

Indice

Abstract	2
Introduzione	3
L'Area ventrale tegmentale	3
Caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni dopaminergici	4
L'ippocampo	7
Il nucleo del letto della stria terminale	10
Scopo della ricerca	12
Materiali e metodi.....	13
Risultati	20
Discussione.....	29
Bibliografia	31
Ringraziamenti	39

Abstract

The hippocampus (HPC) is recognized as an important structure in learning and memory, including the integration of relevant informations to modulate the behavior. Tetanic burst stimulation of the HPC has been shown to generate adaptive synaptic changes, like long term potentiation (LTP), outside the HPC. Using *in vivo* extracellular recording techniques in anesthetized rats, we have investigated how the firing of dopaminergic neurons is affected by the delta frequency stimulation of the ventral subiculum of hippocampus (vSUB). This work shows that the delta burst stimulation in vSUB induce a LTP in Bed nucleus of the stria terminalis (BNST) neurons that projecting to the ventral tegmental area (VTA). Also, this LTP is blocked when we administrated the AP5 (a NMDA receptors antagonist) on the BNST neurons before tetanus.

In addition, this work shows that 24 hours after the induction of a tetanic stimulation in vSUB, there is an increase of the activity (firing rate, bursting activity) of DA neurons. We also demonstrated that an intra-BNST infusion of AP5 prior the vSUB tetanus blocks the effect of delta burst stimulation on VTA dopamine neurons bursting parameters.

These results contribute to clarify important points concerning the regulation of VTA DA neurons activity by the vSUB, probably through a balance of excitatory and inhibitory inputs from the BNST.

Key words: VTA, ventral subiculum, BNST, tetanic burst stimulation, LTP

Introduzione

L'Area ventrale tegmentale

L'area ventrale del Tegmento (VTA) è una struttura eterogenea composta da diversi nuclei e da diversi tipi di neuroni con differenti proprietà elettrofisiologiche. Numerosi studi hanno caratterizzato le varie divisioni di questa struttura. E' costituita da 4 aree principali: il pigmento parabrachiale (PBP) e il nucleo paranigrale (PN), aree ricche di neuroni dopaminergici (DA); l'area retroflessa parafascicolare (PFR) e la coda della VTA (tVTA), aree a bassa densità di neuroni DA (Ikemoto 2007). I suoi contorni sono delimitati dalle strutture circostanti: substantia nigra pars compacta lateralmente, nucleo rosso dorsalmente e nucleo interpeduncolare ventralmente.

La VTA è popolata prevalentemente da neuroni DA, che rappresentano tra il 60% (Margolis et al., 2006b; Fields et al., 2007) e il 75% (Swanson, 1982) dei neuroni della VTA, e il maggior numero di questi neuroni si trova nel PBP (Nair-Roberts et al., 2008). I neuroni GABA (acido gamma-ammino butirrico) invece costituiscono il 35% dei neuroni della VTA e sono più numerosi nella parte caudale soprattutto a livello dei nuclei para-interfascicolare (PIF) e PN (Olson et Nestler, 2007). Inoltre, negli ultimi anni, sono stati identificati dei neuroni che co-liberano DA e glutammato. Diversi studi condotti in vitro mostrano che neuroni DA in coltura possiedono un fenotipo glutammatergico e possono rilasciare sia DA che glutammato (Sulzer et al., 1998; Joyce et Rayport, 2000; Sulzer et Rayport, 2000; Rayport 2001). In vivo, questa co-espressione appare minima (Yamaguchi et al., 2007; 2011; Nair-Roberts et al., 2008).

Tuttavia, due recenti studi che utilizzano l'optogenetica, una tecnica innovativa che permette la stimolazione selettiva dei neuroni DA, hanno dimostrato che i neuroni dopaminergici della VTA sono capaci di liberare glutammato e di evocare correnti glutammatergiche a livello dei neuroni del NAcc (Tecuapleta et al., 2010; Stuber et al., 2010). Da un punto di vista funzionale, la VTA è una delle aree implicate nel sistema di ricompensa, ed è perciò coinvolta nell'apprendimento e nell'assunzione delle sostanze d'abuso. Infatti l'assunzione di sostanze d'abuso induce dei cambiamenti sia a breve che a lungo termine su questo sistema. La somministrazione di morfina, etanolo, nicotina, amfetamina e cocaina a basse dosi induce un aumento delle concentrazioni di DA nel Nucleus Accumbens (NAcc) (Di Chiara e Imperato, 1988). Inoltre le sostanze d'abuso hanno la capacità di modificare la trasmissione sinaptica dei neuroni della VTA.

Caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni dopaminergici

I neuroni DA della VTA possiedono differenti tipi di scarica. I criteri di identificazione dei neuroni DA della substantia nigra sono stati definiti da Grace & Bunney 1983a; 1984a,b:

- Attività lenta e regolare detta attività pacemaker in vitro.
- Attività lenta e irregolare in vivo, con una frequenza di base compresa tra 0.5 e 10 Hz
- Potenziale d'azione bifasico o trifasico con una durata superiore a 2.5 ms dall'inizio alla fine del potenziale d'azione (Figura 1, A).
- Profilo di scarica irregolare o in burst, costituito da treni d'onde in una rapida successione di spikes (i primi due spike sono separati da un intervallo di tempo

inferiore ad 80 ms), di ampiezza progressivamente decrescente e durata crescente, inframezzati nell'attività spontanea (Grace and Bunney 1984 b). La fine di un treno di burst si stabilisce quando due spikes sono separati da un intervallo di tempo superiore ai 160 ms. Quest'attività in burst è la maniera più efficace per i neuroni DA di rilasciare la dopamina nelle strutture bersaglio.

- Presenza di una “gobba” caratteristica dell'inizio del potenziale d'azione che si chiama notch.
- Inibizione della loro attività di base per la somministrazione di agonisti D2.

Inoltre, Ungless et al., 2004 ha proposto un nuovo criterio riguardante la durata minima per un potenziale d'azione. In questo lavoro gli autori hanno effettuato registrazioni juxtacellulari di numerosi neuroni della VTA, questi neuroni sono stati caratterizzati come neuroni DA o come neuroni non-DA secondo i criteri descritti da Grace and Bunney. Alla fine delle loro registrazioni sono stati effettuati esperimenti di immunoistochimica con la tirosina idrossilasi (TH) per discriminare i neuroni contenenti DA da quelli non-DA. In questo modo è stato osservato che alcuni neuroni immunonegativi per la TH, quindi non contenenti DA, hanno le stesse caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni contenenti DA della VTA. La loro frequenza di scarica è simile a quella dei neuroni DA e sono capaci di sparare in bursts; il loro potenziale d'azione può presentare lo stesso notch dei neuroni DA a livello della fase positiva. Inoltre, anche questi neuroni non-DA possiedono un potenziale bifasico o trifasico di ampiezza maggiore di 2 ms. Tuttavia è stata determinata una differenza significativa: i neuroni non-DA hanno una durata di metà del potenziale d'azione (a partire dall'inizio del potenziale fino all'apice della fase negativa) di ampiezza inferiore rispetto a quello dei

neuroni DA. Così, questa osservazione ha dato origine a un nuovo criterio che permette di considerare un neurone DA quando la durata del suo “mezzo potenziale” è uguale o superiore a 1,1 ms (Figura 1, B).

Tuttavia, va considerato che la durata dei potenziali d’azione e la loro forma dipende dai filtri utilizzati durante la registrazione.

L'ippocampo

L'ippocampo è una struttura a forma di C situata nella parte caudale del cervello. Si compone di una parte dorsale e una parte ventrale. Ciascuna parte è costituita da diverse sottoregioni come il giro dentato, le aree CA1, CA2 e CA3 e il ventral subiculum (van Strien et al., 2009).

Il limite anatomico tra il vSUB e l'area ventrale CA1 non è evidente. Uno studio anatomico suggerisce che il vSUB sia l'unica parte dell'ippocampo ventrale che proietta al (BNST), infatti l'infusione di traccianti anterogradi nel vSUB ha permesso di osservare delle terminazioni sul BNST (McDonald et al. 1999). Sono presenti anche molte altre proiezioni che partono dall'ippocampo ventrale, verso strutture corticali e sottocorticali come il setto laterale (LS) (Fanselow et Dong, 2010), la corteccia prefrontale (PFC) e l'amigdala (Ishikawa et Nakamura, 2006), l'ipotalamo (Kishi et al., 2000), il NAcc e la parte ventrale e caudale del nucleo caudato-putamen (Groenewegen et al., 1987)

L'ippocampo possiede due funzioni distinte, l'ippocampo dorsale ha un ruolo nell'acquisizione e consolidamento della memoria spaziale ed episodica, mentre l'ippocampo ventrale per via delle sue connessioni con l'amigdala, è coinvolto nella regolazione dei comportamenti emozionali quali l'ansia e la paura (Bennermann et al., 1999). L'induzione di una stimolazione tetanica nell'ippocampo ha dimostrato di generare cambiamenti sinaptici adattativi, come il potenziamento a lungo termine, al di fuori dell'ippocampo stesso.

Il vSUB gioca un ruolo importante nell'integrazione delle informazioni provenienti dall'ippocampo ventrale (CA1) e le trasmette a differenti regioni corticali e sub-corticali. Queste regioni sono implicate nell'asse ipotalamo-ipofisario che viene attivato in condizioni

di stress. Alcuni esperimenti mostrano che lesioni dell'ippocampo ventrale attenuano la liberazione di glucocorticoidi indotta dallo stress (Fendler et al., 1961; Knigge et Hays, 1963), ma non ci sono prove anatomiche che mostrano la proiezione diretta di questa struttura sui neuroni del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, i neuroni effettori dello stress. Al contrario, altri studi hanno dimostrato che l'ippocampo ventrale proietta su strutture GABAergiche che a loro volta proiettano a livello dei neuroni del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, ed è stato proposto come possibile link di collegamento il BNST (Cullinan et al., 1993). Infatti, altre strutture bersaglio del vSUB sono il BNST (McDonald et al., 1999) e il NAcc (Groenewegen et al., 1987), che fanno parte del sistema di ricompensa.

Per questi motivi il vSUB svolge un ruolo di mediatore sia alle risposte allo stress che a livello del circuito di ricompensa.

Connessioni con la VTA

Da un punto di vista anatomico il vSUB non proietta direttamente alla VTA, al contrario è stata evidenziata una proiezione diretta a partire dalla VTA verso il vSUB, attraverso l'utilizzo di un tracciante anterogrado iniettato nella VTA (Gasbarri et al., 1997).

Da un punto di vista funzionale, l'attivazione dell'ippocampo ventrale influenza l'attività dei neuroni DA della VTA, infatti come mostrato dal lavoro di Legault et al., 2000, la somministrazione di antagonisti glutammatergici (acido chinurenico) nella VTA blocca l'incremento del rilascio di DA nel NAcc indotto dalla stimolazione chimica del vSUB, suggerendo così la presenza di terminazioni glutammatergiche nella VTA.

Un'altra teoria, proposta da Floresco et al., 2001, riporta che gli inputs eccitatori provenienti dal vSUB che proiettano al NAcc portano alla disinibizione del controllo inibitorio sull'attività spontanea dei neuroni DA della VTA, probabilmente attraverso il ventral Pallidum (VP).

Il nucleo del letto della stria terminale

Il BNST deve il suo nome alla sua posizione anatomica, in quanto è collocato a una delle estremità della stria terminale, e diversi assoni lo collegano al nucleo dell'amigdala, è perciò considerato un componente dell'amigdala estesa (Alheid, 2003).

Le aree corticali e l'ippocampo ventrale costituiscono le principali proiezioni al BNST dopo quelle provenienti dall'amigdala. In particolare, l'ippocampo ventrale proietta prevalentemente sulla parte anteriore del BNST, nello specifico sul nucleo anterodorsale. L'area anteroventrale, contenente i nuclei dorsomediale, magnocellulare e ventrale, è debolmente in contatto con l'ippocampo ventrale; mentre, praticamente nessuno dei nuclei laterali riceve afferenze da parte dell'ippocampo ventrale. A livello del BNST posteriore, molte terminazioni arrivano ai nuclei trasversali e interfascicolare (Dong et al., 2001a).

Il BNST è una struttura costituita principalmente da neuroni GABA (75-90 % dei neuroni) (Cullinan et al. 1993). Tuttavia, la somministrazione di antagonisti selettivi e non selettivi per i recettori per il glutammato nella VTA, ha ridotto la risposta dei neuroni DA della VTA alla stimolazione elettrica del BNST ventrale, suggerendo così la presenza di una forte influenza eccitatoria da parte del BNST ventrale sui neuroni DA della VTA (Georges & Aston-Jones, 2001; 2002; Jalabert et al., 2009).

Il BNST, da un punto di vista funzionale, è un nucleo implicato nei meccanismi che regolano i comportamenti associati a una ricompensa, ed è coinvolto nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisaria (HPA) attivata in condizioni di stress (Herman et al., 2005).

Il BNST è da considerare parte integrante del circuito di ricompensa, in quanto la somministrazione delle principali sostanze d'abuso induce il rilascio di DA nel BNST (Carboni

et al. 2000), inoltre è coinvolto nei comportamenti operanti e nei fenomeni di plasticità sinaptica associata al consumo di droga (Dumont et al., 2005) ed è implicato negli effetti di rinforzo e di avversione durante l'astinenza da oppiacei (Delfs et al., 2000).

Il BNST è stato proposto come possibile collegamento tra le regioni limbiche che influenzano l'asse HPA e il nucleo paraventricolare ipotalamico (Cullinan et al., 1993; McElligott et Winder, 2009). Infatti, grazie alla sua suddivisione in diversi sottonuclei, il BNST è capace di agire in senso opposto su questo sistema: la lesione della parte anteriore attiva l'asse HPA, mentre la lesione della parte posteriore la inibisce (Choi et al., 2007). Il coinvolgimento del BNST nella modulazione dell'asse HPA gli permette, inoltre, di agire sul circuito della ricompensa, in quanto lo stress è stato per lungo tempo considerato un fattore implicato nei meccanismi di ricaduta all'assunzione di sostanze d'abuso (Erb et Stewart, 1999).

Connessioni con la VTA

Da un punto di vista anatomico, gli studi che hanno utilizzato dei traccianti retrogradi hanno dimostrato l'esistenza di proiezioni da parte del BNST verso la VTA (Phillipson, 1979a; Georges et Aston-Jones, 2002). Inoltre, attraverso il test di risposta antidromica effettuato durante le registrazioni in vivo, è stata confermata l'esistenza della via BNST-VTA (Georges et Aston-Jones, 2002; Massi e al., 2008). Infatti il BNST esercita un controllo tonico sui neuroni DA della VTA, modulando la frequenza di scarica di questi neuroni e della loro attività in burst (Georges et Aston-Jones, 2002). Infine, è stato osservato che le connessioni tra BNST e la VTA sono reciproche: l'iniezione di un tracciante retrogrado nel BNST ha mostrato la via VTA-BNST, e la metà dei neuroni della VTA che proiettano nella parte dorsolaterale del BNST sono stati identificati come TH+, ovvero DA (Hasue et Shammah-Lagnado, 2002).

Scopo della ricerca

Alla luce delle informazioni e delle considerazioni fatte nella parte introduttiva, con l'obiettivo di chiarire alcuni punti relativi alla regolazione dell'attività dei neuroni DA della VTA da parte dell'ippocampo ventrale, questo lavoro è stato articolato in più fasi.

Il primo obiettivo è stato quello di studiare il BNST come possibile link funzionale tra il vSUB e la VTA:

- attraverso la caratterizzazione dei tipi di risposta dei neuroni del BNST rispetto alla stimolazione del vSUB;
- attraverso l'identificazione di neuroni del BNST che rispondono con una eccitazione alla stimolazione del vSUB e che proiettano alla VTA, attraverso il test della stimolazione antidromica.

Il secondo obiettivo è stato quello studiare l'impatto della stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni DA della VTA, misurando i diversi parametri di eccitabilità dei neuroni DA che riflettono le variazioni sinaptiche a lungo termine. Questo progetto di ricerca offrirà spunti importanti su come i neuroni DA della VTA integrino gli inputs eccitatori provenienti dal vSUB e sui link di collegamento tra queste due aree del cervello.

Materiali e metodi

Animali

Sono stati utilizzati ratti albinos maschi Sprague Dawley (275-300 g), che sono stati collocati in gabbie da 3 o 4 in determinate condizioni (22-23°C, 40% di umidità; ciclo giorno/notte di 12 ore con luce alle 07:00, cibo e acqua ad libitum) e sono stati acclimatati alle condizioni dello stabulario una settimana prima di essere utilizzati.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con le direttive del Consiglio Europeo (n°2007/526/CE). Sono state seguite tutte le procedure al fine di ridurre al minimo dolore, sofferenza e numero di animali utilizzati.

Chirurgia

Ciascun ratto è stato anestetizzato con isofluorano (5%) prima dell'esperimento. Una volta piazzato nello stereotassico la sua temperatura corporea è stata mantenuta a 37°C con un sistema di riscaldamento a temperatura controllata. L'intervento è stato eseguito sotto isofluorano (1,5-2%) utilizzando una maschera facciale. Dopo aver fatto un'incisione per esporre le ossa craniche e rendere visibili le suture, è stato somministrato un anestetico locale (lidocaina 2%). I microelettrodi (di registrazione, di iniezione e di stimolazione) sono stati inseriti nella VTA, BNST e nel vSUB alle seguenti coordinate: VTA: Rispetto al Bregma -5,3 mm, rispetto al centro della vena sagittale -0,7 mm, e tra -7,5 e -8,5 mm rispetto alla superficie del cranio; BNST: Rispetto al Bregma 0,0 mm, rispetto alla linea mediana -1,3 mm,

tra -6,8 e -7,4 mm rispetto alla superficie del cranio; vSUB: -6.0mm rispetto al Bregma, -5,1 mm rispetto alla linea mediana, -7,5 mm dalla superficie del cranio.

Microinfusione di AP5

L'acido 5-amino fosfonovaleico (AP5) è un antagonista competitivo dei recettori NMDA. Nel primo gruppo di esperimenti, un volume pari a 60 nl di una soluzione di AP5 100 μ M è stato somministrato *in situ*, direttamente sul neurone, prima dell'induzione del protocollo di stimolazione tetanica nel vSUB.

Nel secondo gruppo di esperimenti è stato iniettato un volume totale di 300 nl (120 nl alla profondità di -7,2 mm e 180 nl alla profondità di -6,8 mm, in modo da bloccare l'intera area) di una soluzione di AP5 100 μ M nel BNST, prima di indurre la stimolazione tetanica nel vSUB. L'AP5 è stato disciolto in liquido cerebrospinale artificiale (ACSF).

Ai ratti appartenenti al gruppo di controllo è stato iniettato pari volume di ACSF per riprodurre le stesse condizioni sperimentali.

Stimolazione elettrica tetanica.

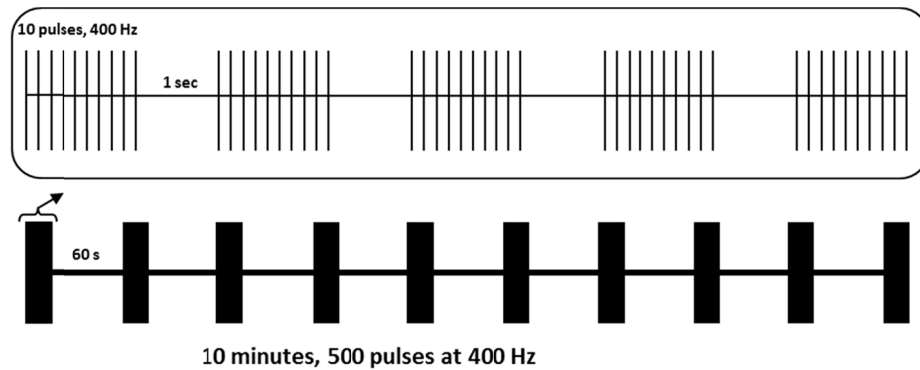


Figura 1. Protocollo di stimolazione tetanica Delta burst 50 treni a 400Hz (Williams J.M. et al., 2007).

Il vSUB viene stimolato con un elettrodo bipolare concentrico (Phymep). Questo elettrodo ha un diametro esterno di 250 μm . Il polo positivo è la parte interna dell'elettrodo ed è circondato dal polo negativo. Questi due poli sono separati da 100 μm . Il protocollo utilizzato per la stimolazione tetanica è il seguente: 50 treni di stimolazione a 400 Hz (durata dell'impulso: 250 μs ; 10 impulsi/treno, i treni sono raggruppati per 5 con intervalli di un secondo, ogni gruppo è separato da 1 minuto) (Williams et al., 2007).

Al gruppo di controllo SHAM è stato inserito lo stesso stimolo bipolare alle medesime coordinate del vSUB utilizzate per i ratti stimolati (STIM), senza però indurre la stimolazione tetanica. L'elettrodo è stato lasciato all'interno del vSUB per circa 10-15 min, che corrisponde al tempo necessario per indurre il protocollo di stimolazione tetanica.

Stimolazione Antidromica

La risposta antidromica di un neurone può essere provocata attraverso la stimolazione della parte periferica del terminale sinaptico, generando un potenziale d'azione (spike), che si propaga lungo l'assone in direzione opposta al potenziale ortodromico. Negli studi extracellulari il criterio utilizzato per determinare il carattere antidromico dei potenziali evocati e distinguerli dai potenziali ortodromici, si basa sui seguenti punti:

- Latenza fissa: la latenza di una risposta antidromica è il tempo che intercorre tra l'inizio dello stimolo e la comparsa della prima componente dello spike extracellulare. La variabilità della latenza antidromica in risposta a stimoli consecutivi è generalmente meno di 0,1 ms, per questo si può definire fissa (Jankowska et Roberts, 1972; Jankowska et Smith, 1973).
- Stabilità della soglia: quando sono usati stimoli di diverse intensità, l'eccitazione antidromica può essere spesso riconosciuta attraverso una soglia stabile e discreta e attraverso una risposta del tutto o niente (Bishop et al., 1973).
- Risposta a stimolazione ad alta frequenza: molti tipi di neuroni, se attivati antidromicamente, possono seguire fedelmente ripetute stimolazioni di 200 Hz per più periodi di tempo dell'ordine di poche centinaia di millisecondi, a differenza dell'attivazione ortodromica (Ammassian et De Vito, 1957; Eccles et al., 1960b; Akaike et al., 1973; Steriade et al, 1974).
- Collisione di una risposta antidromica con spikes spontanei ortodromici: la cellula dopo stimolazione spontanea o sinaptica può essere successivamente attivata antidromicamente dopo un minimale ritardo di tempo T, dove $T=R+2xT1$. R indica

il periodo assoluto refrattario di un assone e T1 è il tempo di latenza della risposta antidromica. Questo stimolo, quando viene applicato subito dopo l'insorgenza di uno spike spontaneo, cioè in un intervallo più breve del cosiddetto intervallo critico W (dove $W=T1+R$), non permetterà di rilevare un potenziale antidromico dal momento che sarà annullato (collisione) dal potenziale d'azione che viaggia ortodromicamente (Bishop et al., 1962; Euler et al., 1973; Trevino et al., 1983; Fuller et Schalag, 1976).

Le registrazioni di neuroni del BNST e della VTA.

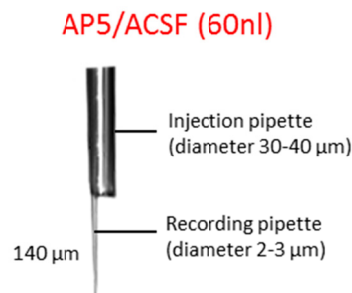


Figura 2. "Double barrel pipette" costituita da un elettrodo di registrazione e da un elettrodo da iniezione per la somministrazione farmacologica in situ.

Per la registrazione dei neuroni del BNST è stata utilizzata una "double barrel pipette" costituita da un elettrodo di registrazione e da un elettrodo da iniezione le cui punte distano di 140 μm l'una dall'altra. L'elettrodo registrante ha la punta di diametro di 2-3 μm e resistenza di circa 10-12 M Ω , ed è stato riempito con una soluzione di acetato di sodio 0,5 M contenente Pontamine Sky blue al 2%. L'elettrodo da iniezione invece, ha un diametro di

circa 30-40 μm e permette la somministrazione farmacologica *in situ*, direttamente sul neurone.

Per la registrazione di singoli neuroni DA della VTA, è stata preparato un elettrodo di vetro (diametro della punta: circa 4 μm ; resistenza: tra 2-5 $\text{M}\Omega$) riempito di una soluzione di acetato di sodio 0,5 M contenente Pontamine Sky blue al 2%. L'attività di ciascun neurone DA è stata registrata per circa 100 secondi, 24 ore dopo la stimolazione tetanica del vSUB.

Il segnale elettrico generato dal neurone registrato è stato elaborato da un apparecchio convenzionale elettrofisiologico, è stato prima amplificato 10 volte in modo differenziale attraverso un elettrodo di riferimento in contatto con il cranio dell'animale (Axoclamp2B, Axon Instruments) e di nuovo amplificato di altre 100 volte, il segnale viene filtrato (low filter: 300Hz, high filter: 10 kHz, AM system model 1700) per ottimizzare il rapporto segnale/rumore. Questo segnale viene quindi inviato ad un'interfaccia di acquisizione che cattura e converte i continui segnali elettrici in segnali analogici. Questi dati così generati sono diretti ad un computer e registrati dal software di acquisizione e di analisi dei dati Spike2 (CED 1401, Spike2, Cambridge Electronic Design).

Istologia.

Alla fine di ciascun esperimento, viene segnata la posizione dell'elettrodo di registrazione e dell'elettrodo di iniezione attraverso la deposizione iontoforetica di un punto blu proveniente dalla soluzione di Pontamine Sky blue 2% contenuta nella pipetta (-20 μA , DC per 30 min). Il sito di stimolazione viene visualizzato attraverso la traccia lasciata

dall'elettrodo stimolante. I cervelli prelevati sono stati congelati in isopentano a -80°C , conservati all'interno di un freezer alla temperatura di -20°C e tagliati in un criostato (fette dello spessore di $30\ \mu\text{m}$). Dopo di che è stata fatta una colorazione con rosso neutro per visualizzare i siti di registrazione, di iniezione e di stimolazione.

Analisi.

I risultati sono espressi come media \pm SEM. Quando sono stati confrontati due gruppi, SHAM e STIM, oppure SHAM+AP5 e STIM+AP5, ho utilizzato un t test di Student. Quando sono stati confrontati tre gruppi, ho utilizzato l'ANOVA a 1 via. In presenza di un effetto significativo di interazione tra i gruppi, è stato utilizzato come Post Hoc il Newman Keuls test.

Risultati

Caratterizzazione elettrofisiologica dei neuroni del BNST in risposta alla stimolazione del vSUB

La Figura 3 mostra la cartografia e la caratterizzazione della popolazione dei neuroni del BNST (53 neuroni registrati su 8 ratti) che rispondono alla stimolazione del vSUB (100 impulsi-treno, 0,5 Hz).

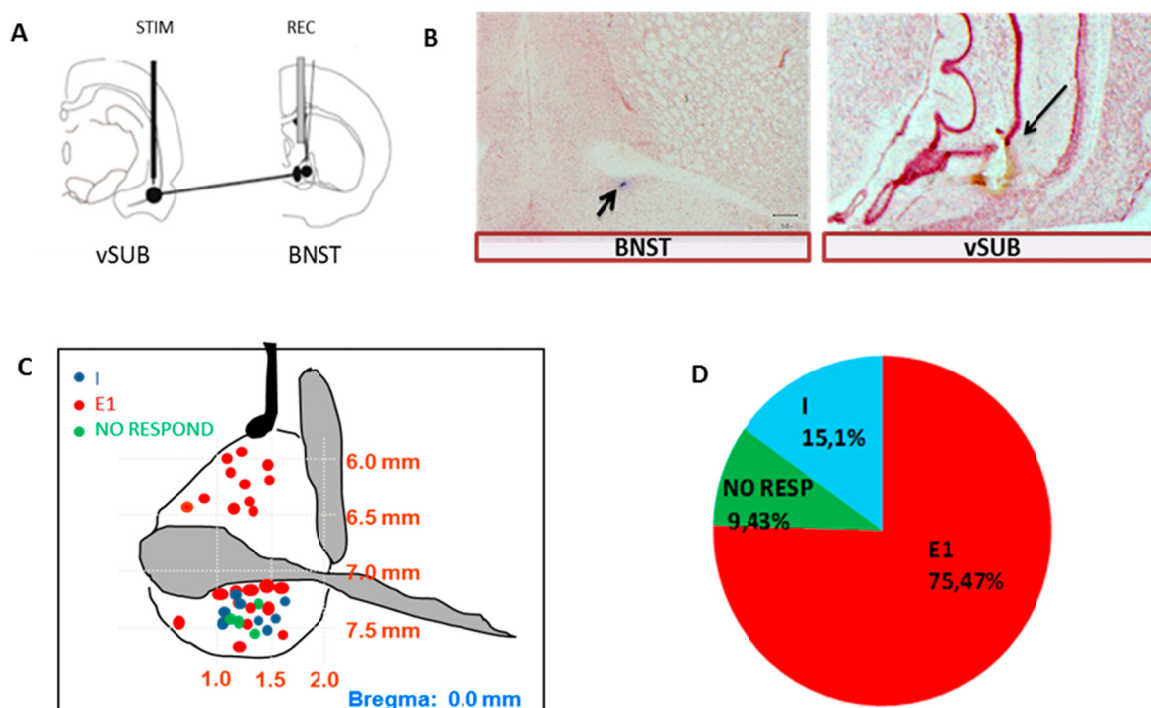


Figura 3. **A**, Protocollo sperimentale. **B**, Controllo istologico dei siti di registrazione e stimolazione, indicati dalle frecce nere. **C**, Disposizione anatomica dei neuroni BNST che rispondono alle stimolazione del vSUB. **D**, Differenti tipi di risposta dei neuroni del BNST evocate dalla stimolazione del vSUB (100 impulsi-treno, 0,5 Hz) in percentuale.

I neuroni del BNST rispondono per il 75,47% con una eccitazione monosinaptica (E1), determinata da una breve latenza di risposta (latenza $12,03 \pm 0,32$ ms; durata $10,54 \pm 0,43$ ms; $n=40$ di 53), il 15,1% dei neuroni risponde con una inibizione (I) (latenza $9,56 \pm 1,62$ ms; durata $155,11 \pm 35,99$ ms; $n=8$ di 53), infine il 9,43% dei neuroni registrati ($n=5$ di 53) non risponde alla stimolazione del vSUB. I PSTH (peristimulus time histogram) mostrano i tre tipi di risposta ottenuti (Figura 4).

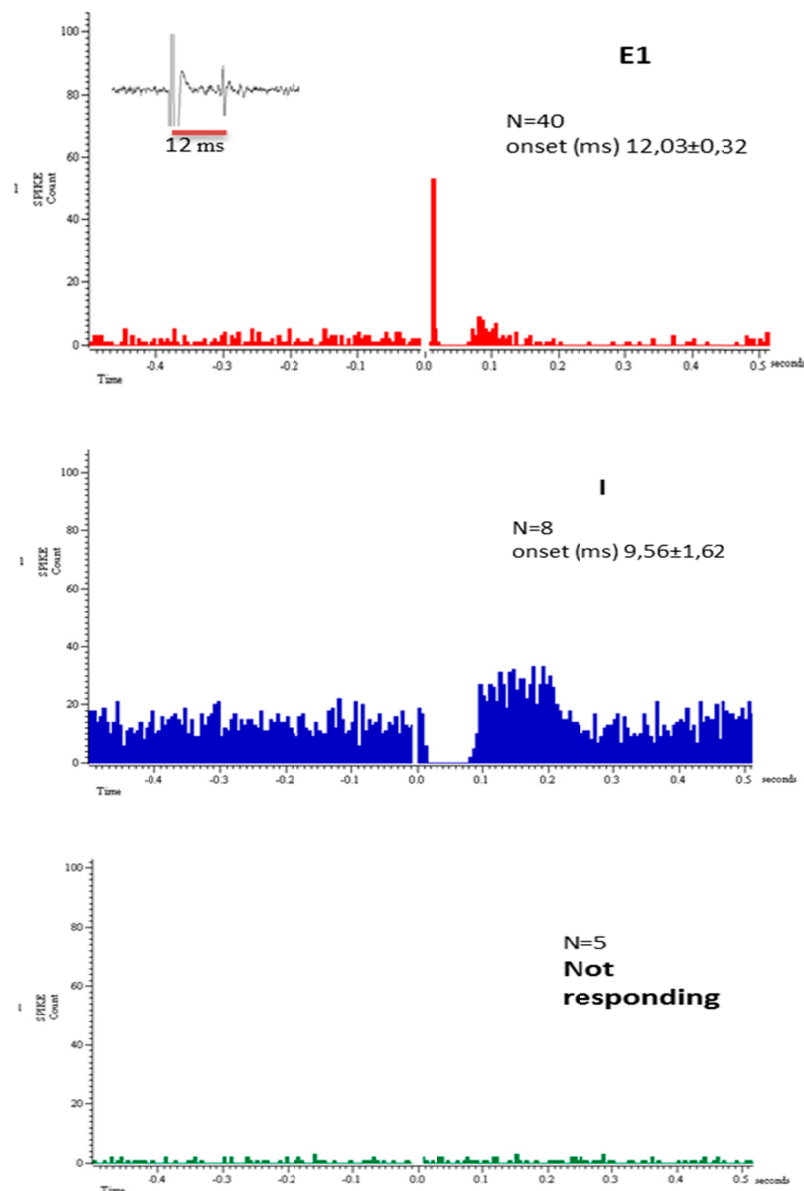


Figura 4. Tipico peristimulus time histogram (PSTH) che mostra una risposta eccitatoria (E1) in rosso, una inibizione (I) in blu e in verde una “non risposta” dei neuroni del BNST alla stimolazione del vSUB.

La stimolazione tetanica del vSUB induce un LTP nella via vSUB-BNST-VTA mediato dai recettori NMDA

Nella seconda parte di questo lavoro, sono stati individuati i neuroni del BNST che rispondessero con una eccitazione (E1) alla stimolazione del vSUB, e che proiettassero alla VTA. Per questo motivo è stato inserito un elettrodo stimolante in VTA e attraverso il test della stimolazione antidromica è stato possibile identificare tali neuroni, costruendo così il circuito vSUB-BNST-VTA (Figura 5). E' molto interessante notare che i neuroni che proiettano alla VTA si trovano prevalentemente nella parte anteroventrale del BNST (Figura 5, C).

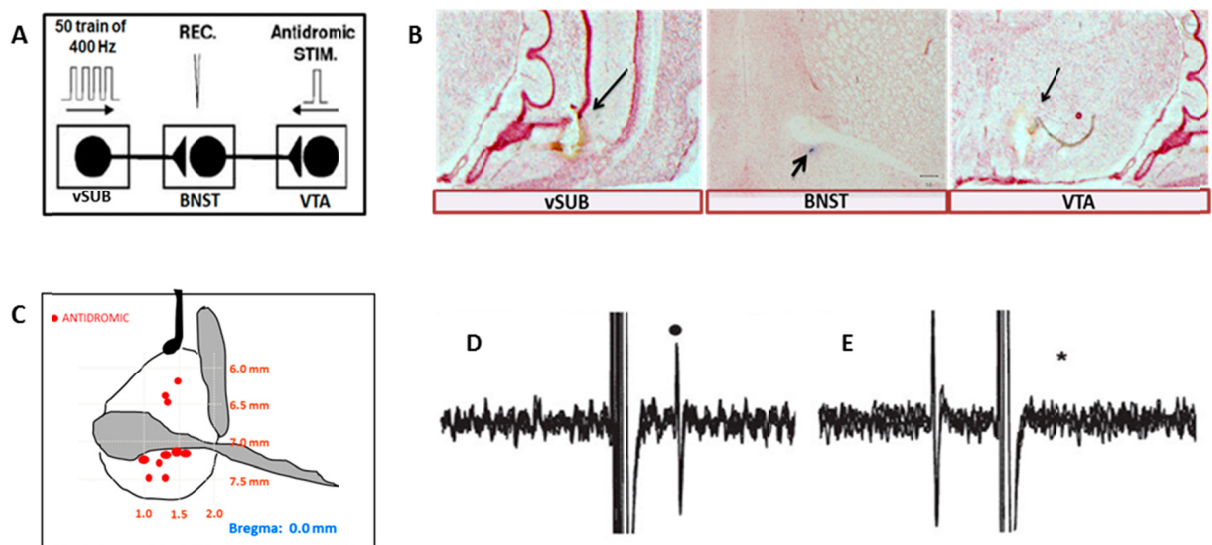


Figura 5. **A**, Protocollo sperimentale. **B**, Controllo istologico dei siti di registrazione e stimolazione, indicati dalle frecce nere. **C**, Distribuzione anatomica dei neuroni BNST che rispondono con una E1 alla stimolazione del vSUB e che sono antidromici alla VTA. **D**, Test della stimolazione antidromica e collisione.

A questo punto, sono stati realizzati due treni di stimolazione al fine di stabilire una linea di base della risposta eccitatoria di questi neuroni. Questi due treni di stimolazione sono stati

realizzati a un'ampiezza di stimolazione del vSUB alla quale i neuroni del BNST rispondono una volta su due (50%). Questo ha permesso di avere un margine per poter raggiungere la plasticità. Questo protocollo di stimolazione tetanica mostra che la stimolazione Delta burst nel vSUB aumenta l'ampiezza delle risposte eccitatorie dei neuroni nel BNST (Figura 6 A,C). Questo incremento è un fenomeno di LTP, dimostrato dal fatto che l'ampiezza delle risposte eccitatorie dei neuroni del BNST è aumentata del 67,48% tra i 20-40 minuti dopo l'induzione della stimolazione tetanica nel vSUB (before tetanus $98,45 \pm 3,382$; N=6; after tetanus $185,6 \pm 21,28$; N=6; t test di Student $*p < 0,03$) (Figura 6, B).

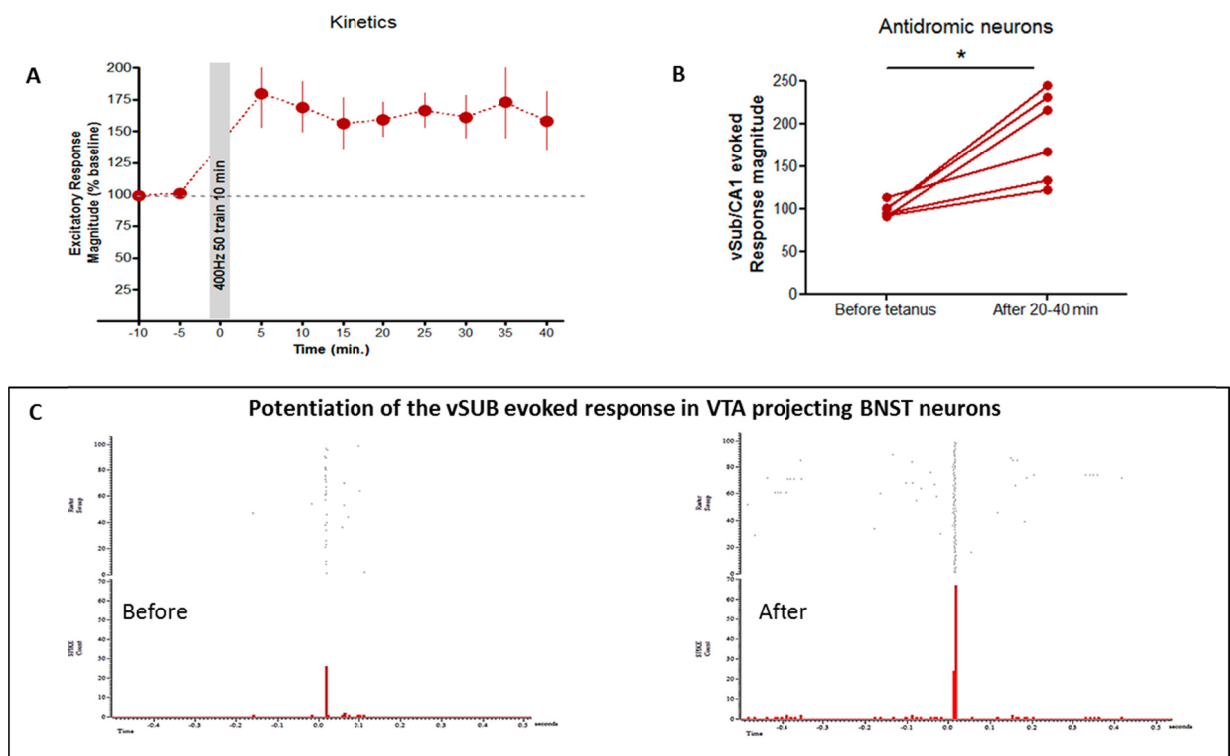


Figura 6. **A**, Il grafico della cinetica mostra l'effetto della stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni del BNST, in funzione del tempo. **B**, Il grafico mostra in dettaglio la quantificazione del LTP indotto dalla stimolazione Delta burst nel vSUB sui neuroni del BNST che proiettano alla VTA $*p < 0,003$. **C**, PSTH della risposta evocata nel BNST prima e dopo la stimolazione tetanica del vSUB.

Successivamente, per capire se il potenziamento a lungo termine indotto dalla stimolazione tetanica del vSUB fosse mediato dai recettori NMDA per il glutammato, è stato effettuato un altro set di esperimenti, in cui è stato somministrato AP5 *in situ* prima di indurre il protocollo di stimolazione tetanica nel vSUB, secondo il protocollo sperimentale precedentemente descritto. Questi risultati mostrano che la somministrazione di AP5 non solo blocca LTP indotto dalla stimolazione tetanica del vSUB, ma addirittura induce un LTD. I dati sono espressi in media \pm SEM: Before tetanus $98,106 \pm 2,477$; Tetanus $165,591 \pm 13,204$ (ratti N=6, neuroni N=6); Tetanus+AP5 $56,807 \pm 29,589$ (ratti N=6, neuroni N=6). Rmag%: [one-way ANOVA, $F(1630)=30924$; Newman-Keuls post-hoc test $***p<0.0001$] (Figura7).

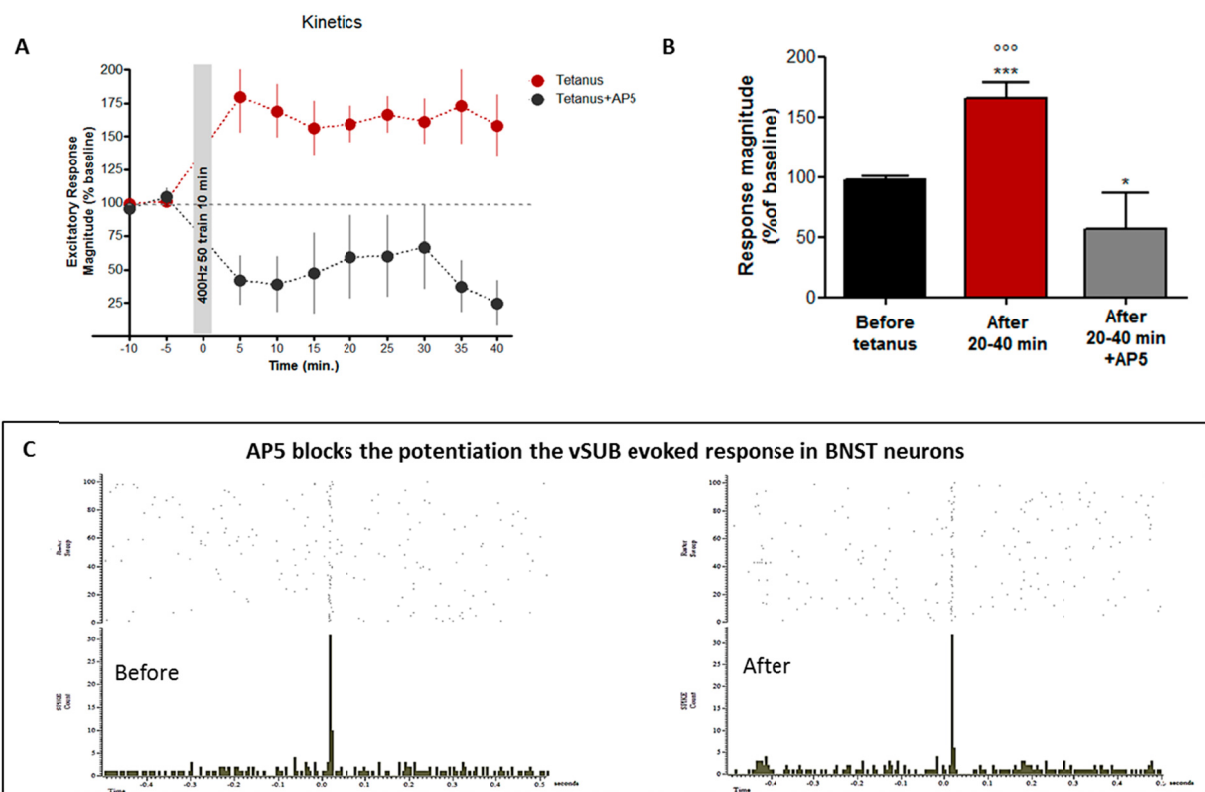


Figura 7. **A**, Il grafico della cinetica mostra l'effetto della stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni del BNST (punti rossi), e l'effetto della somministrazione di AP5 $100 \mu\text{M}$ (180 nl) che blocca LTP indotto dalla stimolazione tetanica del vSUB (punti grigi), in funzione della tempo. **B**, Il grafico che mostra la quantificazione del LTP 20-40 minuti dopo la stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni BNST trattati con ACSF o con AP5. Tetanus rispetto al basale $***p<0,0001$; Tetanus rispetto a Tetanus+AP5 $***p<0,0001$; *Tetanus+AP5 rispetto al basale $p<0,05$. **C**, PSTH della risposta evocata nel BNST prima e dopo l'iniezione di AP5 e il suo effetto sulla stimolazione tetanica del vSUB.

La stimolazione tetanica del vSUB potenzia il tono dei neuroni DA della VTA

Nell'ultima parte del lavoro di tesi, è stato studiato l'effetto della stimolazione tetanica sull'attività dei neuroni DA della VTA.

Per questi esperimenti è stato inserito un elettrodo stimolante nel vSUB, un elettrodo da iniezione nel BNST e un elettrodo registrante in VTA. I ratti sono stati divisi in due gruppi:

- STIM, in cui è stato indotto il protocollo di stimolazione tetanica nel vSUB; e
- SHAM, è il gruppo di controllo in cui è stato inserito l'elettrodo stimolante in vSUB per 10-15 minuti (il tempo necessario per effettuare il protocollo di stimolazione) senza indurre il protocollo di stimolazione nel vSUB, in modo da creare le stesse condizioni sperimentali.

In entrambi i gruppi sperimentali è stato somministrato del ACSF nel BNST per un volume pari a 300 nl suddivisi in due somministrazioni, la prima nella parte ventrale del BNST, e successivamente nella parte dorsale.

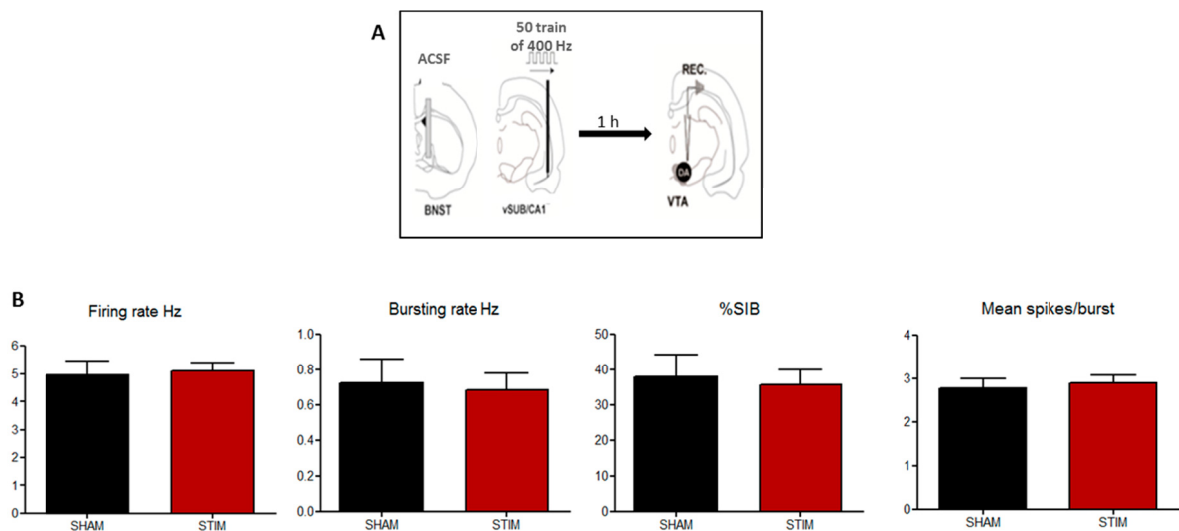


Figura 8. **A.** Protocollo sperimentale. **B.** I grafici che mostrano gli effetti 1 ora dopo la stimolazione tetanica del vSUB sul firing rate e bursting activity dei neuroni DA della VTA.

La registrazione dell'attività elettrica dei neuroni DA della VTA è cominciata un'ora dopo la stimolazione tetanica del vSUB e non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali SHAM (3 ratti, 18neuroni) e STIM (3 ratti, 31 neuroni) per nessuno dei parametri misurati: *firing rate* (SHAM: $4,97 \pm 0,49$ Hz; STIM: $5,12 \pm 0,3$ Hz), *bursting rate* (SHAM: $0,72 \pm 0,14$ Hz; STIM: $0,68 \pm 0,09$ Hz), *percentuale degli spike in burst (%SIB)* (SHAM: $37,87 \pm 6,25\%$; STIM: $35,74 \pm 4,2\%$), *media degli spike/burst (Mean Spike/Burst)* (SHAM: $2,78 \pm 0,21$; STIM: $2,9 \pm 0,18$)(Figura 8). Questi risultati mostrano che non c'è un effetto SHORT TERM.

Sulla base di studi bibliografici che mostrano un aumento del rapporto tra i recettori AMPA/NMDA nella VTA, 24 ore dopo una singola somministrazione di cocaina (Ungless et al., 2001) è stato deciso di registrare l'attività dei neuroni DA della VTA 24 ore dopo la stimolazione tetanica del vSUB (Figura 9).

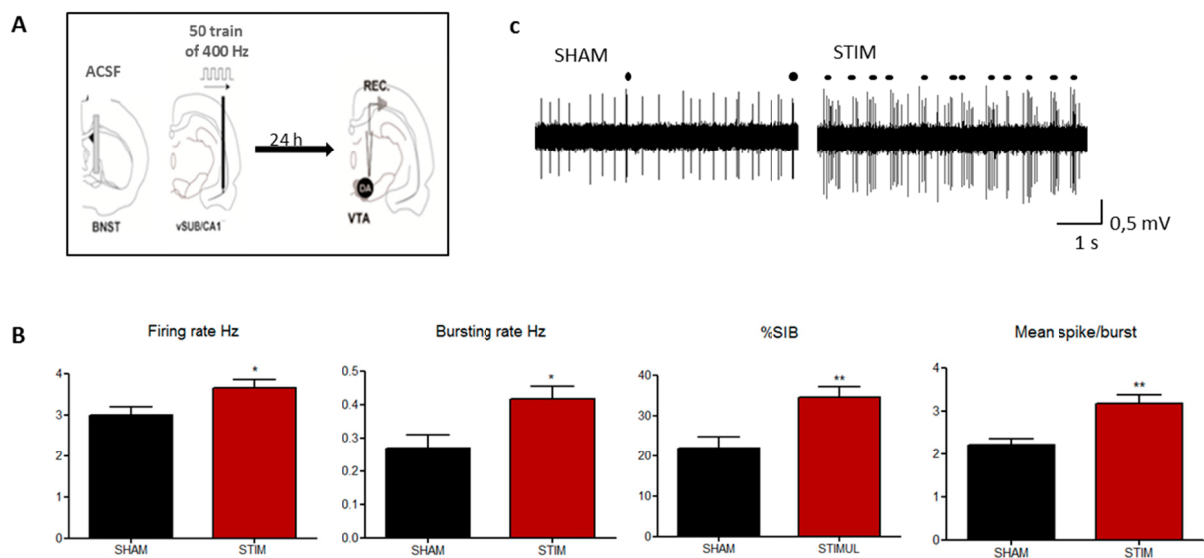


Figura 9. **A.** Protocollo sperimentale. **B.** I grafici che mostrano gli effetti 24 ore dopo la stimolazione tetanica del vSUB sul firing rate e bursting activity dei neuroni DA della VTA, * $p < 0,05$. **C.** Le tracce dell'oscilloscopio illustrano un esempio dell'effetto sulla produzione di burst firing nei due gruppi sperimentali SHAM e STIM.

Questi risultati mostrano che la stimolazione tetanica del vSUB ha un effetto LONG TERM, infatti, potenzia il tono dei neuroni DA della VTA per ciascuno dei parametri misurati nel gruppo STIM (8 ratti, 116 neuroni): *firing rate*: $3,65 \pm 0,20$ Hz; *bursting rate*: $0,42 \pm 0,04$ Hz; *%SIB*: $34,49 \pm 2,68$ %; *MSB*: $3,16 \pm 0,219$; rispetto al gruppo di controllo SHAM (9 ratti, 63 neuroni): *firing rate*: $2,99 \pm 0,2$ Hz; *bursting rate*: $0,27 \pm 0,04$ Hz; *%SIB*: $21,90 \pm 2,83$ %; *MSB*: $2,21 \pm 0,15$; per l'analisi è stato utilizzato il t test di Student, $*p < 0,05$.

AP5 in BNST blocca l'effetto della stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni DA della VTA

Successivamente, per capire se il potenziamento a lungo termine del tono dei neuroni DA della VTA indotto dalla stimolazione tetanica del vSUB fosse mediato dai recettori NMDA per il glutammato, è stato effettuato un altro set di esperimenti in cui è stato somministrato AP5 nel BNST prima di indurre il protocollo di stimolazione tetanica nel vSUB, secondo il disegno sperimentale precedentemente descritto. I ratti sono stati divisi in due gruppi:

- STIM+AP5, in cui è stato indotto il protocollo di stimolazione tetanica nel vSUB; e
- SHAM+AP5, è il gruppo di controllo in cui è stato inserito l'elettrodo stimolante nel vSUB per 10-15 minuti (il tempo necessario per effettuare il protocollo di stimolazione) senza indurre il protocollo di stimolazione nel vSUB, in modo da creare le stesse condizioni sperimentali

In entrambi i gruppi sperimentali è stato somministrato del AP5 nel BNST per un volume pari a 300 nl suddivisi in due somministrazioni, la prima nella parte ventrale del BNST, e successivamente nella parte dorsale.

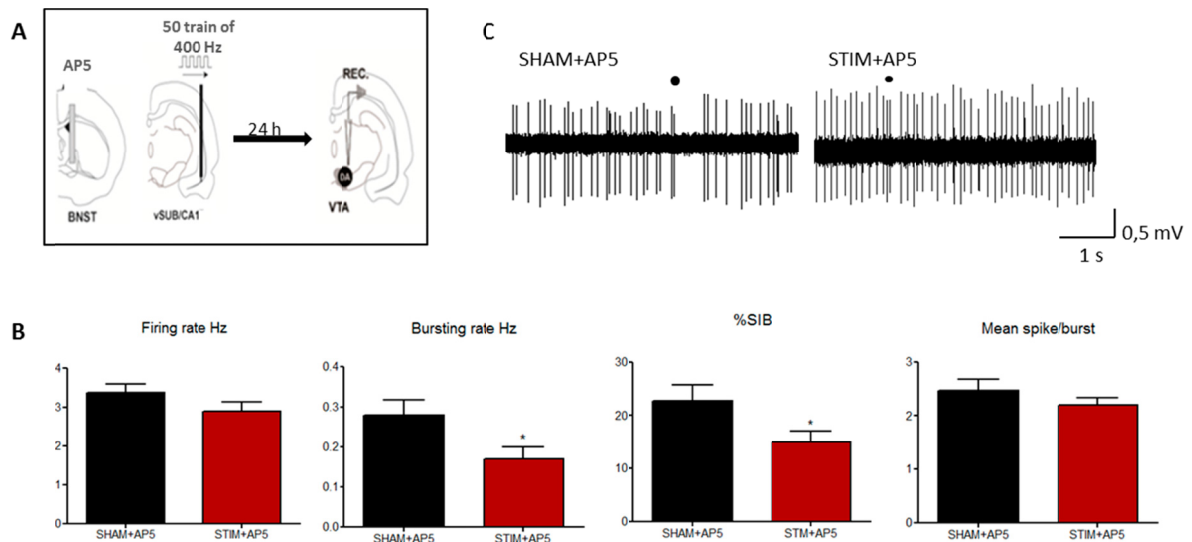


Figura 10. **A.** Protocollo sperimentale. **B.** I grafici che mostrano gli effetti, 24 ore dopo la somministrazione di AP5 e la stimolazione tetanica del vSUB, sul firing rate e bursting activity dei neuroni DA della VTA * $p < 0,05$. **C.** Le tracce dell'oscilloscopio illustrano un esempio dell'effetto sulla produzione di burst firing nei due gruppi sperimentali SHAM+AP5 e STIM+AP5.

La registrazione dell'attività elettrica dei neuroni dopaminergici della VTA è cominciata 24 ore dopo la somministrazione di AP5 e la stimolazione tetanica del vSUB, ed è stato osservato che l'effetto di potenziamento a lungo termine non solo è stato bloccato, ma per il bursting rate e la %SIB è stato addirittura ridotto. STIM+AP5 (5 ratti, 58 neuroni): *firing rate*: $2,9 \pm 0,23$ Hz; *bursting rate*: $0,17 \pm 0,02$ Hz; *%SIB*: $15,00 \pm 2,12$ %; *MSB*: $2,21 \pm 0,12$; rispetto al gruppo di controllo SHAM+AP5 (4 ratti, 59 neuroni): *firing rate*: $3,38 \pm 0,21$ Hz; *bursting rate*: $0,28 \pm 0,03$ Hz; *%SIB*: $22,68 \pm 3,06$ %; *MSB*: $2,47 \pm 0,21$; per l'analisi è stato utilizzato il t test di Student, * $p < 0,05$. (Figura 10).

Discussione

Lo studio identifica il circuito vSUB-BNST-VTA e descrive l'effetto di una stimolazione tetanica del vSUB sui neuroni del BNST. Con questi esperimenti, abbiamo dimostrato che la stimolazione tetanica del vSUB induce un LTP dipendente dai recettori NMDA nei neuroni del BNST che proiettano alla VTA. Questo risultato è in accordo con uno studio effettuato in vitro che mostra come il BNST dorsolaterale sia capace di esprimere un LTP dipendente dai recettori NMDA (Weitlauf et al. 2004). Tuttavia, la somministrazione di AP5 sui neuroni in registrazione nel BNST non solo blocca LTP, ma addirittura induce un LTD. Una possibile spiegazione a questo fenomeno, è la possibilità che il legame dell'AP5 sui recettori NMDA dei neuroni registrati, riduca la quantità di calcio in entrata indotta dalla stimolazione tetanica del vSUB. Infatti il calcio è necessario sia per l'induzione di fenomeni di LTP che di LTD, anche se nel LTD in misura minore (Mulkey et Malenka, 1992). Così, quando la depolarizzazione della membrana non è sufficiente (cioè quando l'AP5 è legato ai recettori NMDA) per promuovere a livello postsinaptico l'aumento di calcio necessario per l'ottenimento di un LTP, può essere invece indotto un LTD (Lisman, 1989; Mulkey et Malenka, 1992; Kirkwood et Bear, 1994).

Inoltre, con questo lavoro abbiamo dimostrato un effettivo controllo da parte del vSUB dell'ippocampo sui neuroni DA della VTA, attraverso un potenziamento di tutti i parametri misurati, a 24 ore di distanza dalla stimolazione tetanica (LTP). È particolarmente interessante l'effetto sul *bursting activity*, che è una caratteristica distintiva e tipica dei neuroni dopaminergici. L'incremento della frequenza delle burst sull'attività basale dei neuroni DA della VTA indica l'effettivo aumento dell'eccitabilità di questi neuroni dopo

l'induzione di un LTP da parte degli inputs glutammatergici del vSUB. Questo effetto è anche confermato dall'aumento della percentuale di spikes rilasciate in bursts e dall'aumento della media del numero di spikes nelle burst.

Il blocco del LTP indotto dalla stimolazione tetanica del vSUB, attraverso la somministrazione di AP5 indica un effettivo coinvolgimento del BNST come link funzionale tra la via ippocampale e i neuroni DA della VTA. Infatti, è stato bloccato l'incremento di tutti i parametri misurati, confermando così la nostra ipotesi che il BNST svolga un ruolo di integrazione delle informazioni provenienti dall'ippocampo ventrale verso la VTA.

Questi risultati sono in linea con gli studi presenti in bibliografia che mostrano che la stimolazione elettrica del BNST aumenta il firing rate e bursting activity dei neuroni dopaminergici della VTA (Georges e Aston-Jones, 2001, 2002; Massi et al, 2008), e che il BNST riceve inputs eccitatori dall'ippocampo ventrale (McDonald et al, 1999; Dong et al, 2001).

In conclusione, questi risultati dimostrano che il BNST integra le informazioni provenienti dal vSUB e le trasmette ai neuroni DA della VTA, probabilmente attraverso un bilanciamento degli inputs eccitatori ed inibitori provenienti dal BNST. Questo lavoro ha contribuito così a chiarire alcuni punti su come i neuroni DA della VTA vengano modulati dagli inputs eccitatori provenienti dall'ippocampo ventrale, nello specifico dal vSUB.

Il BNST potrebbe fornire un obiettivo importante per le future terapie farmacologiche al fine di prevenire patologie associate ai circuiti di ricompensa, quali le tossicodipendenze.

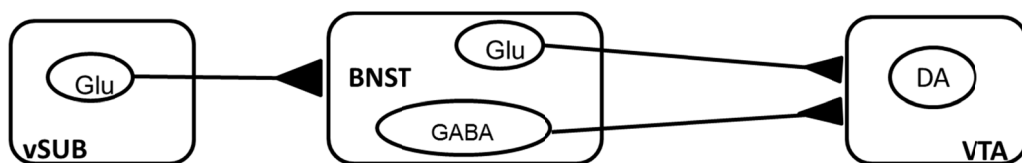


Figura 11. Circuito vSUB-BNST-VTA

Bibliografia

1. Alheid GF (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 985:185-205..
2. Akaike, T., Fanardjian, V.V., Ito, M., Kumada, M. e Nakajima, H. (1973) Electrophysiological analysis of the vestibulospinal reflex pathway of rabbit. I. Classification of tract cell, *Exp. Brain Res.*, 17: 477-496
3. Ammassian, V.E. e DeVito, J.L. (1957) . La trasmissione dans le noyau de Burdach, *Colloqueus int. Cent. Natn. Rech. Scient.*, 67: 353-393.
4. Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN (1999) Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav Neurosci.* 113:1170-88.
5. Bishop P.O., Burke W., Davis R. (1962). Single-unit recording from antidromically activated optic radiation neurones, *J. Physiol. Bioch., (Lond.)*, 162: 432-450.
6. Carboni E, Silvagni A, Rolando MT, Di Chiara G (2000) Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *The Journal of neuroscience* 20:1-5.
7. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007) Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary- adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *The Journal of neuroscience* 27:2025-34.

8. Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of comparative neurology* 332:1-20.
9. Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403:430-4.
10. Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5274-8.
11. Dumont EC, Mark GP, Mader S, Williams JT (2005) Self-administration enhances excitatory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Nature neuroscience* 8:413-4.
12. Eccles J.C., Eccles R.M. e Lundberg A. (1960). Types of neurone in and around the intermediate nucleus of the lumbosacral cord, *J. Physiol. (Lond.)*, 154: 89-114.
13. Erb S, Stewart J (1999) A role for the bed nucleus of the stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *The Journal of neuroscience* 19:1-6.
14. Euler C. Von, Hayward J.N., Marttila I. e Wyman R.J. (1973). The spinal connections of the inspiratory neurones of the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius of cat, *Brain Res.*, 61: 23-33.
15. Fanselow MS, Dong H-W (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.

16. Fendler K, Karmos G, Telegdy G (1961) The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 20:293-7.
17. Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual review of neuroscience* 30:289-316.
18. Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *The Journal of neuroscience* 21:4915-22.
19. Fuller J.H., Schlang J.D. (1976). Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation, *Brain Res.*, 112: 289-29.
20. Gasbarri A, Sulli A, Packard MG (1997) The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 21:1-22.
21. Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience* 22:5173-87.
22. Georges F, Aston-jones G (2001) Potent Regulation of Midbrain Dopamine Neurons by the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *The Journal of neuroscience* 21:1-6.
23. Grace AA, Bunney B (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10:301-15.
24. Grace AA, Bunney BS (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *The Journal of neuroscience* 4:2877-2890.

25. Groenewegen HJ, Vermeulen-Van der Zee E, Kortschot A te, Witter MP (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 23:103-20.
26. Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: A combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 454:15-33.
27. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry* 29:1201-13.
28. Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain research reviews* 56:27-78.
29. Ishikawa A, Nakamura S (2006). Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *Journal of neurophysiology* 96:2134-8.
30. Jalabert M, Aston-Jones G, Herzog E, Manzoni O, Georges F (2009) Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33:1336-46.
31. Jankowaska E., Roberts W.J. (1972). An electrophysiological demonstration of the axonal projections of single spinal interneurons in the cat. *J Physiol.* 222 (3): 597-622.

32. Jankowska E., Smith D.O. (1973). Antidromic activation of Renshaw cells and their axonal projections. *Acta Physiol Scand.* 88 (2): 198-214.
33. Joyce MP, Rayport S (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience* 99:445-56.
34. Kirkwood A, Bear MF (1994) Homosynaptic long-term depression in the visual cortex. *The Journal of neuroscience* 14:3404-12.
35. Kishi T, Tsumori T, Ono K, Yokota S, Ishino H, Yasui Y. (2000) Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *Journal of comparative neurology* 419:205-22.
36. Knigge KM, Hays M (1963) Evidence of inhibitive role of hippocampus in neural regulation of ACTH release. *Proc Soc Exp Biol Med.* 114:67-9.
37. Legault M, Rompré PP, Wise RA (2000) Chemical stimulation of the ventral hippocampus elevates nucleus accumbens dopamine by activating dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience* 20:1635-42.
38. Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:9574-8.
39. Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL (2006) (b) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of physiology* 577:907-24.
40. Massi L, Elezgarai I, Puente N, Reguero L, Grandes P, Manzoni OJ, Georges F (2008) Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical

- excitation of midbrain dopamine cells in vivo. *The Journal of neuroscience* 28:10496-508.
41. McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, Davis M (1999) Cortical afferents to the extended amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:309-38.
 42. McElligott ZA, Winder DG (2009) Modulation of glutamatergic synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33:1329-35.
 43. Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic longterm depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-75.
 44. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024-31.
 45. Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical Organization of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area of the Rat. *Synapse* 95:87-95.
 46. Phillipson OT (1979) (a) Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187:117-43.
 47. Rayport S (2001) Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism & related disorders* 7:261-264.
 48. Steriade M., Deschenes M., Oakson G. (1974). Inhibitory processes and interneuronal apparatus in motor cortex during sleep and waking. I. Background firing and

- responsiveness of pyramidal tract neurones and interneurons, *J. Neurophysiol.*, 37: 1065-1092.
49. Strien NM van, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272-82.
 50. Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A (2010) Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *The Journal of neuroscience* 30:8229-33.
 51. Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *The Journal of neuroscience* 18:4588-602.
 52. Sulzer D, Rayport S (2000) Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19:45-52.
 53. Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain research bulletin* 9:321-53.
 54. Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, Koos T (2010) Glutamatergic Signaling by Mesolimbic Dopamine Neurons in the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience* 30:7105-7110.
 55. Trevino D.L., Coulter J.D., Willis W.D. (1973). Location of cells of origin of spinothalamic tract in lumbar enlargement of the monkey, *J. Neurophysiol.*, 36: 750-761.

56. Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science (New York, N.Y.)* 303:2040-2.
57. Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-7.
58. Weitlauf C, Egli RE, Grueter BA, Winder DG (2004) High-frequency stimulation induces ethanol-sensitive long-term potentiation at glutamatergic synapses in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of neuroscience* 24:5741-7.
59. Williams JM, Guévremont D, Mason-Parker SE, Luxmanan C, Tate WP, Abraham WC (2007) Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals. *The Journal of neuroscience* 27:14171-8.
60. Yamaguchi T, Sheen W, Morales M (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience* 25:106-18.
61. Yamaguchi T, Wang H-L, Li X, Ng TH, Morales M (2011) Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *The Journal of neuroscience* 31:8476-90.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare al mio supervisore Professor Marco Diana per avermi accompagnato durante tutto il percorso di dottorato con i suoi suggerimenti e consigli, oltre che durante la stesura della tesi.

Un ringraziamento speciale va a tutte le persone che hanno partecipato a questo lavoro: il Dott. François Georges per la collaborazione, per avermi ospitato nel suo laboratorio, per l'aiuto fornitomi nell'acquisizione della tecnica e per tutti i continui consigli e confronti; la Dott.ssa Christelle Glengetas per il contributo nelle registrazioni in vivo; e a tutto l'Equipe Georges del "Interdisciplinary institute for Neuroscience (IINS) UMR CNRS-5297, University of Bordeaux", per il supporto scientifico e per gli aspetti ludici che abbiamo condiviso in questa splendida esperienza.