, Chouvet G (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.*5: 137–144
- Christie MJ, Bridge S, James LBN, Beart PM (1985). Excitotoxin lesions suggest an aspartergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain. Res.*333: 169-172
- Clement JR and Grant S (1990). Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in rat. *Neurosci. Lett.*120: 70-73
- Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrié P (2002). SR141716, a central cannabinoid (CB (1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav Pharmacol.*13: 451-463
- Copeland JR, Adem A, Jacob P, Nordberg A (1991). A comparison of the binding of nicotine, and nornicotine stereoisomers to nicotinic binding sites in rat brain cortex. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.*343: 123-127
- Corrigall WA, Coen KM (1989). Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology* **99**: 473–478
- Dani JA, Harris RA (2005). Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nature Neuroscience*8: 1465-70
- Dar R, Frenk H (2004). Do smokers self-administer nicotine? A review of the evidence. *Psychopharmacology*173: 18-26

- Davis JA, Gould TJ (2007). Beta2 subunit-containing nicotinic receptors mediate the enhancing effect of nicotine on trace cued fear conditioning in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology*190: 343-52
- Diana M, Tepper JM (2001). Electrophysiological pharmacology of mesencephalic dopaminergic neurons. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. G. Di Chiara, ed. pp: 1-62
- DiChiara G (1979). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur. J. Pharmacol.*375: 13-30
- Di Giovanni G, De Deurwaerdère P, Di Mascio M, Di Matteo V, Esposito E, Spampinato U (1999). Selective blockade of serotonin  $2C/2B$  receptors enhances mesolimbic and mesostriatal dopaminergic function: a combined in vivo electrophysiological and microdialysis study. *Neuroscience*91: 587-597
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E (1999). SB 242084, a selective serotonin  $2C$  receptor antagonist, increase dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology*38: 1195-1205
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito (2000). Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin  $2C$  receptors. *Brain Res.*865: 85-90
- Dominiak P, Fuchs G, Vo Toth S, Grobecker H (1985). Effects of nicotine and its major metabolites on blood pressure in anesthetized rats. *Klin Wochenschr.*63: 90-92
- Ehringer MA, Clegg HV, Collins AC, Corley RP, Crowley T, Hewitt JK, Hopfer CJ, Krauter K, Lessem J, Rhee SH, Schlaepfer I, Smolen A, Stallings MC, Young SE, Zeiger JS (2008). Association of the neuronal nicotinic receptor beta2 subunit gene (CHRNA2) with subjective responses to alcohol and nicotine. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*144B: 596-604
- El Bahri L (1991). Peganum Harmala L. A poisonous plant of North Africa. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 276-277
- Ergene E, Schoener EP (1993). Effects of harmaline (1-methyl-beta-carboline) on neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 951-957
- Fà M, Carcangiu G, Passino N, Ghiglieri V, Gessa GL, Mereu G (2000). Cigarette smoke inhalation stimulates dopaminergic neurons in rats. *NeuroReport.*6: 3637-3639
- Farzin D, Mansouri N (2006). Antidepressant-like effect of harmaline and other beta-carbolines in the mouse forced swim test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*16: 324-328
- Fehr C, Yakushev I, Hohmann N, Buchholz HG, Landvogt C, Deckers H, Eberhardt A, Kläger M, Smolka MN, Scheurich A, Dielentheis T, Schmidt LG, Rösch F, Bartenstein P, Gründer G, Schreckenberger M (2008). Association of low striatal dopamine d2 receptor availability with nicotine dependence similar to that seen with other drugs of abuse. *Am. J. Psychiatry*165: 507-514

- Fekkes D, Tuiten A, Bom I, Peplinkhuizen L (2001). Tryptophan: a precursor for the endogenous synthesis of norharman in man. *Neurosc. Lett.*303: 145-148
- Flores CM, Rgers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ (1992). A Subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol.*41: 31-37
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing rate differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci.*6: 968-973
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, MacGregor R, Alexoff D, Shea C, Schlyer D, Wolf AP, Warner D, Zezulcova I, Ciento R (1996). Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature*379: 733-736
- Fonnum F, Gottesfeld Z, Grofova I (1978). Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase, and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatoentopeduncular, and striatonigral GABAergic fibers. *Brain Res* 143 :125-138
- Fortin G, St-Gelais F, Yamaguchi N, Trudeau LE. Rôle des canaux potassiques dans l'inhibition de la libération de dopamine sous l'action de l'autorécepteur D<sub>2</sub>. Dpt. of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal PQ, Canada. Source Internet
- Frazier CJ, Rollins YD, Breese CR, Leronard S, Freedman R, Dunwiddie TV (1998). Acetylcholine activates an  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J. Neurosci.*18:1187-1195
- Fuentes J M, Damsma G, Fibiger HC (1992). Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacology.*106: 202-208
- Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, Smith C, Egan C, Davis K, Mattson MV (2000). Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub>) and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend.*60: 121-132
- Gobert A, Rivet J-M, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, Nicolas J-P, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ (2000). Serotonin <sub>2C</sub> receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse*36: 205-221
- Gonon GG (1988). Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*24: 19-28
- Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons burst firing. *J. Neurosci.*4: 2877-2890
- Grace AA, Onn SP (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci.*9: 3463-3481

- Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC (1992). Characterization of nicotinic receptor-mediated [<sup>3</sup>H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem.* 59: 848-856
- Grenhoff J, Aston-Jones G, Svensson TH (1986). Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol. Scand.* 128: 351-358
- Guillem K, Vouillac C, Azar MR, Parsons LH, Koob GF, Cador M et al. (2005) Monoamine oxydase inhibition dramatically increases the motivation to self-administer nicotine in rats. *J Neurosci.* 25: 8593-8600
- Hoffman D, Djordjevic MV, Hoffman I (1997). The changing cigarette. *Prev Med* 26: 427-437
- Holmstedt B (1982). Betacarbolines and tetrahydroisoquinolines: Historical and ethnopharmacological background. IN: Beta- carbolines and tetrahydro-isoquinolines. New York: Alan R. Liss: 3-13
- Husbands SM, Glennon RA, Gorgerat S, Gough R, Tyacke R, Crosby J, Nutt DJ, Lewis JW, Hudson AL (2001).  $\beta$ -carboline binding to imidazoline receptors; *Drug and Alcohol Dependence* 64: 203-208
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Zocchi A, Scrocco MG, Casolini P and Angelucci L (1990). Stress activation of limbic and cortical dopamine release is prevented by ICS 205-930 but not by diazepam. *Eur J Pharmacol.* 175: 211-214
- Jackson KJ, Martin BR, Changeux JP, Damaj MI (2008). Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in physical and affective nicotine withdrawal signs. *J Pharmacol Exp Ther.* 325: 302-312.
- Johnson SW, Seutin V, North RA (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258: 665-667
- Jones S, Yakel JL (1997). Functional nicotinic ACH receptors on interneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 504: 603-610
- Jones S, Sudweeks S, Yakel JL (1999). Nicotinic receptors in the brain: Correlating physiology with function. *Trends. Neurosci.* 22: 555-561.
- Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neurosciences* 57: 1047-1460
- Kalivas PW (2003). Predisposition to addiction: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and brain circuitry. *Am. J. Psychiatry.* 160: 1-2
- Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD, McGehee DS (2007). Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons. *J. Neurophysiol.* 98: 3388-3396
- Kennet GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S (1997). SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36: 609-620

- Kimes AS, Chefer SI, Matochik JA, Contoreggi CS, Vaupel DB, Stein EA, Mukhin AG (2008). Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in the human brain with PET: bolus plus infusion administration of 2-[<sup>18</sup>F]-A85380. *Neuroimage*.39: 717-727
- King SL, Caldarone BJ, Picciotto MR (2004). Beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are critical for dopamine-dependent locomotor activation following repeated nicotine administration. *Neuropharmacology*47 Suppl1: 132-139
- Klink R, De Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP(2001). Molecular and hysiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J. Neurosci*.21: 1452-63
- Koob GF (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends. Pharmacol. Sci*13: 177-184
- Lefèvre P (2005). *Alcaloïdes du Tabac. DIU de tabacologie. Paris XI et Paris XII. Tome I* (2004-2005) pp. 217-222
- Léna C, Popa D, Grailhe R, Escourrou P, Changeux JP, Adrien J( 2004). Beta2-containing nicotinic receptors contribute to the organization of sleep and regulate putative micro-arousals in mice. *J. Neurosci*.24: 5711-5718
- Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensonn TH, Changeux JP, Faure P (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotine receptors. *Neuron*50: 911-921
- Mansvelder M, McGehee (2002). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27: 349-357
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M et al (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*436: 103–107
- Matsubayashi H, Amano T, Seki T, Sasa M, Sakai N (2003). Electrophysiological characterization of nicotine-induced excitation of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra. *J Pharmacol Sci*.93: 143-148
- May T, Rommelspacher H, Pawlik M (1991). [<sup>2</sup>H]harman binding experiments: 1. A reversible and selective radioligand for monoamine oxydase subtype A in the CNS of the rat. *J Neurochem*.56: 490-499
- May T, Greube A, Strauss S, Heineke D, Lehmann J, Rommelspacher H (1994). Comparison of the in vitro binding characteristics of the beta-carbolines harman and norharman in rat brain and liver and in bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedeberts Arch. Pharmacol*.349: 308-317
- McGehee, DS, Role LW (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol*.57: 521–546
- Mereu G, Yoon K-WP, Boi V, Gessa GL, Naes L, Westfall TC (1987). Preferential stimulation of ventral tegmental dopaminergic neurons by nicotine. *European Jour. of Pharmacology*141: 395-399

- Meyer EM, deFiebre CM, Hunter BE, Simpkins CE, Fraumorth N, deFiebre NEC (1994). Effects of anabasine-related analogues on rat brain nicotinic receptor binding and on avoidance behaviors. *Drug Dev. Res.*31: 127-134
- Millamn MJ, Dekeyne A, Gobert A (1998). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology* 37:953-955
- Molimard R (1982). Modèles animaux de la dépendance tabagique. *Comptes Rendus de la 1<sup>ère</sup> Journée de la Dépendance Tabagique*. Paris, p.30-49.
- Molimard R (1995). Unknowns. *Tobacco and Health*. Ed : K Slama. Plenum Press New York, pp. 449-53.
- Molles BE, Maskos U, Pons S, Besson M, Guiard P, Guilloux JP, Evrard A, Cormier A, Mameli-Engvall M, Cloëz-Tayarani I, Nakatani H, Dufour N, Bemelmans AP, Mallet J, Cazala P, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2006). Targeted in vivo expression of nicotinic acetylcholine receptors in mouse brain using lentiviral expression vectors. *J Mol Neurosci.*30: 105-116
- Montecrieff J (1989). Determination of pharmacological levels of harmane, harmine and harmaline in mammalian brain tissue, cerebrospinal fluid and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 496: 269-278
- Muller WE, Fehske KJ, Borbe HO, Wollert U, Nanz C, Rommelspacher H (1981). On the neuropharmacology of Harmane and other  $\beta$ -carboline. *Pharmacol. Biochem. Behav.*14: 693-699
- Murase S, Grenoff J, Chouvet G, Gonon FG, Svensson TH (1993). Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. *Neurosci. Lett.*157: 53-56
- Musgrave IF, Badoer E (2000). Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM : possible role of I<sub>1</sub>-imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.*129: 1057-1059
- Myers RD, Melchior CL (1977). Differential actions on voluntary alcohol intake of tetrahydroisoquinolines or a beta-carboline infused chronically in the ventricle of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*7: 381-392
- Naranjo C, Efron D.H, Holmstedt B, Kilne NS (1979). Psychotropic properties of the harmala alkaloids. Eds. *Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs*. New York: Plenum Press: 385-391
- Nissbrandt H, Elverfors A, Engderg G (1994). Pharmacologically induced cessation of burst activity in nigral dopamine neurons; significance for the terminal dopamine efflux. *Synapse* 17: 217-224
- Nomikos GG, Schilström B, Hildebrand BE, Panagis G, Grenhoff J, Svensson TH (2000). Role of  $\alpha$ 7 nicotinic receptors in nicotine dependence and implications for psychiatric illness. *Behav Brain Res.*113: 97-103

- Ogawa M, Tsukada H, Hatano K, Ouchi Y, Saji H, Magata Y (2009). Central in vivo nicotinic acetylcholine receptor imaging agents for positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). *Biol. Pharm. Bull.*32: 337-340
- O'Leary K, Parameswaran N, McIntosh JM, Quik M (2008). Cotinine selectively activates a subpopulation of  $\alpha 3/\alpha 6\beta 2^*$  nicotinic receptors in monkey striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325: 646-654
- Overton PG, Clark D (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res. Rev.*25: 312–334
- Parini A, Moudanos CG, Pizzinat N, Lanier SM (1996). The elusive family of imidazoline binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.*17: 13-16
- Pawlik M, Rommelspacher H (1988). Demonstration of a distinct class of high-affinity binding sites for ( $^3\text{H}$ ) $\beta$ -carboline) in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 147: 163-171
- Phillipson OT (1979). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horse-radish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187: 117-144
- Picciotto MR, Zoli M, Lena C, Bessis A, Lallemend Y, Le Novère N, Vcent P, Pich EM, Burlet P, Changeux JP (1995). Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*374 : 65-67
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio L.M, Pich E.M, Fuxe K, Changeux JP (1998). Acetylcholine receptors containing the  $\beta 2$  subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*391: 173-177
- Pidoplichko VI, De Biasi M, Williams JT, Dani JA (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*390: 401-404
- Pierucci M, Di Matteo V, Esposito E (2004). Stimulation of serotonin  $2_C$  receptors blocks the hyperactivation of midbrain dopamine neurons induced by nicotine administration. *The Journal of Pharmacology and Exp. Ther.*309: 109-118
- Poindexter EH, Carpenter RD (1962). The isolation of harmaline and norharmaline from tobacco and cigarette smoke. *Phytochemistry*1: 215-221
- Pons SL, Fattore G, Cossu S, Tolu E, Porcu J, McIntosh M, Changeux JP, Maskos U, and Fratta W (2008 ). Crucial Role of  $\alpha 4$  and  $\alpha 6$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from Ventral Tegmental Area in Systemic Nicotine Self-Administration *The Journal of Neuroscience* 28:12318 –12327
- Pranzatelli MR, Snodgrass SR (1987). Harmaline alkaloids and related  $\beta$ -carbolines: A myoclonic model and antimyoclonic drugs. *96:703-719*
- Raybuck JD, Gould TJ (2009). Nicotine withdrawal-induced deficits in trace fear conditioning in C57BL/6 mice--a role for high-affinity beta2 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* 29:377-87

- Reavill C, Jenner P, Kumar R, Stolerman IP (1988). High affinity binding of [<sup>3</sup>H](~)nicotine to rat brain membranes and its inhibition by analogues of nicotine. *Neuropharmacology* 27: 235-241
- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E (1980). GABAergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitranssections of the striatonigral and pallidonigral pathways. *Brain Res.* 192: 413-420
- Risner ME, Goldberg SR, Prada JA, Cone EJ (1985). Effects of nicotine, cocaine and some of their metabolites on schedule-controlled responding by beagle dogs and squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234:113-119
- Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 72 : 55-64
- Role LW, Berg DK (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS Synapses. *Neuron* 16: 1077-1085
- Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Muller WE, Wollert U (1981). Benzodiazepine antagonism by harman and other  $\beta$ -carbolines in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 409-416
- Rommelspacher H, Buchau C, Weiss J (1987). Harman induces preference for ethanol in rats: Is the effect specific for ethanol *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 749-755
- Rommelspacher H, Schmidt LG, May T (1991). Plasma norharman (beta-carboline) levels are elevated in chronic alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 553-559
- Rommelspacher H, May T, Salewski B (1994). Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 252: 51-59
- Rommelspacher H, Meier-Henco M, Smolka M, Kloft C (2002). The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamine oxidase B in platelets. *Eur. J. Pharmacol.* 441: 115-125
- Ruiz-Durantez E, Ruiz-Ortega JA, Pineda J, Ugedo L (2001). Stimulatory effect of harmane and other  $\beta$ -carbolines on locus coeruleus neurons in anaesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 308: 197-200
- Sagara H, Kitamura Y, Yae T, Shibata K, Suemaru K, Sendo T, Araki H, Gomita Y (2008). Nicotinic acetylcholine  $\alpha 4\beta 2$  receptor regulates the motivational effect of intracranial self stimulation behavior in the runway method. *J. Pharmacol. Sci.* Dec. 108 : 455-461
- Saint-Jalm Y (2002). La fumée de tabac: propriétés physico-chimiques et toxicité. *Bull. ARN:* 33-54
- Salas R, Pieri F, De Biasi M (2004). Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the  $\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J. Neurosci.* 10:10035-10039.
- Sällström-Baum S, Hill R, Rommelspacher H (1995). Norharman-induced changes of extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Life. Sci.* 56: 1715-1720

- Sällström Baum S, Hill R, Rommelspacher H (1996). Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats. *Eur. J. Pharmacol.*314: 75-82
- Schilström B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG (1998). Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*85: 1005-1009
- Schilström B, Fagerquist MV, Zhang X, Hertel P, Panagis G, Nomikos GG, Svensson TH (2000). Putative role of presynaptic  $\alpha 7^*$  nicotinic receptors in nicotine stimulated increases of extracellular levels of glutamate and aspartate in the ventral tegmental area. *Synapse*38: 375-383
- Schilström B, Rawal N, Mamedi-Engvall M, Nomikos G.G, Svensson TH (2003). Dual effects of nicotine on dopamine neurons mediated by different nicotinic receptor subtypes. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*6: 1-11
- Schultz W (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36: 241-263
- Seutin V, Verbanck P, Masotte L, Dresse A (1990). Evidence for the presence of N-methyl-D-aspartate receptors in ventral tegmental area of the rat: an electrophysiological in vitro study. *Brain Res.*514: 147-150
- Sigg EB, Gyermek L, Hill RT, Yen HCY (1964). Neuropharmacology of some haramane derivatives. *Arch.Int.Pharmacodyn.*149: 164-180
- Sloan JW, Todd GD, Martin WR (1984) Nature of nicotine binding to rat brain P2 fraction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*20: 899-909
- Sorge RE, Clarke PB (2009). Rats self-administer intravenous nicotine delivered in a novel smoking-relevant procedure: effects of dopamine antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press
- Staley JK, Krishnan-Sarin S, Cosgrove KP, Krantzler E, Frohlich E, Perry E, Dubin JA, Estok K, Brenner E, Baldwin RM, Tamagnan GD, Seibyl JP, Jatlow P, Picciotto MR, London ED, O'Malley S, Van Dyck CH (2006). Human tobacco smokers in early abstinence have higher levels of beta2\* nicotinic acetylcholine receptors than nonsmokers. *J. Neurosci.*26: 8707-8714
- Stanford IM, Lacey MG (1996). Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT1B and 5-HT2c receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J. Neurosci.*16: 7566-7573
- Stead LG, Decker WW (2008). Clinical research 101: Why should you care? *Int. J. Emerg. Med.* 1: 121-122
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurone in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*18: 8003-8015
- Strömbom J, Jokela R, Saano V, Rolfsen W (1992). Binding of strychnocarpine and related  $\beta$ -carbolines to brain receptors in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*214: 165

- Swerdlow NR, Amalric M, Koob GF (1987). Nucleus accumbens opiate-dopamine interactions and locomotor activation in the rat: evidence for a pre-synaptic locus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*26:765-769
- Toth E, Sershen H, Hashim A, Vizi ES, Lajtha A (1992). Effects of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: role of glutamatergic acid. *Neurochem. Res.*17: 265-271
- Touiki K, Rat P, Molimard R, Chait A, de Beaufort R (2005). Harmaline inhibits serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. *Psychopharmacology*182: 562-569
- Touiki K, Rat P, Molimard R, Chait A, de Beaufort R (2007). Effects of tobacco and cigarette smoke extracts on serotonergic raphe neurons in the rat. *Neuroreport*18: 925-929
- Tuomisto L, Airaksinen MM, Peura P, Eriksson CJ (1982). Alcohol drinking in the rat: increases following intracerebroventricular treatment with tetrahydro-beta-carbolines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*17: 831-836
- Vainio PJ, Tuominen RK (2001). Cotinine binding to nicotinic acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes. *Nicotine Tob Res.*3: 177-182
- Valette H, Bottlaender M, Dollé F, Coulon C, Ottaviani M, Syrota A (2003). Long-lasting occupancy of central nicotinic acetylcholine receptors after smoking: a PET study in monkeys. *J. Neurochem.*84: 105-111
- Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PE, Sulzer D, Wightman RM (2003). Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J. Neurochem.*87: 1284-1295
- Villégier AS, Drouin C, Bizot JC, Marien M, Glowinski J, Colpaert F, Tassin JP (2003). Stimulation of postsynaptic alpha1b- and alpha2-adrenergic receptors amplifies dopamine-mediated locomotor activity in both rats and mice. *Synapse*50: 277- 284
- Villégier AS, Salomon L, Granon S, Changeux JP, Belluzzi JD, Leslie FM, Tassin JP (2006). Monoamine oxidase inhibitors allow locomotor and rewarding responses to nicotine. *Neuropsychopharmacology*31: 1704-1713
- de Vries TJ, Schoffelmeer ANM (2005). Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends. Pharmacol. Sci.*26: 420-426
- Wallas I, Fonnum F (1980). Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibers from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience*5: 63-72
- Walters CL, Brown S, Changeux JP, Martin B, Damaj MI. (2006). The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*184: 339-344
- Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J. Neurosci.* 23: 3176-3185

Wonnacott S (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends. Neurosci.*20: 92–98.

Zarrindast MR, Pazouki M, Nassiri-Rad S (1997). Involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in nicotine-induced antinociception. *Pharmacol. Toxicol.*81: 209-213

Zhang X, Nordberg A (1993). The competition of (-)-[<sup>3</sup>H]nicotine binding by the enantiomers of nicotine, nornicotine, and anatoxin-a in membranes and solubilized preparations of different brain regions of rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*348:28-34