



HAL
open science

Caractérisation anatomo-fonctionnelle des cellules exprimant les récepteurs D2 à la dopamine (D2R) dans la moelle spinale de souris

Pauline Tarot

► **To cite this version:**

Pauline Tarot. Caractérisation anatomo-fonctionnelle des cellules exprimant les récepteurs D2 à la dopamine (D2R) dans la moelle spinale de souris. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT071 . tel-02650768

HAL Id: tel-02650768

<https://theses.hal.science/tel-02650768v1>

Submitted on 29 May 2020

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche CNRS UMR5203 – INSERM U1191

Caractérisation anatomo-fonctionnelle des cellules exprimant les récepteurs D2 à la dopamine (D2R) dans la moelle spinale de souris

Présentée par Pauline TAROT

Le 9 Décembre 2019

Sous la direction de Emmanuel VALJENT

Devant le jury composé de

Lénaïc MONCONDUIT, Maître de Conférence, Université Clermont Auvergne

Sébastien CARNICELLA, Chargé de Recherche, INSERM

Pascal FOSSAT, Professeur, Université de Bordeaux

Cyril RIVAT, Maître de Conférence, Université de Montpellier

Alexandre PATTYN, Chargé de Recherche, INSERM

Emmanuel VALJENT, Directeur de Recherche, INSERM

Rapporteuse

Rapporteur

Examineur

Invité

Invité

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Caractérisation anatomo-fonctionnelle des cellules exprimant les récepteurs D2 à la dopamine (D2R) dans la moelle spinale de souris

Résumé :

La moelle spinale est un relais majeur permettant aux informations sensorielles perçues à la périphérie d'être transférées et intégrées au niveau des centres supra-spinaux. Les afférences primaires somatosensorielles innervent la corne dorsale. Celle-ci est constituée d'un réseau hétérogène de neurones formant des circuits excitateurs et inhibiteurs complexes. De précédentes études indiquent que ces circuits neuronaux sont modulés par la dopamine, notamment via les D2R. Un dysfonctionnement des voies dopaminergiques descendantes peut engendrer des physiopathologies comme le syndrome des jambes sans repos. Cependant, les mécanismes d'action de la dopamine spinale sont encore très peu connus. Tous les récepteurs à la dopamine sont exprimés au niveau spinal. Le plus abondant est le D2R mais le rôle et l'identité précise des cellules exprimant ce récepteur ne sont pas connus. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation anatomo-fonctionnelle de ces cellules. Grâce au modèle murin *Drd2-Cre:RiboTag* généré au laboratoire, nous avons démontré que les cellules D2R-positives étaient distribuées tout au long de la moelle spinale avec une expression préférentielle au niveau de la corne dorsale. Les D2R sont exprimés dans des populations neuronales très hétérogènes, aussi bien excitatrices qu'inhibitrices. Pour finir, nous avons montré que le KO conditionnel du gène *drd2* au niveau lombaire n'entraîne pas d'ataxie, de paralysie ou d'altération de la locomotion. L'état des lieux concernant la caractérisation neurochimique des cellules D2R-positives ouvre la possibilité d'avoir une approche fonctionnelle plus spécifique et d'avoir des perspectives d'études sur les sous-circuits dopaminergiques spinaux.

Mots clés : dopamine, D2R, moelle spinale, hétérogénéité moléculaire, sensorimoteur

Abstract :

The spinal cord is the major relay station for sensory information generated at the periphery and transferred for processing to the brain. Sensitive primary afferent fibers innervate to the dorsal horn that is populated by a vast diversity of neurons that forms a complex network of excitatory and inhibitory circuits. Previous studies indicated that these neuronal ensembles could be modulated by the spinal dopaminergic system notably through the dopamine D2 receptors (D2R). A dysfunction of descending dopaminergic pathways could lead to pathology like Rest Less Syndrom. Nevertheless, mechanisms by which dopamine acts are poorly understood. All dopamine receptors are expressed in the spinal cord, among which D2R is the most abundant, however the precise identity and role of spinal D2R-cells remains largely unknown. In this study, we focused on the anatomo-functional characterization of the neurons containing D2R in the mouse spinal cord. Thanks to the mouse model *Drd2:Cre-RiboTag* previously developed in our lab, we could show that D2R-positive cells are expressed all along the spinal cord with a preferential expression in the dorsal horn. D2R are expressed in very heterogeneous neuronal population, in excitatory and inhibitory cells. Furthermore, we have shown that conditional KO of *drd2* in lumbar cord didn't lead to ataxia, paralysis or locomotor alteration. This study allows us to unravel the precise neurochemical identity of D2R-neurons. Future studies could use this descriptive study to choose a more specific functional approach to better understand spinal dopaminergic pathways using D2R.

Key words: dopamine, D2R, spinal cord, molecular heterogeneity, sensorimotor

Discipline : Neurosciences

Laboratoire : IGF – INSERM U1191 – Université de Montpellier, 141 rue de la Cardonille 34094 Montpellier CEDEX

Remerciements,

Sacré pari que de commencer une thèse. Au début, on pense à tout ce que ça apporte d'un point de vue professionnel. J'avais beaucoup sous-estimé ce que ça pouvait aussi apporter sur le plan personnel. On dit aussi qu'une thèse c'est un travail personnel et bien je ne serais pas arrivée au bout sans l'aide et le soutien de beaucoup de personnes. **Merci.**

A l'équipe

Je tiens d'abord à te remercier **Manu**, de m'avoir accueillie dans ton équipe, et de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet. Ça n'a pas toujours été simple, mais nous avons toujours su gérer les problèmes. Merci de ton soutien et de ta patience, merci d'être aussi passionné. Merci à **Emma** et **Laura**, de nous avoir accueilli les bras ouverts, **Laia** et moi, les deux petits bébés de l'équipe. Merci pour votre aide d'une valeur inestimable, de votre temps à nous expliquer et ré-expliquer mille fois les mêmes choses. Merci de n'avoir JAMAIS hésité à m'aider, de toujours l'avoir fait avec patience. Merci pour ces fous rires basés sur les phrases Fran-glai-spagnol. Merci **Laura** pour ton positivisme incroyable, ta bienveillance. Merci de tenir aussi peu l'alcool ! Bien sûr, merci **Laia**, ma jumelle de thèse. Merci pour ces moments intenses de calcul de dilution, merci de ne pas m'en vouloir pour mon premier « Bonjour » que je t'ai adressé. Merci aussi pour nos disputes, parce que ça compte. Merci de votre amitié les filles, MERCI POUR LE PARTAGE DU GENOTYPAGE PUTAIN. Merci d'avoir rendu ces trois années super chouettes à vos côtés. Je n'aurai pas voulu tomber dans une autre équipe.

A l'ensemble des membres du jury,

Merci à **Lénaïc Monconduit** et **Sébastien Carnicella** d'avoir accepté de relire et évaluer mon travail. Merci à **Pascal Fossat** de bien vouloir examiner ce travail de thèse ainsi qu'à **Cyril Rivat** et **Alexandre Pattyn**. **Sébastien et Alexandre**, merci d'avoir suivi l'histoire et de répondre présents pour le dernier chapitre ! Merci pour votre temps et investissement à tous.

Aux gens de l'IGF,

Je ne pourrai pas tous les citer. Mais merci à tous ceux dont j'ai croisé le chemin, et avec qui j'ai partagé plus qu'un simple bonjour dans les couloirs, vous avez tous contribué à rendre cette expérience chouette.

Merci aux animaliers, avec une mention spéciale pour toi **Denis**, avec tes récits et cartes postales de voyages qui me faisaient souvent râler, mais surtout toujours plaisir ! Merci de m'avoir tenu compagnie en salle de chirurgie, et de t'être assuré que je ne mourais pas d'ennui pendant mes milles injections. Merci **aux Érics** du système informatique, d'avoir

calmé mes moments de détresse en réparant mon ordi, plus d'une fois. Merci à **Marie-Pierre** de la plateforme MRI pour son aide.

Merci aux anciens ; **Myriam, Antoine** (mais toi t'auras un autre paragraphe TMT), **Matthias, Alex, ...** Qui ont rendu le quotidien tellement cool.. Merci à **l'équipe d'Emmanuel Bourinet** pour tous les échanges scientifiques et les coups de pouce. Merci **Antoine** (t'es partout) de m'avoir initiée à la moelle épinière, et de m'avoir appris tous les premiers pas. Merci **Amaury** d'avoir pris le relais, merci pour ton aide précieuse scientifique, et pas que. Merci d'avoir pris le temps de relire et corriger mon intro de thèse. Merci à **l'équipe de François Rassendren** pour les échanges scientifiques ET de m'avoir accepté pour certains Vendredi-Bières, merci **Vincent** de m'avoir laissée chanter Céline Dion dans votre labo pendant le RNAscope (je ne dirai pas que tu chantais avec moi). Et enfin, Merci **Jennifer Hua** et **Laura Rolland** pour les discussions scientifiques.

Aux Kopines,

NON J'DECONNE. Merci les filles. Pour ces discussions GIF, ces bières hebdomadaires, ces sushis (qu'on devrait rendre hebdomadaires), merci pour ces moments bitchages. Merci d'être en train de relire mes fautes d'orthographe de la partie Remerciements. Merci pour tous vos bons conseils. Merci **Jenn** pour ton « nul c'est mieux que rien » qui m'a tellement aidée à avancer et merci pour les Chokobons en MIST, ça aussi ça m'a aidé à avancer. Merci pour le déménagement, merci pour les brunch, merci **Laura** de m'avoir appris à prononcer bainiouAre et de m'avoir fait découvrir les Curly bizarres au BBQ . Merci d'être si présentes pour ces derniers mois de thèse. Merci de votre soutien, de votre amitié. Et surtout : merci pour nos futurs Karaoké. Parce moi, j'irai ou tu iras.

Aux amis,

Merci Biboune, Loulou (JD), Antoine (te revoilà), Florin, Mégane, Greg, Gaïa, **merci à vous que j'aime à en rire**. Merci pour ces années d'amitié depuis la L3PAN dont on parle encore. Merci pour votre soutien depuis ces 7 dernières années. Merci pour votre présence dans les moments géniaux et les moments supers difficiles. Merci de faire partie de ma vie, et d'être mon cocon de confort et d'amour. Merci **Florin** pour ces quelques mois de colloc, ces sessions art thérapie, merci de cette sortie à la carterie, des petits papiers positifs, des soirées karaoké, des réveils karaoké, merci d'avoir mis du positif dans ma vie au moment où j'en avais beaucoup besoin. Merci **M&G** pour votre amitié, et votre coaching à la boxe, merci Greg pour ta délicatesse dans tes fouettés visages « Arrête je saigne ! – Ah tu saignes ? Ca veut dire que t'es une vraie, continue ! ». Merci Gaïa, petite mascotte du groupe, de rajouter un peu de douceur au groupe, on t'a épargnée bien des histoires ! (on attend tes 18 ans). Merci **Antoine**, bibou. Je vais censurer la plupart des choses que j'ai envie de dire, ne me remercie pas ! Merci pour ton soutien, et ces milles fous rires, merci de m'avoir accompagnée dans ma thèse, du début à la fin, merci pour ton aide précieuse, mais surtout merci pour tous ces moments d'amitié partagés, au rockstore, au temple, dans les rues de Mtp,... Merci pour les soirées à se regarder dans le blanc des yeux, merci pour toutes ces musiques partagées, merci pour le concert de Jabberwocky.

Merci d'avoir fini mon puzzle trop relou. Merci d'être venu avec moi au parapente et d'avoir fait semblant de ne pas avoir peur. Merci pour les rivières, les sorties vélos, les discussions qui t'ont tellement saoulé mais auxquelles tu répondais toujours présent. Merci pour les DEUX tableaux des « pour/contre » que tu m'as fait faire. Pour les deux, tu avais raison. Merci mon **Loulou**, pour ton amitié, et tous ces souvenirs créés ensemble. Merci pour l'Ecosse, merci pour Grenade, merci pour le Brésil, merci pour le Canigou. Merci de ton soutien, et de cette sincérité. Merci pour ces fous rires, merci pour les crêpes, les soirées puzzle, les soirées chocolat chaud, les gouters, les moments juste à être ensemble, mes préférés. Merci d'avoir sonné à ma porte cette fameuse soirée, et de m'avoir chanté « tu t'envoles ».

Biboune, ma biboune. Je crois que ce paragraphe est encore plus difficile à écrire que l'intro. Merci pour ton amour inconditionnel. Pour ton soutien et ton écoute à toute épreuve. Merci pour ces 4 mois de colloc à Belsize putain. Merci pour ces 3 ans de colloc à Eucalyptus. Merci pour ces vocaux et appels quotidiens depuis plus de 2 ans. Merci de m'avoir écoutée me plaindre tant de fois et merci d'en n'être toujours pas lassée. Merci pour tous tes conseils pour faire passer les moments difficiles. Merci pour ces soirées karaoké à l'appart, ces aprem zumba, ces soirées sushis-TBBT, ces dimanche Domac, merci de m'avoir préparé à manger toutes les fois où je rentrais tard de la boxe, ça me manque. Merci de faire partie de mon quotidien depuis tant d'années. Merci biboune de relire ma thèse pour corriger les fautes, merci de me soutenir, dans tout ce que je fais. Merci pour ces fous rires, qui rendent les choses tellement plus simples. Merci d'être là.

Merci à vous, que j'aime à en rire. Merci de ce qu'on est, ensemble.

Merci **Dominique** et **Thierry**, Papounet et Mamounette de Margaux. Merci pour votre générosité. Merci pour votre aide pendant ces 3 années, merci pour votre gentillesse et bienveillance. Merci pour tous ces petits souvenirs ramenés de chacun de vos voyages, merci pour tous les moments partagés ensemble, plus qu'agréables. Merci d'être là.

Merci **Fé** et **Ré**, de nous avoir accueilli Louis et moi et de nous avoir fait découvrir le Brésil de la meilleure façon possible. Merci pour votre énergie, votre lumière et votre soutien. Je dirais même « aaaah Carano... » !

Merci **Sophie**, pour ton amitié. Merci pour ta bienveillance et ton énergie qui m'a tirée vers le haut tellement de fois. Merci d'être là pour me rattacher à ce qui a vraiment de l'importance. Merci pour ces soirées, et surtout celle en tête à tête au marché des producteurs.

Merci **Amaury** (encore), merci pour les cafés du matin, pour ton soutien. Merci pour les okonomiyaki et en fait j'aime pas, mais je te le dis ici, comme ça, ça passe mieux. Merci de ne pas m'avoir écoutée pour le pont, grâce à toi, on a pu rentrer vivants. Merci pour ton imitation du marseillais qui montre ses muscles, ça te va si bien ! Merci pour toutes les futurs rando qu'on va partager ! Et je te dois encore des bières.

Merci **Julie**, pour les rando sous la pluie et l'orage. Hein que c'était bien ? Merci pour ton entrain à faire toujours plein de choses, merci pour tous ces bons moments partagés qui ont rendu certains moments un peu plus faciles..

Merci **Marie-Ju** et **Gwenn**, pour votre soutien, vos petits messages d'encouragement, les bières partagées, les cookies et les escapes !

Merci **Chloé**, car même si tu ne m'aimes pas parce que je travaille sur des petites souris trop mignonnes, tu n'as pas hésité à m'apporter un soutien moral pendant ces derniers moments d'écritures. Merci pour ces gifs, cette bonne humeur, et ces rêves de vacances sur du Céline Dion, entourées de Tacos !

À ma famille,

Merci **Maman**. Merci de m'avoir toujours soutenue, merci pour ton amour. Merci d'avoir essayé de comprendre tant de fois mon sujet de thèse. Merci de toujours répondre présente, quoiqu'il arrive, sans jamais hésiter. Merci pour les petits thés pendant les gros chagrins. Merci pour ton écoute précieuse. Merci de ne jamais m'avoir amené de Kéfir. Mais par contre, merci de m'avoir amené du riz à la seiche plusieurs fois. Merci pour tellement de choses Maman. Ton soutien est inestimable. Merci **Davy**, t'es relou de jamais répondre des fois. Mais merci d'être là quand même, quand il faut. Merci **Tata**, pour tes petits messages d'encouragements, tes pensées et tes prières (je le sais).

Merci **Mamy** de faire en sorte que notre famille puisse se réunir chaque année, pour qu'on puisse partager des moments ensemble. Ca nous redonne de l'énergie, à tous. Et on sait qu'on est là, les uns pour les autres, merci à vous tous pour ça. Une pensée particulière à **Monique** et **Cathy** qui nous manquent.

À pierre,

Et enfin, the last, but not the least, merci Pierre. Cette période d'écriture à deux, on en gardera un bon souvenir hein ? Parce que les tacos, les burgers, Breaking Bad et Walking Dead, franchement, c'est cool. Merci pour ton soutien à toute épreuve et ta patience (aussi à toute épreuve, d'accord). Merci pour ton écoute, même au réveil, même pour mes rêves. Merci pour les mille sushis, merci de m'avoir toujours laissée les derniers magnum amandes, merci d'essayer encore de m'apprendre à claquer des doigts en rythme, merci pour toutes tes blagues, mais surtout, merci de faire de l'esprit (tu le saiiiiis). Merci d'être venu à cette rando de 7h45, merci de perdre à Mario kart (chut) et au scrabble, merci d'avoir senti quand j'avais besoin de sortir, et merci de m'avoir fait tant de fois changer d'air, au lez, en ville, à Saint Anne pour ce petit cidre que j'aime bien. Merci A ces sorties poubelles-courriers qui nous faisaient aussi voir le jour dans ces journées d'écriture. Merci pour la vaisselle et les pâtes au pesto rouge alors que toi tu préfères le vert (hein ?). Merci pour ce calvaire, hein ? Mais en fait, tout ça pour te dire merci pour ton soutien, sans lequel ces derniers mois de thèse auraient été un peu plus difficiles. Et surtout, merci pour ton Amour.

A Fafa...

Table des matières

<i>Table des figures</i>	12
<i>Index des abréviations</i>	15
INTRODUCTION	17
<i>CHAPITRE I : Organisation anatomique et moléculaire de la moelle spinale</i>	18
I.1 Généralités	18
I.2. La corne dorsale	20
I.2.1 Organisation anatomique et neurochimique.....	20
I.2.1.a Les neurones de projections.....	22
I.2.1.b Les interneurones	23
I.2.2 La corne dorsale : organisation anatomo-fonctionnelle.....	28
I.2.3 Fonctions des neuropeptides au sein de la corne dorsale	30
I.3 La corne ventrale	39
I.3.1 Les interneurones pré-moteurs.....	40
I.3.2 Les motoneurones.....	45
<i>CHAPITRE II : La dopamine et la moelle spinale</i>	48
II.1 Source dopaminergique de la moelle spinale : description du noyau A11.....	49
II.1.1 Caractéristiques des neurones dopaminergiques.....	49
II.1.2 Les noyaux dopaminergiques	51
II.1.3 Évidence du A11 comme source dopaminergique spinale	53
II.1.4 Voie diencéphalospinale : dimorphisme sexuel.....	56
II.1.5 Présence de TH au niveau des DRG : autre source dopaminergique spinale ?	56
II.2 Expression des récepteurs dopaminergiques spinaux.....	58
II.1.2 Généralités sur les récepteurs dopaminergiques.....	58
II.1.2 Distribution des DAR au niveau spinale	58
II.3 Description des circuits spinaux modulés par la dopamine.....	61
II.3.1 La motricité	61
II.3.2 La somatosensation.....	65

II.3.3 Le syndrome des jambes sans repos (SJSR) ou le syndrome d'Ekbohm	67
OBJECTIFS.....	71
MATERIELS ET METHODES	73
I. Animaux.....	74
II. Traitements.....	75
III. Immunofluorescence.....	76
III.1. Immunofluorescence sur coupes.....	76
III.1.1 Préparation des tissus.....	76
III.1.2 Protocole de marquage.....	77
III.2. Immunofluorescence sur organe entier : iDISCO.....	78
III.2.1 Préparation des échantillons.....	78
III.2.2 Protocole iDISCO.....	79
IV. Hybridation in situ fluorescente multiplexée.....	80
IV.1 Préparation des tissus.....	80
IV.2 Protocole	81
V. Acquisition des images et quantification.....	83
VI. Méthodologie RiboTag	84
VI.1 Immunoprecipitation des Polysomes.....	84
VI.2. Synthèse d'ADNc et qRT-PCR.....	85
VII. Injection intraspinale.....	87
VII. Analyse comportementale : Activité locomotrice	88
VII.1 Couloir circulaire	88
VII.2 Rotarod	89
VII.3 Beam walking test.....	89
VII.4 Analyse des empreintes.....	90
RESULTATS.....	91

ETUDE 1.....	92
<i>I. Caractérisation anatomique et moléculaire des cellules spinales exprimant les D2R.....</i>	<i>92</i>
I.1 Distribution des cellules spinales exprimant les D2R.....	92
I.2 Identité des cellules spinales exprimant les D2R.....	96
I.3 Identité moléculaire des neurones spinaux exprimant les D2R.....	98
I.4 Hétérogénéité moléculaire des neurones spinaux exprimant les D2R.....	103
<i>II. Rôle fonctionnel des D2R spinaux du segment lombaire.....</i>	<i>107</i>
II.1 Impact de la délétion des D2R sur l'activité locomotrice spontanée.....	108
II.2 Impact de la délétion des D2R sur la coordination motrice.....	110
II.3 Impact de la délétion des D2R sur la coordination motrice fine.....	112
ETUDE 2.....	115
<i>III. Étude des réseaux neuronaux de la moelle spinale activés par la stimulation de la transmission dopaminergique.....</i>	<i>115</i>
III.1 L'administration systémique de d-amphétamine induit une augmentation du nombre de cellules pS32- cFos au niveau de la moelle spinale.....	116
III.2. Caractérisation moléculaire des cellules pS32-cFos immunoréactives en réponse à l'administration de d-amphétamine.....	118
III.3 Induction de pS32-cFos dans la moelle spinale en réponse à l'administration systémique de cocaïne et méthylphénidate.....	121
III.4 L'augmentation de pS32-cFos dans la moelle spinale en réponse à l'administration systémique de psychostimulants est-elle le reflet d'une hyperactivité locomotrice?.....	124
III.5 Régulation de pS32-cFos au niveau de la moelle spinale en réponse à l'administration d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de dopamine, noradrénaline et sérotonine.....	126
III.6 Rôle des récepteurs D1 et NMDA dans la régulation de pS32-cFos en réponse à l'administration d'amphétamine.....	128
DISCUSSION & PERSPECTIVES	130
<i>I. Hétérogénéité des neurones spinaux exprimant les D2R.....</i>	<i>131</i>

<i>II. Caractérisation fonctionnelle des D2R spinaux.....</i>	<i>133</i>
<i>III. Les neurones dopaminergiques diencéphalospinaux.....</i>	<i>135</i>
<i>IV. Analyse des ensembles neuronaux spinaux activés en réponse à la manipulation de la transmission monoaminergique.....</i>	<i>137</i>
CONCLUSION	144
ANNEXE.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	169

Table des figures

Figure 1 Organisation somatotopique de l'innervation sensorielle de la moelle spinale	20
Figure 2 Organisation anatomo-fonctionnelle des circuits somatosensosensoriels	21
Figure 3 Classification morphologique des interneurons de la lamina II	24
Figure 4 Classification transcriptomique des interneurons de la corne dorsale superficielle	26
Figure 5 Proportions des interneurons inhibiteurs de la corne dorsale superficielle appartenant à différentes populations neurochimiques. D'après Boyle et al., 2017	27
Figure 6 Proportions des interneurons excitateurs de la corne dorsale superficielle appartenant à différentes populations neurochimiques	28
Figure 7 Implication du NPY dans la transmission du message nociceptif	33
Figure 8 Distribution des récepteurs opioïdiques mu et delta au niveau des circuits spinaux D'après (Wang et al., 2018)	35
Figure 9 Action des neurones GABAergiques du RVM sur les neurones Enképhaline-positifs de la corne dorsale : facilitation de la douleur mécanique	36
Figure 10 Implication de la 5-HT dans la modulation de la transmission nociceptive au niveau du SNC	38
Figure 11 Identité génétique, fonction locomotrice et connexions synaptiques des sous-populations d'interneurones ventraux pré-moteurs. D'après Gosgnach et al., 2017	43
Figure 12 Représentation schématique des réseaux locomoteurs spinaux	44
Figure 13 Circuit inter-neuronaux spinaux de la locomotion	47
Figure 14 Représentation schématique de la machinerie enzymatique d'un neurone dopaminergique	50
Figure 15 Distribution des noyaux dopaminergiques au sein du SNC	51
Figure 16 Cellules TH-positives du A11	52
Figure 17 Distribution des récepteurs à la dopamine au niveau lombaire	59
Figure 18 Effets connus de la dopamine sur les composants du circuit moteur	63

Figure 19 Schéma des projections du A11, de leurs interactions avec les circuits spinaux et des conséquences potentiels de leurs dysfonctionnement sur le SJSR.....	69
Figure 20 Protocoles expérimentaux utilisés	76
Figure 21 Distribution des cellules HA au niveau lombaire de la moelle spinale.....	94
Figure 22 Vérification de l'activité du promoteur Cre par injection intra-spinale de virus AAV9-hEF1 α -DIO-XFP-InvCherTF	95
Figure 23 Validation de l'enrichissement du gène Drd2 dans les cellules HA-positives	96
Figure 24 Les cellules D2R de la moelle spinale expriment le marqueur neuronal NeuN.....	97
Figure 25 Les D2R de la moelle spinale ne sont pas exprimés par les cellules gliales	98
Figure 26 Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones excitateurs	99
Figure 27 Les D2R spinaux sont faiblement exprimés par les interneurons excitateurs PKC γ ...	100
Figure 28 Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones inhibiteurs	101
Figure 29 Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones inhibiteurs.....	102
Figure 30 Les D2R ne sont pas exprimés dans les motoneurons	103
Figure 31 Distribution des neurones spinaux exprimant les D2R au sein des neurones identifiés par les protéines liant le calcium.....	104
Figure 32 Distribution des neurones spinaux exprimant les D2R au sein des neurones identifiés par les peptides opioïdiques	106
Figure 33 Stratégie d'inactivation des D2R spinaux du segment lombaire	107
Figure 34 La délétion des D2R au niveau lombaire	109
Figure 35 La délétion des D2R au niveau lombaire n'altère ni la coordination motrice ni l'apprentissage moteur	111
Figure 36 La délétion des D2R au niveau lombaire n'altère pas la coordination motrice fine.	113
Figure 37 Action des psychostimulants sur les neurones monoaminergiques	115
Figure 38 . Cinétique d'induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de d-amphétamine.....	117

Figure 39 Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration intrathécale de <i>d</i> -amphétamine	118
Figure 40 Distribution des cellules pS32-cFos positives au sein des neurones identifiés par les protéines liant le calcium	119
Figure 41 Distribution des cellules pS32-cFos positives au sein des neurones GABAergiques, Glycinergiques.....	121
Figure 42 Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de psychostimulants.....	123
Figure 43 Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de morphine et dizocilpine	125
Figure 44 Induction de pS32-cFos en réponse l'administration d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de monoamines	127
Figure 45 Rôle des récepteurs D1 et NMDA dans la régulation de pS32-cFos en réponse l'administration de <i>d</i> -amphétamine.....	129

Index des abréviations

5-HT , <i>Sérotonine</i>	HA , <i>Hémagglutinine</i>
AACD , <i>Aromatic-L-Amino Décarboxylase</i>	HB9 , <i>Basic Helix-loop-helix domain containing, class B, 9</i>
ALT , <i>Anterolateral Tractus</i>	IaIN , <i>Interneurones Inhibiteurs A</i>
ARNm , <i>ARNmessenger</i>	IML , <i>Inter-Médio-Latérale</i>
ATV , <i>Aire Tegmentale Ventrale</i>	IP , <i>Intra-péritonéale</i>
BO , <i>Bulbe Olfactif</i>	IT , <i>Intrathecal</i>
CB , <i>Calbindine</i>	LCN , <i>Lateral Column Nuclei</i>
CCK , <i>Cholécystokinine</i>	MN , <i>Motoneurons</i>
CGRP , <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>	MOR , <i>Mu Opioid Receptor</i>
LTMR , <i>Low Threshold Mechanoreceptor</i>	NA , <i>Noradrénaline</i>
CPF , <i>Cortex Pré-Frontal</i>	Nacc , <i>Noyaux Accumbens</i>
CPG , <i>Central Pattern Generator</i>	NET , <i>Noradrenergic Transporter</i>
CR , <i>Calrétinine</i>	NK1R , <i>Neurokinin 1 receptor</i>
CR , <i>Cellule de Renshaw</i>	NKB , <i>Neurokinine B</i>
D1R , <i>Récepteur D1 à la dopamine</i>	NMDA , <i>N-méthyl-D-aspartate</i>
D2R , <i>Récepteur D2 à la dopamine</i>	Npff , <i>Neuropeptide FF</i>
D3R , <i>Récepteur D3 à la dopamine</i>	NPY , <i>Neuropeptide Y</i>
D4R , <i>Récepteur D4 à la dopamine</i>	NT , <i>Neurotransmetteur</i>
D5R , <i>Récepteur D5 à la dopamine</i>	NTS , <i>Neurotensine</i>
DA , <i>Dopamine</i>	ORL , <i>Opioid Receptor-Like</i>
DAT , <i>Dopaminergic Transporter</i>	PAG , <i>Periaqueducal Grey</i>
DBH : <i>Dopamine-Beta-Hydroxylase</i>	PKA , <i>Protéine Kinase dépendante de l'AMPC</i>
DC , <i>Dorsal Column</i>	PKC , <i>Protéine Kinase C</i>
DOR , <i>Delta Opiod Receptor</i>	PNTM , <i>Phényléthanolamine N-Méthyltransférase</i>
Dyn , <i>Dynorphine</i>	PSCD , <i>neurone Post-Synaptique de la Colonne Dorsale</i>
Enk , <i>Enképhaline</i>	PV , <i>Parvalbumine</i>
GABA , <i>Gamma Amino Butyric Acid</i>	
Gal , <i>Galanine</i>	
GDB , <i>Ganglion De la Base</i>	
GRP , <i>Gastrin Releasing Peptide</i>	

RCPG, *Récepteur Couplés aux Protéines G*

RVM, *Rostral Ventromedial Medulla*

scRNAseq, *Single Cell RNA sequencing*

SCT, *Tractus Spinocervicothalamique*

SJSR, *Syndrome des Jambes Sans Repos*

SNC, *Système Nerveux Central*

SP, *Substance P*

SST, *Somatostatine*

TH, *Tyrosine Hydroxylase*

Vgat, *Vesicular GABA Transporter*

Vglut, *Vesicular Glutamate Transporter*

VMAT2, *Vesicular Monoamines Transporter2*

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Organisation anatomique et moléculaire de la moelle spinale

I.1 Généralités

La moelle spinale est un relais majeur permettant aux informations sensorielles perçues à la périphérie d'être transférées et intégrées au niveau des structures supra-spinales. La moelle est aussi indispensable à la fonction motrice puisque c'est en son sein que sont hébergés les neurones moteurs recevant les commandes des structures supra-spinales afin de coordonner les mouvements des muscles dans l'espace. La moelle reçoit une très grande variété d'informations correspondant aux différentes modalités somesthésiques tels que le toucher, la perception de la température, la proprioception ou encore la nociception. On parle de *somatosensation*. Toutes ces informations sont générées au niveau des différents organes innervés (la peau, les muscles, les tendons, les viscères) via un panel de différents récepteurs, puis transférées au niveau de la matière grise de la moelle spinale via les ganglions rachidiens dorsaux (DRG). Ces derniers contiennent les corps cellulaires des neurones afférents primaires du système somatosensoriel, ces neurones sont appelés neurones de premier ordre, ou neurones en T, nom issus de leur morphologie particulière pseudo-unipolaire (Tandrup, 1995). En effet, une projection axonale pénètre au niveau des organes sensoriels, et une autre au niveau de la matière grise de la corne dorsale de la moelle spinale. Il s'agit des fibres afférentes primaires ou sensorielles. Cette projection au sein de la moelle se fait de manière très organisée en fonction de la modalité sensorielle et de la région du corps innervé. On parle de *somatotopie* (Figure 1).

La matière blanche de la moelle spinale est constituée de cellules gliales et de fibres nerveuses. À l'inverse, la matière grise est principalement composée de corps cellulaires. Celle-ci est organisée en dix couches cellulaires différentes appelées laminae. Ces dernières ont d'abord été décrites chez le chat par Bror Rexed en 1952 (Rexed, 1952) et n'ont été validées que plus tard dans d'autres espèces telles que la souris et l'Homme. Les laminae (ou couches de Rexed), segmentent la moelle en trois différentes parties : la **corne dorsale** (laminae I à VI), la **corne ventrale** (laminae VIII et IX), et la **corne intermédiaire** (lamina VII et le canal central; la lamina X) (Figure 1). Pour la suite du manuscrit, nous considérerons les laminae VII et X comme appartenant à la corne ventrale. La délimitation de chacune de ces couches a été réalisée selon une étude cytoarchitecturale incluant des critères morphologiques de taille et de densité des corps cellulaires (Rexed, 1952). Nous rentrerons dans les détails de cette organisation au cours de ce chapitre.

La moelle spinale est capable de recevoir et de transférer beaucoup d'informations différentes. Elle est donc constituée de réseaux complexes de circuits excitateurs et inhibiteurs, formés par une grande diversité de neurones. Ces derniers diffèrent tant dans leurs propriétés morphologiques, neurochimiques, qu'électrophysiologiques. Il est donc évident qu'une organisation spatiale bien précise est nécessaire pour ordonner les différents types de messages arrivant au niveau de la moelle spinale. Ce premier chapitre d'introduction parlera dans un premier temps de l'organisation anatomique et neurochimique de la corne dorsale ainsi que de la fonction des neuropeptides. Dans un deuxième temps j'introduirai l'organisation anatomo-fonctionnelle de la corne ventrale.

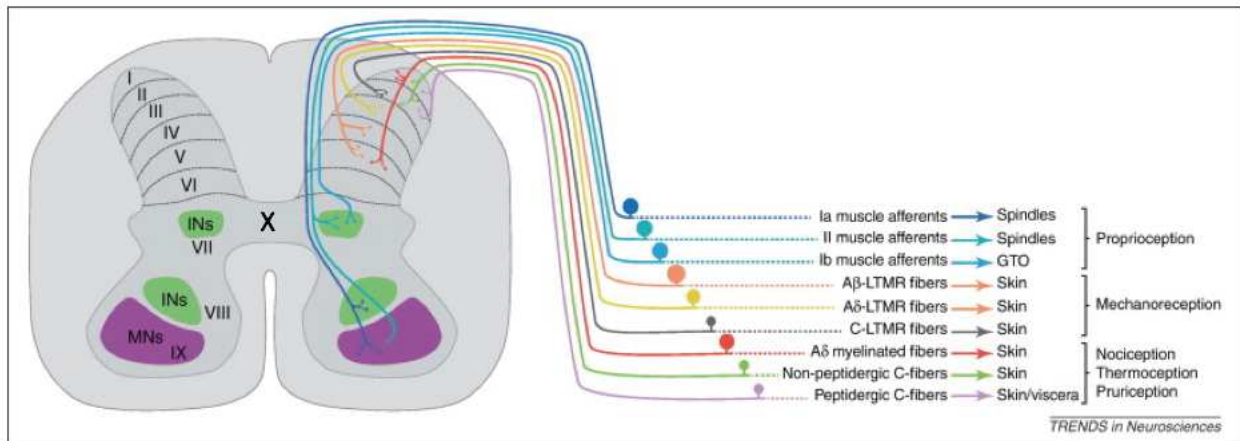


Figure 1 | Organisation somatotopique de l'innervation sensorielle de la moelle spinale

Représentation des afférences sensorielles des neurones primaires arrivant au sein des différentes laminae en fonction de l'information transmise. D'après (Lallemend and Ernfors, 2012)

1.2. La corne dorsale

1.2.1 Organisation anatomique et neurochimique

Les afférences primaires portant les informations sensorielles vont arriver au niveau de la corne dorsale. Comme cité précédemment, la corne dorsale est composée des laminae I à VI. Les laminae I à III définissent les couches superficielles. La lamina II peut être sous divisée en deux parties : la couche II interne (Ili) et la couche II externe (Ile). Cette division anatomique et fonctionnelle est due à l'innervation différentielle des types de neurones périphériques sensoriels ainsi qu'à la transition entre la zone de la corne dorsale recevant des informations tactiles douloureuses et celle recevant des informations non douloureuses. Les laminae IV à VI représentent les couches profondes. En fonction du

message à transmettre, les fibres nerveuses périphériques vont innervé différentes laminae, organisant ces couches de la corne dorsales de façon fonctionnelle (Figure 2). Les afférences primaires peuvent être sous-divisées en plusieurs sous catégories, en fonction de la vitesse de conduction des fibres et de leurs réponses à un stimulus donné. Trois sous catégories existent : les fibres de gros calibre myélinisés A β impliquées dans le toucher (on parle de mécanoception) et dans la proprioception, ainsi que les fibres de plus petit calibre A δ et C impliquées dans la thermoception et la nociception. Les fibres A δ et C innervent les couches superficielles, principalement au niveau des laminae I et II. Les fibres A β , quant à elle, projettent au niveau des couches profondes de la corne dorsale, mais envoient aussi des collatérales vers le tronc cérébral (au niveau des noyaux gracile et cunéiforme, qui forment un relais entre les neurones de premier ordre et ceux de second ordre de la voie ascendante de la perception tactile).

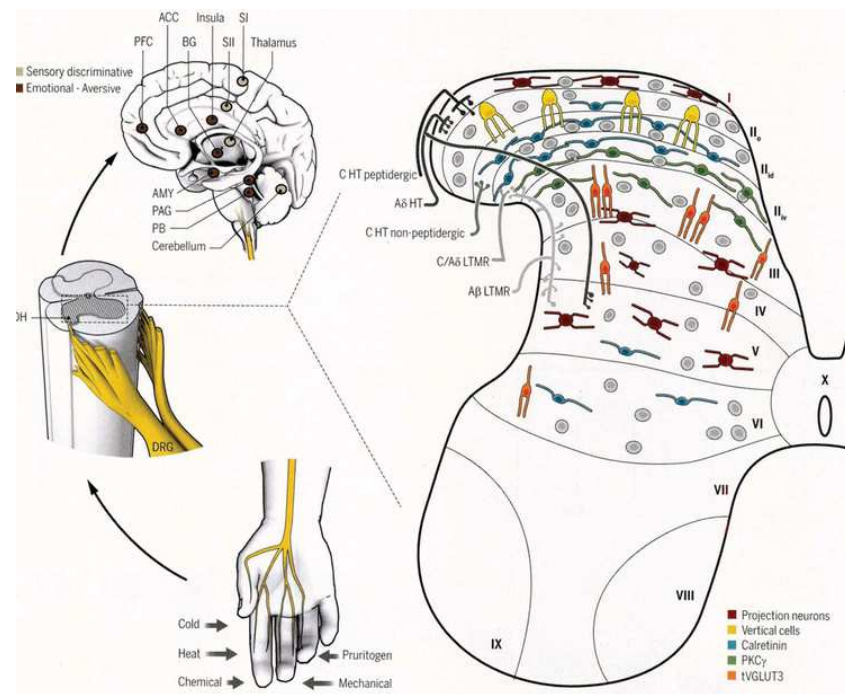


Figure 2 | Organisation anatomo-fonctionnelle des circuits somatosensibles

D'après (Peirs and Seal, 2016)

La grande diversité d'informations de la corne dorsale est relayée via un réseau complexe d'interneurones locaux contactant les neurones de projection (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). Il est communément accepté que deux grandes classes de neurones se trouvent au niveau de la corne dorsale : les neurones de projection, dont les axones iront contacter des cibles supra-spinales (citées par la suite) et qui sont donc nécessaires à la transmission de l'information vers les structures corticales ainsi que les interneurones dont les axones projettent au sein même de la moelle spinale.

1.2.1.a Les neurones de projections

Les neurones de projection ne représentent qu'une faible portion des neurones de la corne dorsale, soit, moins de 1 %. Cependant, ils sont indispensables à la transmission du message somatosensoriel vers les centres supra-spinaux, où il sera traité. Les neurones de projection sont des neurones avec des collatérales, et ont donc plusieurs cibles. Il existe différentes classes de neurones de projection définies en fonction de leurs cibles supra-spinales :

- Les neurones du tract antérolatérale **ALT**, correspondant à la voie spino-thalamique. La majorité de ces neurones de projection sont concentrés au niveau de la couche I, mais quelques autres sont dispersés au niveau des couches III, IV, V et VI. Ils conduisent les informations nociceptive et thermoceptive au niveau des structures sous-corticales suivantes : le thalamus, la substance grise périaqueducale (PAG), l'aire parabrachiale latérale et enfin, la formation réticulée. Ces neurones de projection sont glutamatergiques et expriment NK1R, (récepteur à la substance P (SP)) (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). Les neurones du tract ALT (NK1R-positifs) représentent 80% des neurones de projection (Yu et al., 1999, 2005).

- Les neurones post-synaptiques de la colonne dorsale ou **PSDC** (*Post-Synaptic Dorsal Column*). Le prolongement axonal de ces neurones va contacter les neurones dit de « second ordre » du noyau de la colonne dorsale (DCN *pour Dorsal Column Nuclei*). L'information sera ensuite transmise au niveau du thalamus via les neurones du troisième ordre et enfin, vers le cortex somatosensoriel.
- Les neurones du tract spinocervicothalamique ou **SCT**. Les axones des neurones du tract SCT feront un premier relais au niveau du noyau de la colonne latérale (LCN) avant de croiser la ligne médiane pour contacter les neurones du thalamus.

Les neurones de projection PSDC et SCT sont localisés au niveau des couches III et V. Ils sont principalement sollicités pour conduire les informations tactiles non nocives au niveau du rhombencéphale.

1.2.1.b Les interneurones

Les interneurones jouent un rôle crucial dans l'intégration sensorimotrice. La grande majorité des neurones des couches superficielles de la corne dorsale sont des interneurones. En effet, ils représentent 100 % des neurones de la couche II et entre 90 et 95 % des neurones de la couche I (Gutierrez-Mecinas et al., 2016; Spike et al., 2003). Beaucoup d'études visent à classer les interneurones de la corne dorsale. Différentes approches ont été mises en œuvre, la plus ancienne étant la caractérisation morphologique, se basant sur la forme de l'arbre dendritique ainsi que sur la localisation au sein de la lamina II (Grudt and Perl, 2002). De cette façon, quatre classes d'interneurones majeures de la corne dorsale, s'étendant sur l'axe rostro-caudal, ont été identifiées chez le hamster (Grudt and Perl, 2002) (Figure 3) :

- les cellules en îlot (*islet cell*)

- les cellules verticales
- les cellules radiales
- les cellules centrales

Cette caractérisation a été plus tard confirmée chez le rat (Yasaka et al., 2007). L'aspect fonctionnel a pu être corrélé aux morphologies de ces populations ; en effet, les cellules en îlot regroupent les interneurones inhibiteurs alors que les cellules verticales et radiales regroupent les interneurones excitateurs (Todd, 2017). Enfin, les cellules centrales regroupent aussi bien des interneurones inhibiteurs qu'excitateurs (Todd, 2017) indiquant que la classification morphologique ne tient pas entièrement compte de la diversité fonctionnelle de ces interneurones. La corrélation entre cette caractérisation morphologique et l'aspect fonctionnelle n'est ainsi pas clairement établie, ce qui représente une limite à cette approche. De plus, cette caractérisation ne considère que les interneurones de la lamina II. Enfin, il s'avère que 20 à 25% des neurones restent non identifiés car leur morphologie ne correspond à aucun des quatre groupes précédemment cités (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2007).

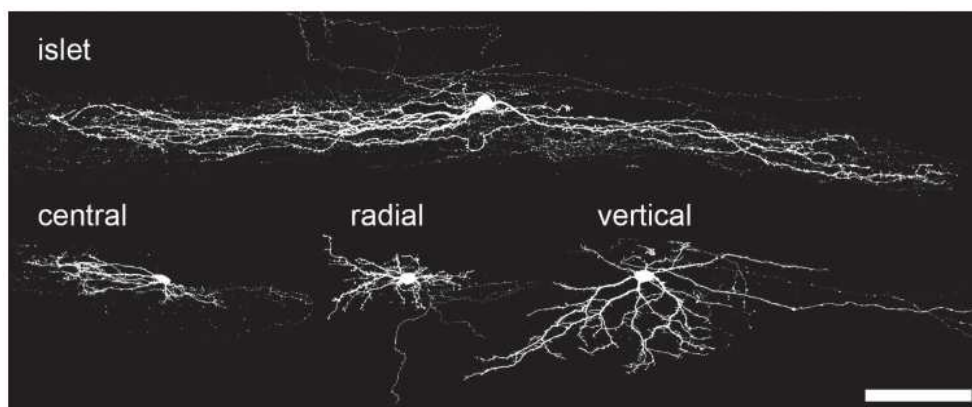


Figure 3 | Classification morphologique des interneurones de la lamina II

Images prises en microscopie confocale montrant les corps cellulaires et les prolongements des quatre classes d'interneurones de la lamina II issues de tranches parasagittales d'une moelle spinale de rat. D'après (Todd, 2017)

Pour identifier des sous-populations fonctionnelles distinctes et spécifiques d'interneurones, une autre approche est largement utilisée : l'approche neurochimique. Celle-ci se base sur la classification de deux grandes familles d'interneurones : les inhibiteurs (utilisant le GABA et/ou la glycine comme principal(aux) neurotransmetteur(s)) et les excitateurs (glutamatergiques). En effet, il existe plusieurs peptides et protéines qui sont exprimés par des sous-types d'interneurones au niveau des laminae I, II et III et qui sont utilisés comme marqueurs de sous-populations.

Enfin, plus récemment, l'approche transcriptomique par scRNAseq (*single cell RNAsequencing*) a permis de raffiner encore d'avantage la diversité des interneurones. Il avait déjà été décrit précédemment par des techniques d'hybridation in situ que les interneurones de la corne dorsale exprimaient les transporteurs vésiculaires du glutamate Vglut2 (*slc17a6*) et du GABA Vgat (*slc32a1*). Avec l'analyse scRNAseq des neurones de souris Vglut2^{GFP} et Vgat^{tdtomato}, il est désormais possible de caractériser de nouveaux sous-groupes sur la base de leurs profils transcriptomique, la moitié étant GABAergique, l'autre étant glutamatergique (Häring et al., 2018) (Figure 4).

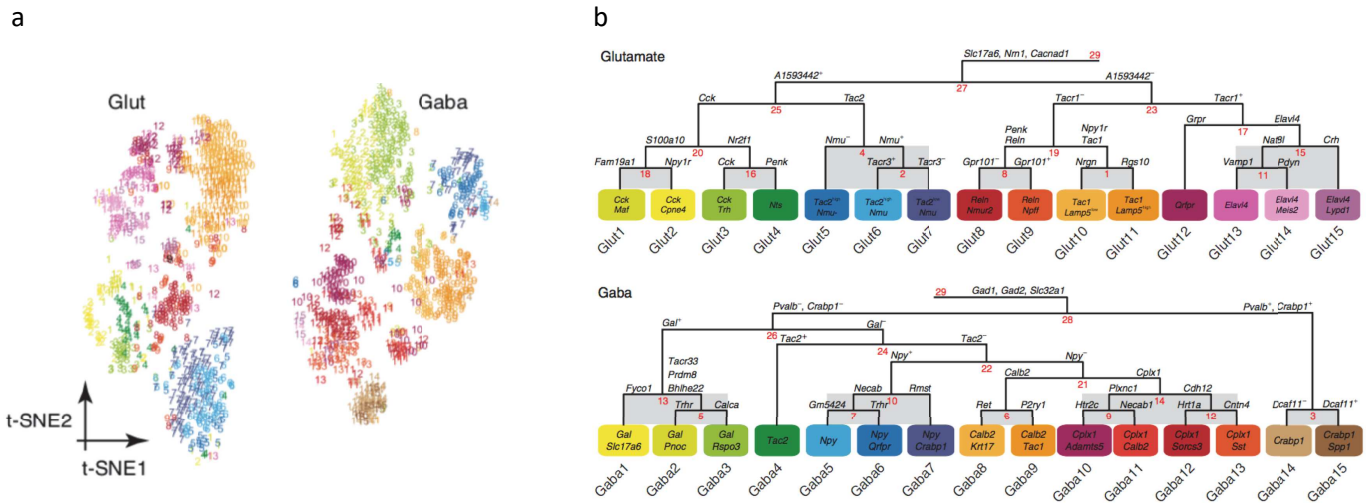


Figure 4 | Classification transcriptomique des interneurones de la corne dorsale superficielle

(a) Analyse de scRNAseq après dissociation et tri par FACS des cellules de la corne dorsale de souris $Vgat^{tdtomato}$ et $Vglut2^{GFP}$. (b) Représentation hiérarchique des différents types neuronaux en fonction de l'expression des différents gènes. La partie du haut représente les 15 classes d'interneurones glutamatergiques, la partie du bas représente les 15 classes d'interneurones GABAergiques D'après (Häring et al., 2018)

- **Les interneurones inhibiteurs (Figure 5)**

Les interneurones inhibiteurs sont distribués uniformément entre les laminae I, II et III. Ils représentent 26 % des neurones des couches I et II et 38 % des neurones de la couche III (Polgár et al., 2013a). Les interneurones glycinergiques représentent 90% des interneurones inhibiteurs des couches profondes III à VI contre 20% dans les laminae superficielles I et II (Foster et al., 2015; Todd, 2017). Cependant, il est établi que la co-libération des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et glycine existe au niveau des couches I, II et III (Todd and Sullivan, 1990). La majorité des interneurones glycine-positifs co-expriment le GABA.

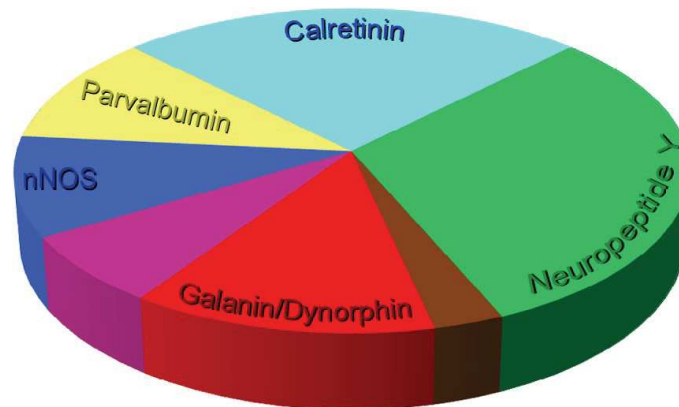


Figure 5 | Proportions des interneurons inhibiteurs de la corne dorsale superficielle appartenant à différentes populations neurochimiques.

La section en violet représente la population co-exprimant les marqueurs nNos et galanine/dynorphine. La section en marron représente la population co-exprimant les marqueurs galanine/dynorphine et le neuropeptide Y (NPY). D'après Boyle et al., 2017

- **Les interneurons excitateurs** (Figure 6)

Contrairement au cortex cérébral, il existe des interneurons excitateurs au niveau de la moelle spinale. Ceux-ci contribuent à l'intégration des informations sensorielles. Ces interneurons sont tous glutamatergiques et correspondent à la majorité des neurones de la corne dorsale soit environ 75 % de tous les neurones des couches I et II et environ 60% de ceux de la couche III (Polgár et al., 2013b; Yasaka et al., 2010). On a longtemps considéré un interneurone comme excitateur lorsqu'il n'exprimait ni le GABA ni la glycine. Il a ensuite été mis en évidence que l'utilisation du transporteur du glutamate Vglut2 pouvait être utilisé comme marqueur de neurones excitateurs au niveau de la corne dorsale de la moelle spinale (Todd et al., 2003).

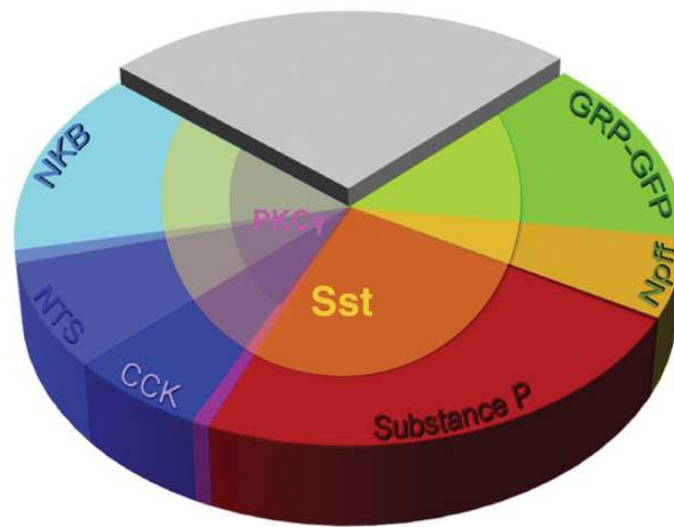


Figure 6 | Proportions des interneurons excitateurs de la corne dorsale superficielle appartenant à différentes populations neurochimiques

NKB : Neurokinin B ; NTS : Neurotensine ; SST : Somatostatine ; Npff :Neuropeptide FF ; GRP : Gastrin-Releasing Peptide. D'après Gutierrez-Mecinas et al., 2019

1.2.2 La corne dorsale : organisation anatomo-fonctionnelle

Comme mentionné précédemment, l'approche neurochimique a permis de définir certains marqueurs de sous-populations d'interneurones inhibiteurs et excitateurs au niveau de la corne dorsale superficielle. Les détails de ces marqueurs sont répertoriés dans le tableau 1. Il est important de noter que certains marqueurs sont exclusivement restreints à une population d'interneurones, c'est le cas pour le neuropeptide Y (NPY) ou la galanine par exemple, exprimés seulement dans les interneurones inhibiteurs (GABAergiques et/ou glycinergiques). C'est également le cas pour la neurotensine (NTS), la somatostatine (SST) et la neurokinine B (NKB), exclusivement exprimés dans les interneurones excitateurs (glutamatergiques). A l'inverse, d'autres marqueurs tels que les opioïdes endogènes (enképhaline et dynorphine) sont exprimés dans ces deux familles, bien qu'il existe très

souvent une expression préférentielle entre l'une des deux familles (François et al., 2017a; Sardella et al., 2011). Il est également possible que certains marqueurs définissant des populations co-localisent entre eux, c'est le cas par exemple de la calrétinine et de la PKC γ .

Marqueurs	NT	Types	Laminae	Fonction(s)
NPY	GABA/glycine	interneurones	I-II-III	-Effet anti-nociceptif
Gal/Dyn	GABA/glycine	Interneurones	I-II	-Inhibition de la démangeaison -Inhibition de l'information nociceptive mécanique
nNos	GABA/glycine glutamate	interneurones	I-II	-Inhibition de l'information nociceptive mécanique
PV	GABA glutamate	Interneurones	I-II-III	-Inhibition de l'information afférente tactile
CR	GABA/glycine glutamate	Interneurones	I-II	- Modulation de sensations légères -Détection de stimuli mécaniques douloureux - Pas d'effet sur l'allodynie mécanique après lésion du nerf
SP	glutamate	Interneurones	I – IIe	-Transmission de l'information sensorielle nociceptive et de démangeaison
Enképhaline	glutamate GABA	Interneurones	I-II	-Modulation de l'information mécanique nociceptive
Dyn	glutamate	Interneurones	I-II	- Inhibition de la démangeaison -Inhibition de l'information nociceptive mécanique
PKC γ	glutamate GABA/glycine	Interneurones	III-III	-Transmission de l'information tactile des fibres C-LTMR vers les neurones de projections de la lamina I. -Rôle dans la perception de la douleur neuropathique et l'allodynie tactile
NKB	glutamate	Interneurones	III-III	- Modulation des informations nociceptives
NTS	glutamate	Interneurones	III-III	- Modulation des information nociceptives

CB	glutamate	Interneurones	I-II	-Perception de la douleur
SST	glutamate & GABA/glycine	Interneurones	I – II & III-IV	-Transmission de l'information nociceptive mécanique
NPFF	glutamate	Interneurones	I-II	- effet anti-nociceptif -Transmission de l'information nociceptive et de démangeaison
Ror α	glutamate	Interneurones	III-III	-Transmission de l'information tactile légère émanant de stimuli non nocifs -Important dans le rétrocontrôle permettant la correction du mouvement moteur
Ror β	GABA-glutamate	Interneurones	III-III-IV	-Participe au rétrocontrôle du circuit moteur
CCK	glutamate	Interneurones	III-III	-Participe à la réduction de l'effet anti-nociceptif des opioïdes -Perception de stimuli tactile -Impliqué dans allodynie mécanique due à une douleur neuropathique
VGLUT3	glutamate	interneurones	III-IV	-Implication dans l'allodynie mécanique -Perception des stimuli tactiles
NK1R	glutamate	Neurones de projection	I (III-IV-V)	Neurone envoyant les informations nociceptives par la voie du tractus ATL

TABLEAU 1 | Tableau répertoriant les marqueurs majeurs et la fonction associée des neurones de la corne dorsale de la moelle spinale.

Lorsque le neurotransmetteur (NT) est en gras, cela signifie qu'il s'agit du NT principalement utilisé par le neurone.

1.2.3 Fonctions des neuropeptides au sein de la corne dorsale

L'activité des interneurones de la corne dorsale est principalement modulée par le glutamate, le GABA et la glycine. Cependant, les neuropeptides sont aussi des éléments

essentiels participant à la transmission et à la modulation des informations sensorimotrices (Todd, 2017). Dans ce paragraphe seront présentés d'une part des neuropeptides participant majoritairement à la transmission de l'information (SP, CGRP, NPY et SST) et d'autre part des neuropeptides ainsi que des monoamines participants plutôt à la modulation de l'information (Sérotonine, opioïdes, dopamine).

- **Transmission de l'information**

Certains neuropeptides agissent sur plusieurs des réseaux spinaux permettant la transmission des informations sensorielles. Comme déjà mentionné, c'est au niveau des ganglions rachidiens dorsaux (DRG pour dorsal root ganglia) que se trouvent les neurones sensoriels primaires (Basbaum et al., 2009; Delmas et al., 2011), transmettant l'information de la périphérie au niveau de la corne dorsale. Au sein de ces DRG, la grande majorité des neurones sont glutamatergiques (Broman et al., 1993; Yoshimura and Jessell, 1989). On retrouve deux classes de neurones primaires sensoriels : les peptidergiques et les non-peptidergiques. Les neurones sensoriels primaires peptidergiques expriment le **CGRP** (*Calcitonin gene-related peptide*) (Gibson et al., 1984 ; Chung et al., 1988) ainsi que la **SP** (substance P). Ces deux peptides sont impliqués dans l'initiation du processus d'inflammation ainsi que dans la transmission du message de démangeaison et de nociception (Dickie et al., 2019; St John Smith et al., 2010).

Il existe deux autres peptides largement étudiés et impliqués dans la transmission de l'information sensorielle : le **NPY** et la **SST**.

Les neurones **NPY**-positifs se situent au niveau des laminae superficielles. Ils sont activés par des stimuli mécaniques nociceptifs et de démangeaison (Lai et al., 2016). Ces neurones sont majoritairement contactés par les fibre A δ et A β LTMRs et envoient leurs

projections au niveau des neurones de la voie ascendante spino-thalamique ainsi qu'au niveau des neurones PKC γ (Sardella et al., 2011). Comme mentionné dans le tableau 1, les neurones NPY sont des interneurones inhibiteurs. Les récepteurs au NPY sont présents sur les neurones primaires CGPR-positifs, leur conférant un rôle dans la transmission de l'information de démangeaison et de nociception. Notons que l'action anti-nociceptive du NPY pourrait passer par l'inhibition de la SP. En effet, les modèles animaux de douleur inflammatoire présentent une augmentation de l'expression des récepteurs Y1R au NPY. Une injection intrathécale (IT) de NPY cause l'internalisation des récepteurs NK1R et donc, une diminution de l'action de la SP (Taylor et al., 2014). Ce rôle analgésique évident du NPY a été mis en avant de différentes manières. L'administration IT de NPY entraîne une analgésie après une stimulation thermique (Hua et al., 1991). L'administration centrale de NPY est quant à elle, capable de réduire la douleur dans différents modèles de douleur chronique (Intondi et al., 2008; Solway et al., 2011). De plus, un animal déficient pour le NPY présente une allodynie (sensation de douleur induite normalement par un stimulus indolore) mécanique et thermique avant ou après induction de douleur chronique (par lésion périphérique) indiquant que le NPY joue un rôle permanent dans la suppression de l'allodynie due à la douleur chronique (Solway et al., 2011) (Figure 7)

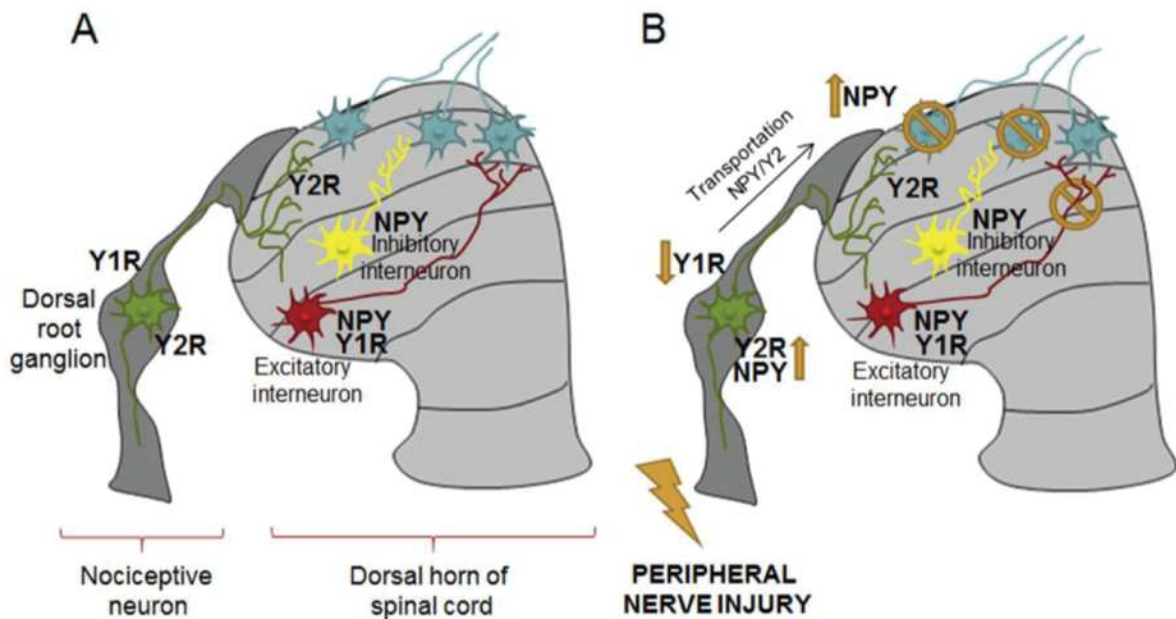


Figure 7 | Implication du NPY dans la transmission du message nociceptif

En rouge : interneurons excitateurs. En jaune : interneurons inhibiteurs. En bleu : Tractus spino-thalamique. A. Distribution du NPY et de ses récepteurs Y1R et Y2R au niveau de la corne dorsale de la moelle spinale et des DRG. En condition physiologique (A) vs condition pathologique (B) après lésion du nerf périphérique. Diminution des Y1R et augmentation des Y2R au niveau des DRG. Augmentation de NPY au niveau de la corne dorsale. Inhibition des afférences primaires par l'activation de Y2R et inhibition des interneurons excitateurs par Y1R. D'après (Diaz-delCastillo et al., 2018)

Concernant la **SST**, elle est exprimée dans 60% des interneurons excitateurs de la corne dorsale superficielle (Gutierrez-Mecinas et al., 2016). Les neurones SST-positifs jouent un rôle important dans la transmission de l'information tactile et nociceptive. Les fibres nociceptives A δ et C contactent les neurones SST-positifs au niveau des laminae IIe. Par ailleurs, les fibres portant l'information mécanique A β contactent les neurones SST-positifs des laminae Ili et III (Abraira et al., 2017; Peirs et al., 2015). La stimulation de ces neurones induit une allodynie mécanique et l'ablation de ces neurones ne joue pas sur la

perception tactile mais entraîne une perte de la nociception mécanique aiguë (Duan et al., 2014).

- **Modulation de l'information**

Il existe trois systèmes descendants neuromodulateurs : sérotoninergique (provenant du noyau de Raphé) noradrénergique, (provenant du Locus Coeruleus), et dopaminergique (provenant du noyau A11). Ces trois systèmes sont connus pour moduler les afférences et les circuits nociceptifs de la corne dorsale. En plus de ces voies descendantes, au sein de la moelle spinale, le système opioïdique est lui aussi capable de moduler les informations sensorielles qui seront envoyées aux centres supra-spinaux.

Le **système opioïdique** spinal est connu pour jouer un rôle important dans la modulation de la douleur. En effet les opioïdes sont largement utilisés pour traiter les douleurs chroniques, du fait de leur effet analgésique. Il existe 4 familles d'opioïdes : les β -endorphines, les enképhalines, les dynorphines, et la nociceptine/orphanine. Ils peuvent se lier sur 4 types de récepteurs ; mu, delta, kappa, (MOR, DOR, KOR, respectivement) et ORL (Opioid Receptor-Like). Ces récepteurs sont exprimés différemment au niveau des interneurons et neurones de projection de la corne dorsale ainsi qu'au niveau des afférences sensorielles primaires (Figure 8) (Wang et al., 2018).

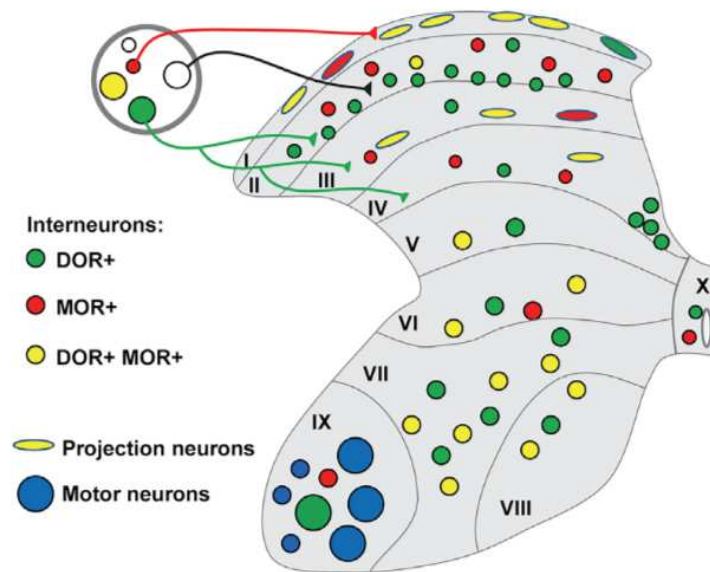


Figure 8 | Distribution des récepteurs opioïdiques mu et delta au niveau des circuits spinaux D'après (Wang et al., 2018)

Le système endogène opioïdique régule la nociception en modulant l'excitabilité et la neurotransmission au niveau de la moelle spinale et au niveau du RVM (Rostral Ventromedial Medulla) (Basbaum et al., 1976; Heinricher et al., 2009). Le RVM est une structure du rhombencéphale impliquée dans le contrôle descendant de la douleur. Les axones des neurones du RVM innervent fortement la corne dorsale, où les informations nociceptives arrivent. Certains opiacés, comme la morphine, peuvent agir au niveau des MOR exprimés sur des neurones du RVM pour réduire la facilitation à la douleur. Ces opioïdes agissent également via les MOR et DOR des DRG pour réduire la nociception. Un des opioïdes endogènes très étudié pour comprendre les mécanismes de modulation nociceptif est l'enképhaline du fait de sa haute affinité pour les MOR et DOR (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002). Les neurones enképhaline-positifs de la corne dorsale sont largement innervés par les afférences primaires, ainsi que par les neurones

GABAergiques du RVM (François et al., 2017b). L'activation des neurones enképhaline-positifs par optogénétique entraîne une co-libération d'enképhaline et de GABA qui diminue la transmission des neurones sensoriels primaires au niveau de la corne dorsale. Cet effet inhibiteur pré-synaptique se fait via les DOR et entraîne une réduction de la nociception mécanique (François et al., 2017b). En recevant des informations des afférences primaires ainsi que des projections inhibitrices du RVM, les neurones GABAergiques enképhalines-positifs de la corne dorsale sont impliqués dans une balance entre facilitation et réduction de la nociception mécanique (Figure 9).

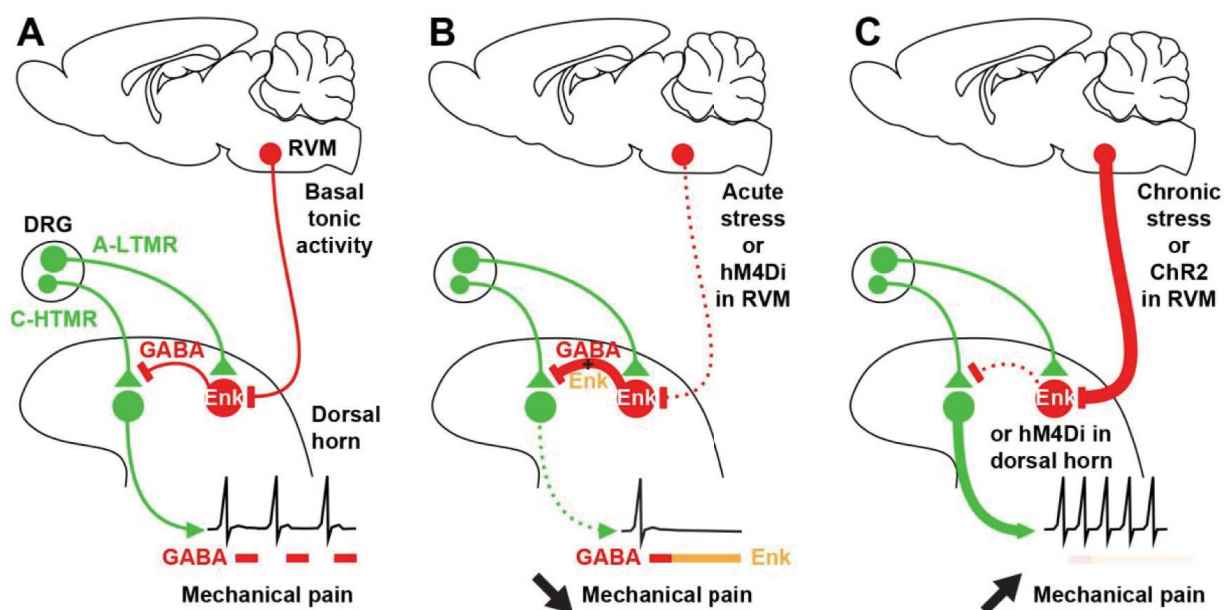


Figure 9 | Action des neurones GABAergiques du RVM sur les neurones Enképhaline-positifs de la corne dorsale : facilitation de la douleur mécanique

(a) Innervation basale des neurones GABAergiques Enk-positifs par les neurones GABAergiques du RVM. (b) Absence ou diminution de cette innervation par stress aigu ou DREADD inhibiteurs. (c) Sur-activation de cette innervation par stress chronique ou optogénétique. D'après (François et al., 2017b)

La **sérotonine (5-HT)** module principalement la composante nociceptive. Elle peut être libérée par des tissus endommagés et agir au niveau périphérique. Ainsi, l'activation de ses récepteurs présents au niveau des fibres sensorielles (fibres C) a un effet pronociceptif. À l'inverse, au niveau du SNC, les mécanismes d'action de la 5-HT sont plus complexes. Une faible dose de 5-HT administrée directement dans la moelle (IT) a un effet anti-nociceptif chez le rat ayant reçu une injection intra-plantaire de formaline (douleur aiguë). À l'inverse, une forte dose de 5-HT administrée en IT a un effet pronociceptif sur ce même modèle de douleur aiguë (Kayserl et al., 2011) Ces effets opposés peuvent être dus à la grande diversité des récepteurs à la 5-HT. Il existe 7 types de récepteurs (5-HT₁ à 7) et au moins 15 sous types (Hannon and Hoyer, 2008). Par exemple, l'activation du récepteur 5HT_{1A} entraîne une inhibition de la cellule alors que l'activation des récepteurs 5-HT_{2,3,7A} entraîne une excitation de la cellule (Dogrul et al., 2009; Sasaki et al., 2006). Par ailleurs, les effets opposés de la 5-HT peuvent aussi être liés à l'état de douleur (absente, aiguë, chronique) de l'animal. Par exemple, l'activation du récepteur 5-HT₇ a un effet pronociceptif chez un modèle de rat sain mais peut diminuer l'hyperalgésie (douleur anormalement amplifiée suite à un stimulus nociceptif) dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat (Bardin et al., 2000; Dogrul et al., 2009; Jeong et al., 2004; Sommer, 2004). Les voies descendantes sérotoninergiques peuvent donc avoir une influence inhibitrice ou facilitatrice sur la transmission du message nociceptif (Figure 10).

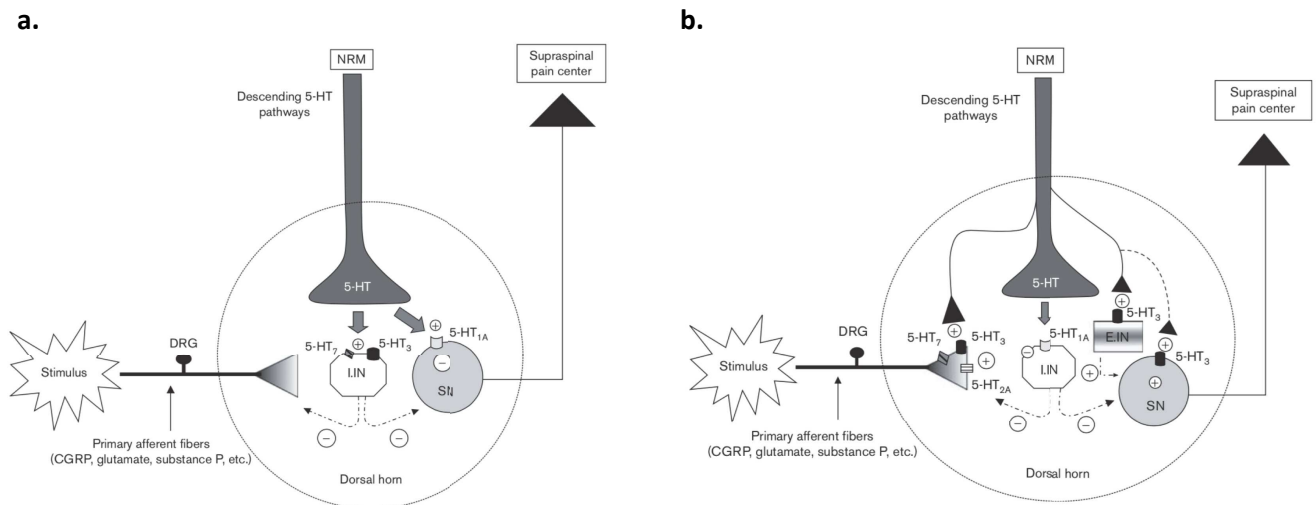


Figure 10| Implication de la 5-HT dans la modulation de la transmission nociceptive au niveau du SNC

a. Représentation schématique de l'influence inhibitrice de la voie descendante sérotoninergique au niveau de la corne dorsale. **b.** Influence excitatrice de la voie descendante sérotoninergique au niveau de la corne dorsale. D'après (Bardin, 2011)

La **noradrénaline (NA)**, dont la source spinale principale est le locus coeruleus (noyau A6) (Bajic and Proudfit, 1999), est libérée par les voies descendantes et joue un rôle modulateur anti-nociceptif via ses récepteurs $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Budai et al., 1998; Eisenach et al., 1998; Gassner et al., 2009). En effet la NA, via son récepteur $\alpha 2$ peut agir en inhibant les neurones de projection (Sonohata et al., 2004) ou bien en diminuant la libération des neurotransmetteurs excitateurs des fibres afférentes primaires (Ueda et al., 1995). Le récepteur $\alpha 1$, quant à lui, se trouve sur les interneurones GABAergiques, son activation mène donc au renforcement de l'inhibition du circuit de la douleur, menant à un effet analgésique (Baba et al., 2000).

Enfin, c'est dans le deuxième chapitre de cette introduction que les effets de la **dopamine (DA)** seront évoqués (*Section II.3*).

Pour conclure, toutes ces informations révèlent le grand niveau de complexité avec lequel la corne dorsale de la moelle spinale est organisée. Beaucoup d'approches moléculaires sont utilisées visant à éclaircir l'organisation des populations et sous-populations de la moelle. La transcriptomique avec le scRNAseq, a récemment permis d'affiner encore d'avantage la connaissance de l'hétérogénéité neuronale, notamment dans la ségrégation des deux populations d'interneurones excitateurs vs inhibiteurs. Cependant, il est encore difficile de faire la corrélation entre l'identité des différents types cellulaires et l'aspect fonctionnel. Une cartographie de la sorte reste à établir de façon à mieux comprendre les circuits spinaux et leur composition.

I.3 La corne ventrale

L'étude de la corne ventrale chez les vertébrés est très souvent associée à l'étude des circuits moteurs. En effet, c'est au niveau de la corne ventrale que les commandes motrices vont s'effectuer, via l'action de divers réseaux d'interneurones pré-moteurs et des motoneurones dont les axones vont innover les muscles. La locomotion est basée sur la régulation de trois aspects majeurs :

- La génération d'un rythme
- La coordination droite-gauche
- La coordination flexion-extension

Les réseaux locomoteurs spinaux permettant ce contrôle sont regroupés en ce que l'on appelle le **CPG** (*Central Pattern Generator*). Il s'agit des circuits neuronaux ayant la capacité de générer une activité motrice rythmée répétée telles que la marche ou la nage, en présence ou en l'absence de commandes supra-spinales (Marder and Bucher, 2001, 2007). Les CPG sont localisés au niveau de la corne ventrale (notamment au niveau de la lamina VIII) (Kiehn, 2016), principalement distribués le long des segments lombaires et cervicaux, contrôlant ainsi les membres postérieurs et inférieurs, respectivement (Kiehn, 2006). Chez les rongeurs, on retrouve également le CPG contrôlant les membres postérieurs au niveau des segments thoraciques les plus caudaux. Il existe un gradient de la distribution rostro-caudal des CPG qui se traduit par une capacité rythmogénétique différente, avec une plus grande capacité au niveau rostral qu'au niveau caudal. Ce gradient rostro-caudal est aussi retrouvé chez d'autres vertébrés tels que le poulet ou la tortue (Kiehn, 2006). Les CPG s'organisent en réseaux neuronaux complexes formés d'interneurones et de motoneurones. Ce sont les interneurones pré-moteurs qui moduleront les motoneurones pour envoyer une information motrice adéquate aux muscles.

1.3.1 Les interneurones pré-moteurs

Les interneurones pré-moteurs de la corne ventrale peuvent être divisés en populations génétiquement distinctes, en fonction de l'expression de certains facteurs de transcription (cités dans la figure 9). Ainsi, quatre classes majeurs d'interneurones ont été identifiées : V0, V1, V2 et V3. Il est aussi possible de regrouper ces différentes classes d'interneurones en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles, ainsi il existe les interneurones ipsilatéraux et les interneurones controlatéraux.

1.3.1.a Les interneurones ipsilatéraux

Les interneurones ipsilatéraux correspondent aux interneurones dont les prolongements iront contacter les motoneurones du même côté. Cette population neuronale a été identifiée comme étant impliquée dans la coordination flexion-extension (Kiehn, 2006).

La première population génétiquement identifiée dans les neurones ipsilatéraux est la **classe V1**, en 1997 (Burrill et al.). Ces interneurones sont inhibiteurs (Li et al., 2014) et forment une classe hétérogène. En effet, on y retrouve les cellules de Renshaws (CR) et les interneurones Ia (IaIN) (Stam et al., 2012). Ces deux types cellulaires sont actifs pendant la locomotion (McCrea et al., 1980; Noga et al., 1987; Pratt and Jordan, 1980). Plus récemment, 18 sous types d'interneurones V1 ont été identifiés par l'expression de facteurs de transcription (Bikoff et al., 2016). En plus d'être impliqués dans la coordination flexion-extension, les interneurones V1 régulent aussi la fréquence locomotrice (Gosgnach et al., 2006).

La deuxième classe d'interneurones ipsilatéraux est la **classe V2**. Celle-ci est divisée en deux sous classes : les interneurones V2a, qui sont excitateurs, et les interneurones V2b qui sont inhibiteurs (Lundfald et al., 2007; Peng et al., 2007). La sous classe V2a est également impliquée dans la régulation de motoneurones controlatéraux contrôlant la coordination droite/gauche (Crone et al., 2009; Lanuza et al.) ainsi que la génération du rythme (Ljunggren et al., 2014) (Figure 11).

1.3.1.b Les interneurones controlatéraux ou commissuraux

Les interneurones commissuraux correspondent aux interneurones envoyant leurs projections du côté controlatéral de la moelle spinale et contrôlent ainsi les motoneurones impliqués dans la coordination droite/gauche.

Les premiers interneurons commissuraux identifiés comme étant impliquée dans cette coordination sont ceux de la **classe V0** (Pierani et al., 2001). Parmi cette classe, on distingue deux sous types d'interneurones : Les $V0_v$ (pour ventral) et les $V0_d$ (pour dorsal) (Moran-Rivard et al.; Pierani et al., 2001). Ces deux sous types ont des caractéristiques complémentaires pour la coordination droite/gauche. Les $V0_d$ sont des interneurons inhibiteurs et coordonnent l'activité droite/gauche pendant une locomotion lente via une connexion monosynaptique controlatérale avec les motoneurons (Figure 11 et 12). Les $V0_v$, quant à eux sont excitateurs et s'activent lorsque le rythme locomoteur s'accélère en activant les interneurons controlatéraux inhibiteurs de dernier ordre (Talpalar et al., 2013) (Figure 11 et 12). Notons qu'il existe une population restreinte d'interneurones V0 qui sont cholinergiques : les $V0_c$. Ceux-là sont ipsilatéraux et contactent directement les motoneurons pour contrôler leur fréquence de décharge (Figure 11 et 12) (Zagoraïou et al., 2009).

La deuxième classe d'interneurones commissuraux est la **classe V3**. Cette population est hétérogène et, contrairement aux trois autres qui se situent uniquement dans les laminae VII et VIII, ils sont également exprimés dans les laminae IV et V des segments lombaires et thoraciques. Les interneurons V3 sont excitateurs et sont impliqués dans la coordination droite/gauche pendant la locomotion (Ljunggren et al., 2014) (Figure 11 et 12).

POPULATION	SUBSET	PROPOSED FUNCTION DURING LOCOMOTION	
dI6	DMRT3	Coordinated locomotor movements	
	Wt1	Unknown	
	DMRT3/Wt1	Unknown	
V0	V0 _D	Dbx1/Pax7	Left right coordination at slow locomotor speed
	V0 _V	Dbx1/Evx1	Left right coordination at fast locomotor speed
	V0 _{CiG}	Dbx1/Evx1/Pitx2	Modulation of ipsilateral motoneuron firing
V1	RC	En1/Foxd3/Oc1/Oc2/MafB	Control of ipsilateral motoneuron activity via recurrent inhibition
	IaIN	En1/FoxP2	Control of ipsilateral motoneuron activity via reciprocal inhibition
		En1	Control of locomotor speed
V2	V2b	GATA2/3	Control of ipsilateral flexor/extensor coordination
	V2a	Chx10	Left right coordination at fast locomotor speed
		Chx10/Shox2	Burst variability of motoneurons.
V3	Sim1	Ipsilateral and contralateral coordination.	

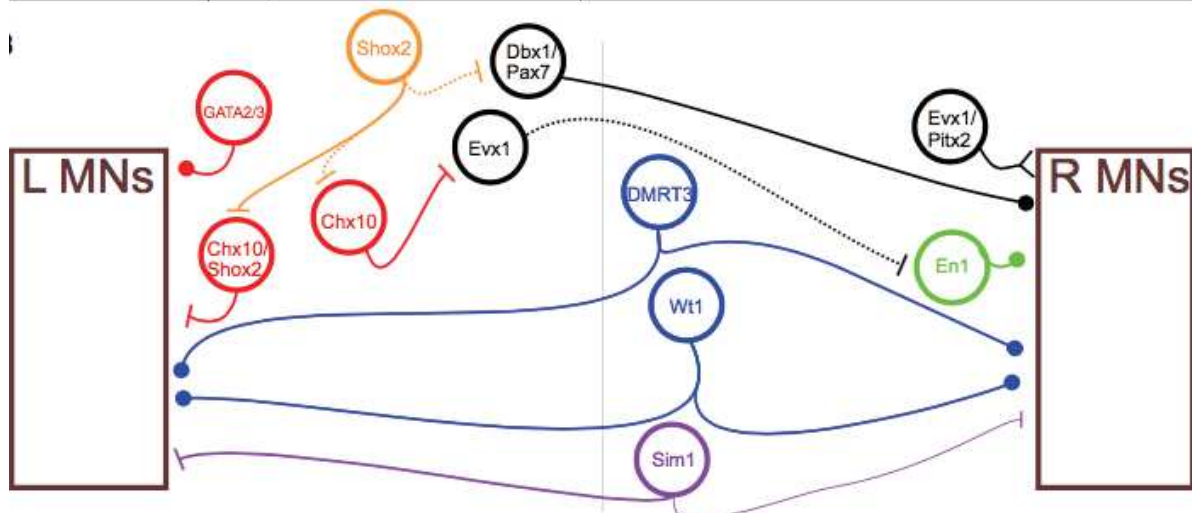


Figure 11 | Identité génétique, fonctions locomotrices et connexions synaptiques des sous-populations d'interneurones ventraux pré-moteurs. D'après Gosgnach et al., 2017

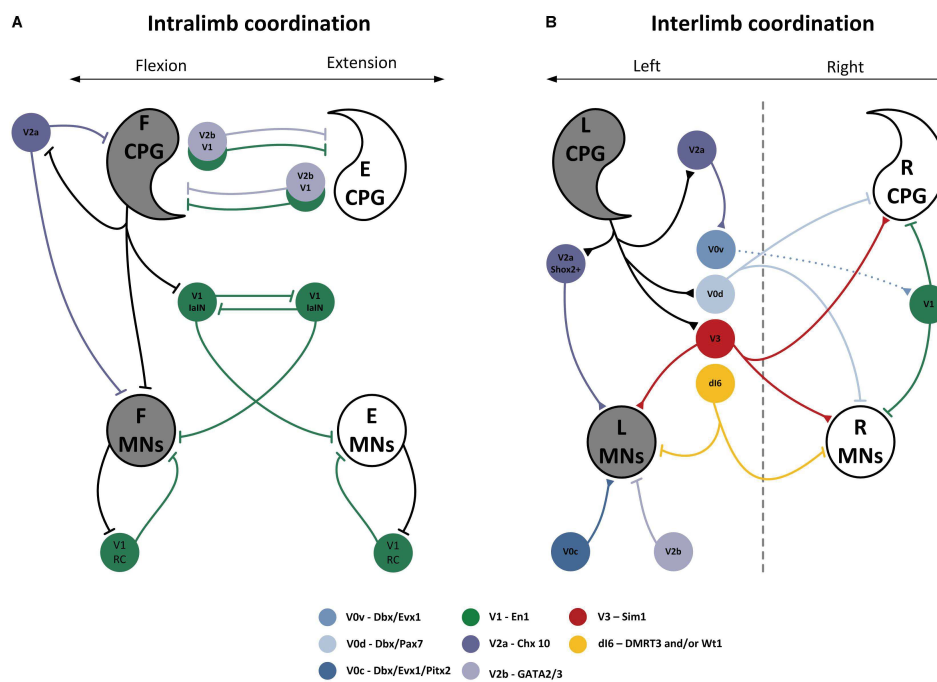


Figure 12 | Représentation schématique des réseaux locomoteurs spinaux

Schéma des connexions synaptiques des interneurons de la corne ventrale génétiquement identifiés impliqués dans la coordination (a) Flexion/Extension et (b) Droite/Gauche. MNs : Motoneurones. F : Flexion. E : Extension. L : Left. R : Right. D'après Côté et al., 2018

1.3.1.c Autres

D'autres types d'interneurones n'appartenant à aucune de ces quatre classes sont dits « dorsaux ». Parmi ceux-là, un type migre dans la partie ventrale après la naissance, pour faire partie du CPG : les **interneurones dorsaux 6 (Id6)** (Figure 13) (Lai et al., 2016). Ceux-ci vont moduler la coordination du mouvement. Les Id6 contactent les motoneurones ipsilatéraux et controlatéraux de façon monosynaptique pour moduler la coordination droite/gauche (Andersson et al., 2012).

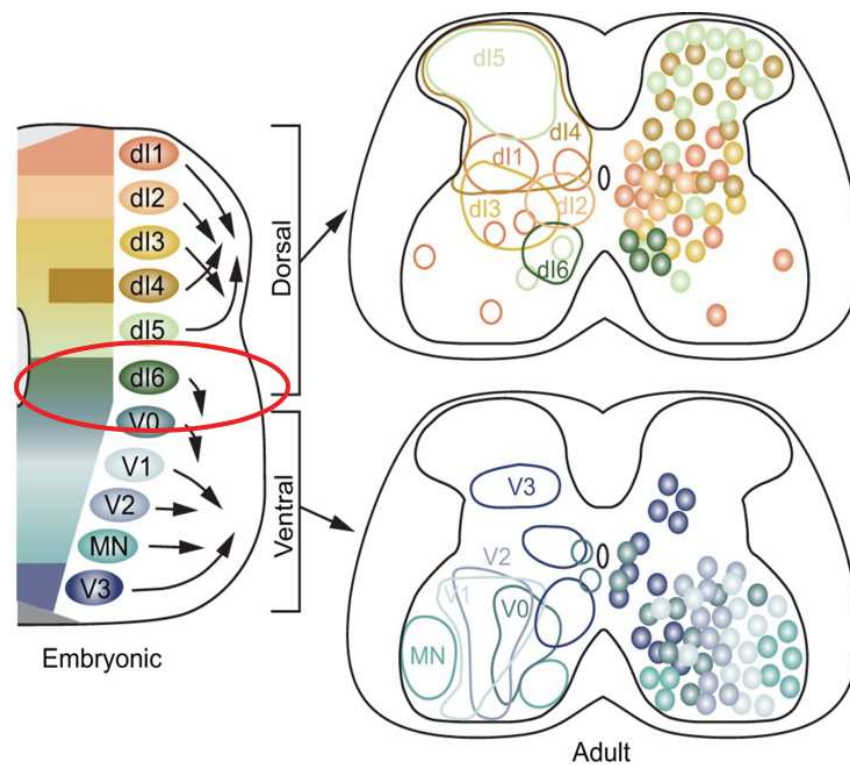


Figure | Migration des neurones pendant le développement spinal

Illustration montrant l'origine du progéniteur des interneurons ventraux Id6 D'après Lai et al., 2016

1.3.2 Les motoneurones

Les motoneurones constituent la voie de sortie des différentes informations motrices. Certaines viennent des afférences sensorielles, détectant la tension des muscles par exemple, et d'autres viennent des sources supra-spinales (ex : les ganglions de la base ou GDB) formant le contrôle moteur descendant dans le but d'initier, de maintenir et de stopper le mouvement.

Par ailleurs, comme énoncé précédemment, l'activité de ces motoneurones est contrôlée par un réseau d'interneurones pré-moteurs du CPG afin de contrôler le rythme et la coordination des mouvements. Les motoneurones qui sont localisés dans les laminae VIII

et IX de la corne ventrale, vont directement contacter les muscles effecteurs. Il existe deux types majeurs de motoneurones : les **motoneurones α** et les **motoneurones γ** . Les axones de ces motoneurones sont contenus dans les fibres A α et A γ , respectivement. Les fibres A α acheminent les axones efférents des motoneurones α qui permettent le contrôle de la contraction des muscles squelettiques (extra-fusoriales). Les fibres A γ acheminent les axones efférents des motoneurones γ (intra-fusoriale) et permettent la contraction des fuseaux musculaires.

Dans la corne dorsale nous avons vu qu'il existe une organisation somatotopique déterminant la place des neurones sensoriels : il en va de même au sein de la corne ventrale. En effet, il existe une organisation musculotopique des motoneurones. Au niveau lombaire on retrouve deux classes de motoneurones : ceux contrôlant les muscles axiaux positionnés au niveau de la colonne motrice médiane, **MMC** (*Medial Motor Column*) et ceux contrôlant les muscles distaux (les membres) distribués au niveau de la colonne motrice latérale, **LMC** (*Lateral motor column*). Ces deux familles de motoneurones constituent la cible des CPG.

Enfin, comme il a été mentionné au début de ce paragraphe, une des composantes essentielles à l'activité motrice est la génération du rythme. La principale source « pacemaker » des CPG est composée d'interneurones ipsilatéraux excitateurs de derniers ordres exprimant le facteur de transcription **Hb9** (basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9) que l'on retrouve également au niveau des motoneurones au cours du développement embryonnaire (Bréjot et al., 2006). Les interneurones Hb9 se trouvent au niveau ventro-médial des segments L1-L3 de la moelle spinale de rongeur (Wilson, 2005) (Wilson et al., 2005). Une étude sur moelle isolée a permis l'identification de

plusieurs caractéristiques rythmogénétiques des interneurons Hb9 (Hinckley et al., 2005). Ceux-ci s'activent pendant la locomotion et pour générer et maintenir un rythme adéquat.

Pour conclure, les réseaux moteurs spinaux sont relativement bien décrits et on retrouve également au niveau de la corne ventrale une complexité importante des populations neuronales. Les circuits neuronaux impliqués dans la locomotion sont donc principalement composés de deux éléments majeurs : les interneurons pré-moteurs et les motoneurons. Ceux-ci forment un réseau indispensable à la coordination motrice des vertébrés (Figure 14). Ces réseaux moteurs sont également modulés par des voies monoaminergiques descendantes. Le rôle de la dopamine dans le contrôle moteur sera détaillé dans le chapitre suivant.

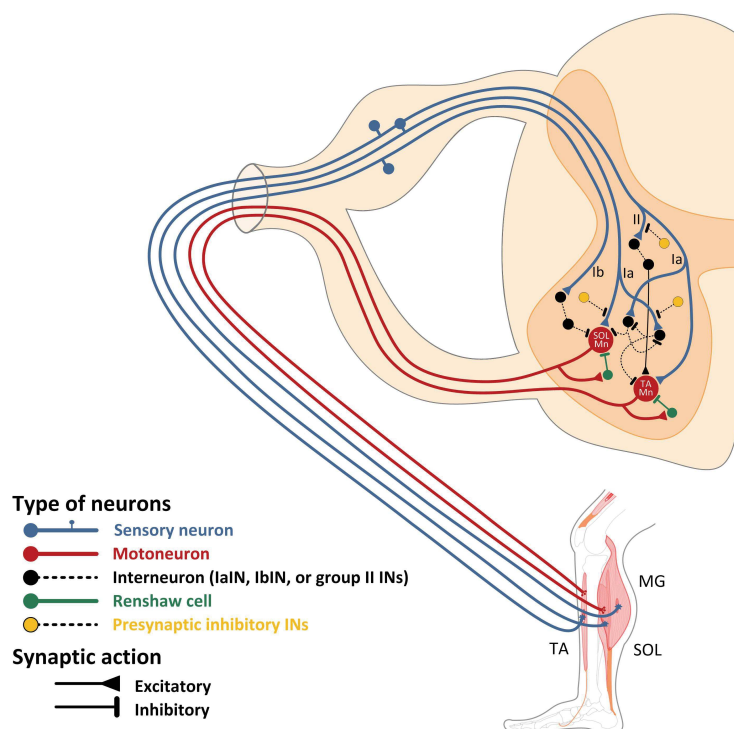


Figure 13 | Circuit inter-neuronaux spinaux de la locomotion

Présentation des différents types neuronaux impliqués dans le mouvement moteur. D'après Côté et al., 2018

CHAPITRE II : La dopamine et la moelle spinale

La dopamine (DA), identifiée en 1938 par Holtz a d'abord été décrite comme un précurseur de la noradrénaline en 1957 par Montagu. Elle n'a été considérée comme un neuromodulateur à part entière que 21 ans après sa découverte (Carlsson, 1959). La dopamine est un des neuromodulateurs les plus abondants du système nerveux central (SNC) qui joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la fonction motrice, la motivation, la mémoire, l'apprentissage ou encore la douleur (Flagel et al., 2011; Sharples et al., 2014a; Volkow et al., 2011). Une altération du système dopaminergique peut donc avoir des conséquences importantes et très variées tels que la maladie de Parkinson, la douleur céphalique chronique, la fibromyalgie, le syndrome des jambes sans repos,...(Carlsson, 1959; Clemens et al., 2006; Lapirot et al., 2011).

Dans ce deuxième chapitre, nous nous focaliserons sur la modulation dopaminergique au niveau spinal. Nous décrirons dans un premier temps la source de dopamine spinale. Puis, nous nous concentrerons sur les récepteurs à la dopamine et sur leur patron d'expression au niveau de la moelle. Enfin, une description des circuits spinaux connus pour être modulés par la dopamine viendra clôturer ce chapitre. L'objectif de ce travail étant d'apporter une caractérisation moléculaire des cellules exprimant son récepteur D2 (D2R) ainsi qu'une caractérisation fonctionnelle de ce récepteur au niveau lombaire de la moelle spinale de souris.

II.1 Source dopaminergique de la moelle spinale : description du noyau A11.

Il est d'abord important de connaître l'origine de la dopamine qui arrive au niveau de la moelle spinale pour moduler les différents circuits spinaux. Dans un premier temps, la machinerie enzymatique nécessaire à l'identification d'un neurone dopaminergique sera détaillée, puis les différents noyaux dopaminergiques au sein du SNC seront énoncés. Enfin, une description du noyau A11 sera présentée.

II.1.1 Caractéristiques des neurones dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques sont définis par la présence d'une machinerie enzymatique complexe qui permet la synthèse, le stockage, la libération et la recapture de la dopamine. D'abord, deux enzymes sont nécessaires à la synthèse de dopamine ; la tyrosine hydroxylase ou TH, enzyme qui permet la conversion de tyrosine en L-DOPA et l'Aromatic-L-Amino Décarboxylase ou AADC, qui va synthétiser la dopamine à partir de la L-DOPA (Figure 15). Ensuite, pour stocker la dopamine dans les vésicules synaptiques, le transporteur vésiculaire de monoamine VMAT2 est indispensable. Après fusion vésiculaire à la membrane du neurone, la dopamine est libérée au niveau de la fente synaptique. Son transporteur DAT (Dopamine Transporteur) est nécessaire à la recapture de la dopamine (Figure 14 | Représentation schématique de la machinerie enzymatique d'un neurone dopaminergique). Cette machinerie enzymatique permet donc d'identifier les neurones dopaminergiques en utilisant ces différents marqueurs. Cependant, il existe des neurones dopaminergiques ne contenant pas le DAT, c'est le cas pour le noyau A11 par exemple. Ceci laisse supposer d'une plus grande concentration extracellulaire de dopamine au niveau de la fente synaptique et d'un effet à plus long terme de celle-ci, ce qui a été montré avec des souris KO pour le DAT au niveau du striatum de souris (Jones et al.,

1998). Notons que le transporteur à la noradrénaline (NET) peut également permettre la recapture de dopamine. C'est le cas au niveau de l'hippocampe et du cortex frontal (Borgkvist et al., 2011; Morón et al., 2002). Dans la continuité de cette description enzymatique, il est aussi important de souligner que la TH peut également être un marqueur de neurones noradrénergiques. En effet, la dopamine via l'enzyme dopamine-beta-décarboxylase ou DBH peut être transformée en noradrénaline (Figure 14). Donc, l'expression de TH à elle seule ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'un neurone dopaminergique ou noradrénergique. La TH est donc indispensable mais n'est pas suffisante comme seul marqueur déterminant l'identité d'un neurone dopaminergique.

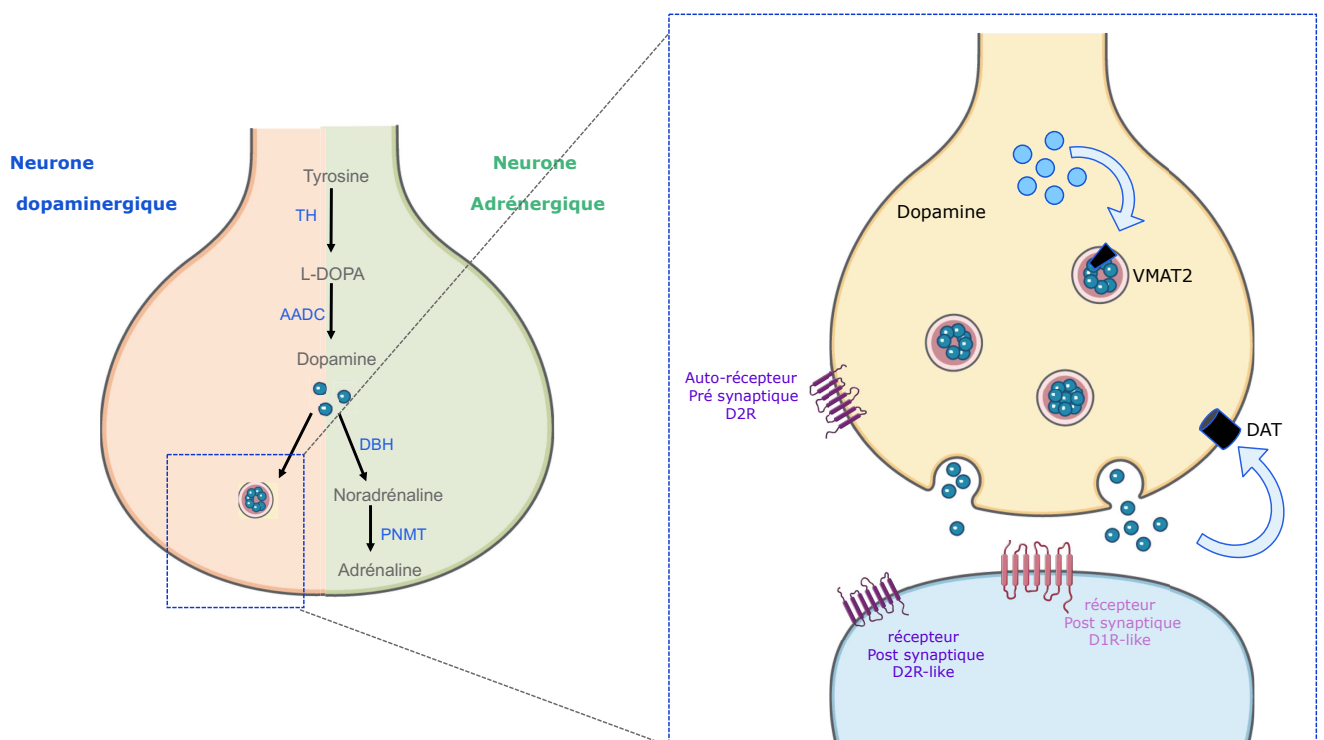


Figure 14 | Représentation schématique de la machinerie enzymatique d'un neurone dopaminergique

(Gauche) Cascade enzymatique permettant la synthèse de DA et de NA. (Droite) Machinerie enzymatique nécessaire au stockage et à la recapture de la DA.

II.1.2 Les noyaux dopaminergiques

Dans les années 1960-1970, plusieurs noyaux contenant les corps cellulaires des neurones dopaminergiques ont été décrits ainsi que leurs projections axonales vers leurs cibles. Ainsi, chez les mammifères, les neurones à dopamine sont regroupés en neuf noyaux dopaminergiques de A8 à A16, et sont répartis au sein du cerveau, entre le mésencéphale et le bulbe olfactif (Dahlstroem and Fuxe, 1964) (Figure 15). Cette nomenclature vient du A de *Aminergic cell*, regroupant la description de 17 noyaux au total (A1 à A17) de cellules aminergiques (Carlsson et al., 1964; Dahlstroem and Fuxe, 1964).

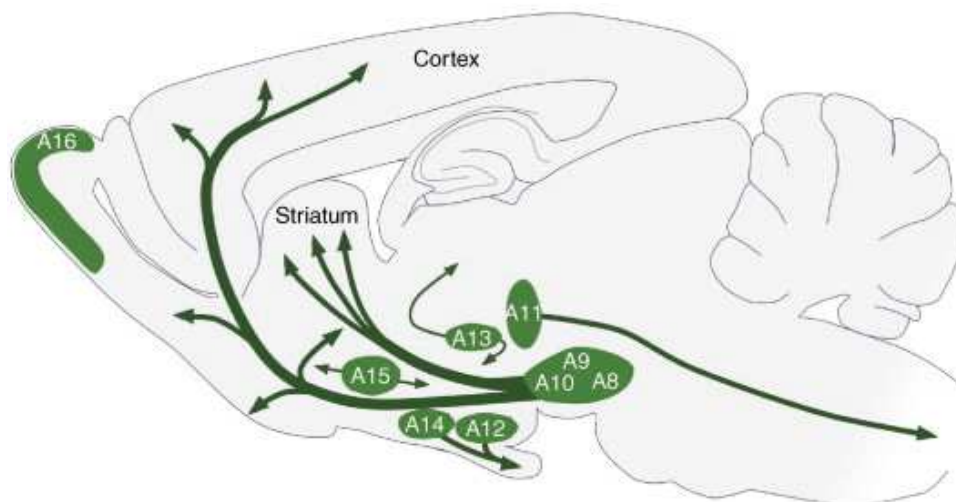


Figure 15 | Distribution des noyaux dopaminergiques au sein du SNC

Représentation des différentes voies dopaminergiques et des noyaux associés. A8 : Aire Rétro rubrale ; A9 : Substance Noire ; A10 : ATV ; A11 : Zone Périventriculaire de l'Hypothalamus Postérieur ; A12 : Noyau arqué de l'Hypothalamus ; A13 : Hypothalamus Dorsale ; A14 : Noyau Périventriculaire ; A15 : Aire Préoptique Dorsale ; A16 : Glomérule du BO. D'après Bjorklund et Dunnett., 2007

Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser au noyau A11. Celui-ci est conservé d'un point de vue évolutif du zebrafish (Lambert et al., 2012; Ryu et al., 2007) aux mammifères (Barraud et al., 2010). Il est situé au niveau périventriculaire de l'hypothalamus (région postérieure), proche du troisième ventricule (Figure 16) (Barraud et al., 2010; Koblinger et al., 2014; Sharples et al., 2014a; Skagerberg et al., 1982).

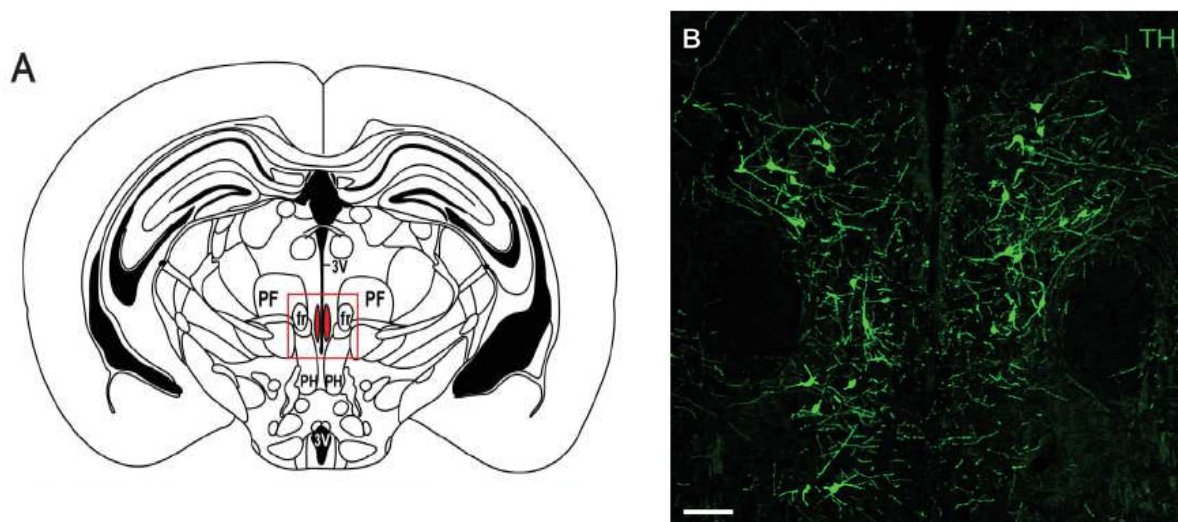


Figure 16 | Cellules TH-positives du A11

(a) Localisation du A11 au sein du cerveau. (b) Immunohistochimie anti-TH au niveau du A11. D'après Koblinger et al., 2014

Si l'on s'intéresse à la connectivité de ce noyau, il a été montré au travers de plusieurs études que le A11 recevait des afférences de régions impliquées dans la modulation de la douleur tels que la substance grise périaqueducule et le noyau parabrachial (Abrahamson and Moore, 2001; Qu et al., 2006). Le cortex cingulaire, le cortex infralimbique et la strie terminale, structures impliquées, entre autre, dans l'aspect émotionnel de la perception

douloureuse, projettent également vers le noyau A11 (Johansen et al., 2001; Rainville et al., 1997; Thibault et al., 2014).

II.1.3 Évidence du A11 comme source dopaminergique spinale

En 1979, le noyau A11 est d'abord identifié chez le rat comme étant la source dopaminergique primaire de la moelle spinale (Björklund and Skagerberg, 1979). Ce n'est qu'en 2006 que cette évidence est mise en avant chez la souris (Qu et al., 2006) et reconfirmée plus tard en 2014, par les travaux de Koblinger montrant aussi que l'innervation dopaminergique du A11 concerne tous les segments de la moelle épinière (Koblinger et al., 2014). Les neurones du A11 projettent principalement au niveau de la corne dorsale, mais une innervation de la corne ventrale est néanmoins observée (Skagerberg et al., 1982). On parle de voie (ou de neurone) diencéphalospinale. Comme c'est le cas pour la plupart des noyaux monoaminergiques, les neurones du A11 envoient des collatérales au niveau de plusieurs autres structures cérébrales : le cortex préfrontal, l'amygdale et le noyau du Raphé dorsal (Peyron et al., 1995; Takada et al., 1988). Il a été montré qu'une lésion du A11 entraînait une diminution de la dopamine au niveau lombaire de la moelle spinale (Zhao et al., 2007) qui s'accompagne d'une altération de l'expression des récepteurs D1R, D2R et D3R spinaux (les récepteurs dopaminergiques feront l'objet d'une partie à part, section II.2). On retrouve une augmentation de l'expression des D1R alors qu'il y a une diminution de l'expression des D2R et D3R et des ARNm associés (Zhao et al., 2007).

- **Les neurones diencéphalospinaux**

Les neurones diencéphalospinaux positifs pour la TH expriment également l'AADC et le VMAT2 (Barraud et al., 2010; Koblinger et al., 2014; Pappas et al., 2008). Il est intéressant

de noter l'absence de DAT au niveau du A11, entraînant potentiellement une plus forte concentration de dopamine extracellulaire au niveau de la moelle spinale (Koblinger et al., 2014). L'autorécepteur pré-synaptique D2R régule la synthèse de dopamine et en limite la concentration intracellulaire. Au niveau des neurones du A11, il y a une absence de cette régulation directement liée à l'absence des autorécepteurs pré-synaptique D2R (Koblinger et al., 2014; Pappas et al., 2008). Cependant, l'absence de l'enzyme DBH, qui sert à la synthèse de noradrénaline à partir de la dopamine, renforce le fait que les neurones du noyau A11 ont un phénotype dopaminergique (Charbit et al., 2009).

Les neurones du A11 exprimant la TH co-localisent avec le transporteur du glutamate VGLUT2 mais aucune co-expression n'a été observée avec le transporteur du GABA, VGAT (Koblinger et al., 2018). Cette information laisse supposer de l'existence d'une co-libération de dopamine et de glutamate par les neurones du A11 projetant vers la moelle. En effet, c'est le cas au niveau de l'ATV (noyau A10) où les neurones dopaminergiques projetant vers le striatum ventrale ou Nacc (Noyau Accumbens) peuvent co-libérer de la dopamine et du glutamate à partir des différentes varicosités d'un même axone (Kawano et al., 2006; Stuber et al., 2010).

D'un point de vue fonctionnel, la voie diencéphalospinale a été décrite comme étant impliquée dans le contrôle de la douleur (Fleetwood-Walker et al., 1988) et le contrôle moteur (Koblinger et al., 2018). Une altération de la transmission dopaminergique spinale peut mener au développement de symptômes observés dans certaines pathologies comme les syndrome des jambes sans repos (SJSR) (Clemens et al., 2006), la cataplexie (Okura et al., 2004), la migraine (Charbit et al., 2009).

- **Implication du A11 dans la modulation de la douleur**

La voie descendante dopaminergique exerce un effet anti-nociceptif (Qu et al., 2006; Tamae et al., 2005). Une stimulation électrique du A11 supprime la réponse nociceptive des neurones de la corne dorsale chez le rat et le chat (Fleetwood-Walker et al., 1988). Ces informations laissent supposer que l'innervation dopaminergique spinale est impliquée dans le mécanisme d'anti-nociception au niveau de la moelle spinale. La description de ce mécanisme se fera dans la dernière partie de ce chapitre (section II.3.2)

- **Implication du A11 dans le contrôle moteur**

Une approche optogénétique a permis de mettre en avant l'implication du A11 et de la voie diencephalospinale dans l'initiation du mouvement ainsi que dans l'activité sur place (Koblinger et al., 2018). Ainsi la photostimulation des neurones diencephalospinaux entraîne une augmentation de l'activité motrice (Koblinger et al., 2018). Le mécanisme par lequel la dopamine agit sur les commandes motrices spinales est détaillé dans la dernière partie de ce chapitre (section II.3.1).

- **Implication du A11 dans le syndrome des jambes sans repos (SJSR)**

Les mécanismes à l'origine du SJSR ne sont pas encore connus. Des hypothèses mettent en avant qu'un dysfonctionnement de la voie diencephalospinale est une cause du SJSR (Clemens, 2004; Qu et al., 2007). La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la description de cette pathologie ainsi qu'à l'implication de la modulation dopaminergique (Section II.3.3) (Zhang et al., 2008).

II.1.4 Voie diencéphalospinale : dimorphisme sexuel

Il existe un dimorphisme sexuel dans la concentration de dopamine au niveau du segment lombaire de la moelle chez la souris. En effet, on mesure un taux de dopamine plus élevé chez les mâles que chez les femelles (Pappas et al., 2008). Ces mesures prennent en compte la dopamine stockée dans des vésicules au niveau des terminaisons synaptiques (CARLSSON, 1975) ce qui laisse supposer que l'innervation dopaminergique est plus importante chez les mâles que chez les femelles. Cette différence semble être due à un effet androgène-dépendant (Pappas et al., 2010). De plus, un gradient de concentration de dopamine est observé dans l'axe rostro-caudal de la moelle spinale chez les mâles ; il y a plus de dopamine dans le segment lombaire que dans le segment thoracique. Cette différence n'est pas observée chez les femelles (Pappas et al., 2008).

D'un point de vue comportemental, la différence de concentration dopaminergique au niveau spinal entre mâles et femelles pourrait être à l'origine de différences observées notamment dans la composante nociceptive (Mogil et al., 2000). Malgré ce dimorphisme sexuel, il n'y a pas de différence dans l'activité des neurones dopaminergiques (Pappas et al., 2008).

De plus, à ce jour, il n'a pas été reporté au niveau spinal l'existence d'un dimorphisme sexuel de l'expression des récepteurs à la dopamine. Cependant, il est important de tenir compte du dimorphisme sexuel au niveau de la voie diencéphalospinale dans l'analyse phénotypique dû à une altération de la modulation dopaminergique.

II.1.5 Présence de TH au niveau des DRG : autre source dopaminergique spinale ?

La tyrosine hydroxylase (TH) est également exprimée au niveau des DRG où 10 à 15 % de ces neurones expriment la TH (Brumovsky, 2016). Ceci a d'abord été décrit chez le rat

en 1990. Plus tard, la présence de TH au niveau des DRG a été confirmée chez la souris (Ichikawa et al., 1993). C'est en 2011 que l'expression de la TH est décrite comme étant une des caractéristiques d'identification des neurones C-LTMR (pour C-Low Threshold MechanoReceptor) jusqu'alors identifié par l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3, (Li et al., 2011; Seal et al., 2009). Ces neurones sensoriels sont responsables de la transmission des informations tactiles légères et des stimuli mécaniques inoffensifs générés à la périphérie (Olausson et al., 2010; Seal et al., 2009). Encore aujourd'hui, le phénotype catécholaminergique des neurones primaires exprimant la TH n'est pas clairement connu. Il y a une absence des enzymes nécessaires à la synthèse de noradrénaline (telles que DBH ou PNMT) (Katz et al., 1986; Price and Mudge, 1983; Vega et al., 1991) alors que les neurones sensoriels exprimeraient l'AADC (Finley et al., 1992) et que l'on retrouve toute la machinerie nécessaire à la synthèse de dopamine au niveau des DRG de souris (Goswami et al., 2014). Cependant, Brumovisky et ses collaborateurs n'ont pas pu mettre en évidence la présence du transporteur à la dopamine DAT (Brumovsky et al., 2006). Une des limites de leurs études, selon eux, est l'approche par immunohistochimie. En effet, le marquage de AADC ainsi que celui de DAT n'est pas évident à observer au niveau des corps cellulaires, laissant penser qu'on ne peut pas exclure l'hypothèse de la synthèse de DA au niveau des DRG par les neurones positifs pour la TH. Cependant ces éléments sont controversés ; il a été montré que les afférences terminales des neurones positifs pour la TH auraient une origine principalement supra-spinale (Björklund and Skagerberg, 1979; Hökfelt et al., 1979).

Bien que le A11 apparait comme la majeure et unique source dopaminergique spinale, on ne peut pas exclure totalement l'éventualité d'une afférence dopaminergique venant des DRG et arrivant au niveau de la corne dorsale.

Tous ces éléments mis ensemble, il semble clair et évident que la dopamine innervant la moelle épinière provient principalement du noyau A11.

II.2 Expression des récepteurs dopaminergiques spinaux

II.1.2 Généralités sur les récepteurs dopaminergiques

Il existe cinq récepteurs à la dopamine nommés de D1R à D5R. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) et divisés en deux sous familles : les D1R-like (D1R, D5R) et les D2R-like (D2R, D3R, D4R). La classification des récepteurs dopaminergiques a été effectuée en fonction de leurs propriétés biochimiques. Selon le sous-type de récepteur activé par fixation du ligand, la cascade de signalisation peut être différente. L'adénylate cyclase peut être activée ou inhibée et ainsi jouer différemment sur la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Kebabian and Calne, 1979; Spano et al., 1978). Les récepteurs de la famille D1R-like sont post-synaptiques alors que ceux de la famille D2-like peuvent être post-synaptiques ou bien pré-synaptiques. Il existe deux isoformes pour les D2R ; la forme longue D2RI ou D2R⁽⁴⁴⁴⁾ ainsi que la forme courte D2s ou D2R⁽⁴¹⁵⁾, exprimés majoritairement au niveau post-synaptique et pré-synaptique, respectivement. Ces deux isoformes résultent d'un épissage alternatif entraînant la présence ou l'absence d'une séquence protéique de 29 acides aminés. Les D2R pré-synaptiques peuvent également être auto-récepteurs et jouer un rôle majeur dans la régulation de synthèse à la dopamine, comme déjà mentionné.

II.1.2 Distribution des récepteurs dopaminergiques au niveau spinale

Les cinq récepteurs à la dopamine sont répartis non uniformément au niveau de la moelle (Schotland et al., 1995) (Figure 17). L'expression des récepteurs à la dopamine au niveau

spinal a fait l'objet de différentes études sur plusieurs espèces ; les primates non humains (NPH) (Barraud et al., 2010), la souris (Zhao et al., 2007; Zhu et al., 2007b) et, le modèle principalement étudié dans ce cas, le rat (Diaz et al., 1995; Dijken et al., 1996; Gladwell and Coote, 1999; Levant and McCarson, 2001; Venugopalan et al., 2006; Xie et al., 1998). Il existe des différences d'expression en fonction du fond génétique d'une même espèce, ainsi qu'au niveau inter-espèce (Clark et al., 1991; Zhao et al., 2007).

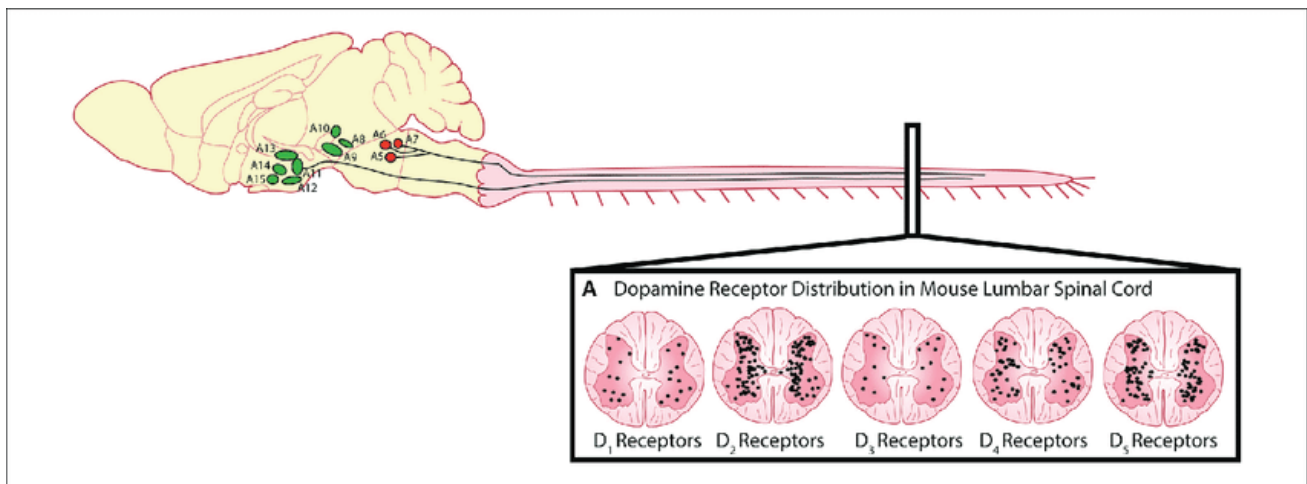


Figure 17 | Distribution des récepteurs à la dopamine au niveau lombaire. D'après (Sharples et al., 2014a)

- **Expression des récepteurs D2R-like**

Le récepteur D2R est le plus abondant au niveau lombaire de la moelle spinale, avec une expression dans 52 % des neurones spinaux. Les neurones exprimant récepteurs D3R et D4R représentent respectivement 12 % et 26 % des neurones (Zhu et al., 2007b).

Les D2R sont principalement exprimés au niveau de la corne dorsale (Zhu et al., 2007b).

Les ARNmessagers de D2R sont exprimés dans les motoneurones. Cependant, la protéine D2R n'est pas exprimée dans les motoneurones de souris FVB/N utilisées pour le

projet GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas). Aussi, il se trouve que la protéine D2R est également absente dans les motoneurones de rat (Dijken et al., 1996).

Les D4R sont très peu étudiés. Ils sont exprimés dans tous les segments de la moelle spinale (Zhu et al., 2007b)

Les D3R sont les plus affins pour la dopamine et sont largement étudiés au niveau spinal (Zhu et al., 2007b). Une délétion du gène codant pour les D3R est caractérisé par une hyperactivité. De plus, des modèles murins D3RKO ont été développés pour étudier le SJSR (Clemens et al., 2006; Meneely et al., 2018) (Cf. session II.3.3). Les D3R sont présents dans toutes les laminae de la moelle (Zhu et al., 2007b) avec une expression préférentielle au niveau des laminae superficielles, principalement dans les neurones sensoriels (Levant, 1998). Les récepteurs D3R sont exprimés au niveau de terminaisons dopaminergiques descendantes (Diaz et al., 1995) mais également au niveau des afférences primaires.

- **Expression des récepteurs D1R-like**

Les récepteurs D1R et D5R sont exprimés dans tous les segments de la moelle épinière (Dijken et al., 1996; Gladwell and Coote, 1999; Levant and McCarson, 2001; Zhao et al., 2007) principalement au niveau de la matière grise (Zhu et al., 2007b) 46 % des neurones de la matière grise expriment D5R et 17 % expriment D1R. Ces derniers seraient principalement exprimés au niveau de la corne ventrale, et seraient impliqués dans la modulation des circuits moteurs plutôt que dans la composante sensorielle (Han and Whelan, 2009; Lapointe and Guertin, 2008; Sharples et al., 2015; Zhu et al., 2007b). Quelques rares observations d'expression du D5R ont pu être faites au niveau de la matière blanche, ce qui laisse supposer que ce sous-type de récepteur pourrait être

exprimé au niveau des cellules gliales (Zhu et al., 2007b), cependant, la caractérisation des récepteurs D5R est encore aujourd'hui très restreinte.

Pour conclure, les cinq récepteurs à la dopamine sont tous exprimés avec une distribution topographique similaire au sein de la moelle épinière (Figure 18). Cependant, on retrouve un niveau d'expression plus important pour les D2R. Ceci laisse supposer que la voie dopaminergique descendante agit principalement par une action post-synaptique des D2R. Aussi, une caractérisation approfondie chez la souris des cellules exprimant les récepteurs à la dopamine permettrait une meilleure compréhension du fonctionnement de la modulation dopaminergique spinale.

II.3 Description des circuits spinaux modulés par la dopamine

La dopamine de la voie diencephalospinale joue un effet modulateur sur différents circuits spinaux et est donc impliquée dans une grande variété de comportements. Dans cette dernière partie sera présenté l'implication de la dopamine dans la modulation de la motricité, la somatosensation et dans la physiopathologie du syndrome des jambes sans repos.

II.3.1 La motricité

La motricité est la résultante de différentes composantes telles que la planification, l'initiation et l'exécution des mouvements. Ces divers paramètres se traduisent par l'implication de différentes structures cérébrales corticales et sous corticales et notamment par la connexion entre le cortex moteur primaire et les ganglions de la base (GBD). Les

GDB n'entraînent pas directement ni indépendamment un mouvement moteur mais agissent en influençant l'activité d'autres régions cérébrales tel que le cortex moteur, ce qui, *in fine*, se traduira par un message moteur envoyé au niveau spinal via les voies descendantes pour générer ou non, une réponse musculaire motrice. En condition physiologique, la dopamine innerve de façon importante les nombreuses structures impliquées dans le contrôle moteur (Han and Whelan, 2009; Lapointe and Guertin, 2008; Sharples et al., 2015a) ce qui témoigne de son implication dans la modulation de la motricité. C'est dans un premier temps chez la lamproie que le rôle modulateur de la dopamine sur le rythme moteur a été mis en évidence (Schotland et al., 1995). Cette observation s'est étendue plus tard chez les vertébrés : le rat et la souris (Barriere et al., 2004; Gordon and Whelan, 2006; Madriaga et al., 2004). De plus, il a été rapporté qu'une altération du système dopaminergique pouvait avoir des conséquences sur le comportement moteur, c'est le cas par exemple pour la maladie de Parkinson (Chetrit et al., 2013). Au-delà du fait de l'action connue de la dopamine sur la modulation des circuits moteurs au niveau cortical, celle-ci est également importante au niveau spinale. En effet, les monoamines forment un important groupe de neuromodulateurs libérés au niveau de la moelle spinale agissant sur le contrôle moteur (Chetrit et al., 2013). Dans ce paragraphe l'intérêt sera porté sur la modulation dopaminergique spinale de la motricité.

- **Mécanisme moléculaire de la DA sur les motoneurones**

La dopamine peut avoir des effets différents sur les circuits spinaux modulant le contrôle moteur en fonction des récepteurs activés (Sharples et al., 2015). Une forte concentration de dopamine ($\sim 50\mu\text{M}$) active les récepteurs D1-like et contribue ainsi à renforcer la stabilité du rythme et à faciliter la locomotion spontanée. A l'inverse, une faible concentration ($\sim 2\mu\text{M}$) de dopamine active les récepteurs D2R-like et génère alors un

ralentissement du rythme et de la fréquence ainsi qu'une réduction de la locomotion spontanée (Clemens et al., 2012; Sharples et al., 2015). Ce ralentissement du rythme serait dû à l'inhibition d'une boucle de rétroaction excitatrice des motoneurones vers les CPG (Humphreys and Whelan, 2012) (Figure 18).

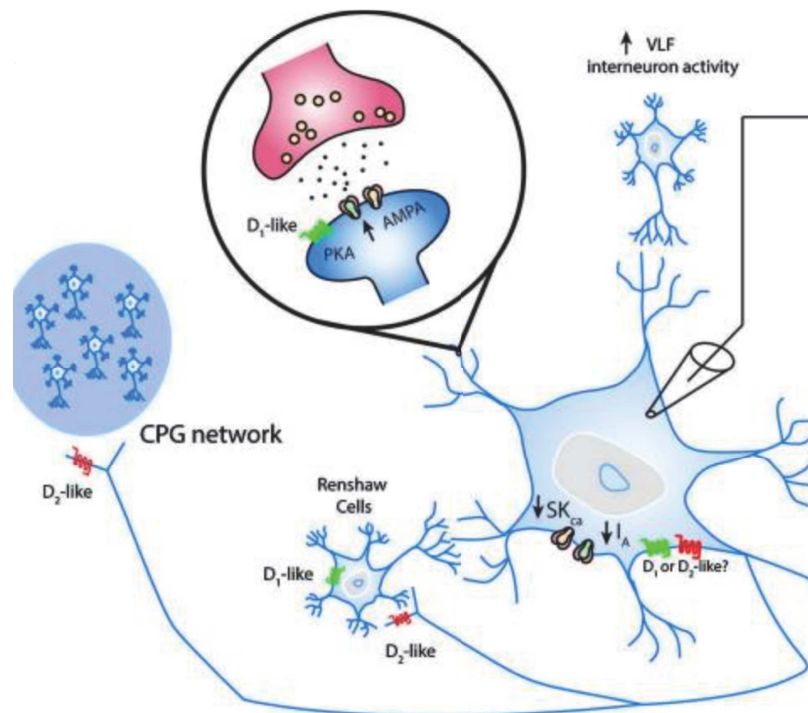


Figure 18 | Effets connus de la dopamine sur les composants du circuit moteur

La dopamine augmente l'excitabilité des motoneurones. Son action via les D1R-like permet d'augmenter la conductance AMPA. A l'inverse, son action via les D2R-like réduit le rétrocontrôle excitateur sur les cellules de RC et le CPG. D'après (Sharples et al., 2014a)

L'approche pharmacologique permet également de mettre en avant un rôle commun des deux sous types de récepteurs D1R et D2R. En effet, l'injection systémique de L-DOPA entraîne une augmentation de l'activité locomotrice chez le rat décérébré. Ce phénomène est bloqué lorsque l'on injecte un antagoniste aux D1R ou aux D2R (McCrea et al., 1997).

De plus, l'application d'agonistes des D1R peut à elle seule promouvoir l'activité de marche chez la souris (Lapointe et al., 2009).

La dopamine est capable d'avoir un effet direct sur les interneurons pré-moteurs ainsi que sur les motoneurons des CPG (Han et al., 2007) en modifiant l'excitabilité neuronale. La dopamine stimule la fréquence des pics de décharges des motoneurons en augmentant la transmission glutamatergique. Ce mécanisme se fait via une diminution de la conductance potassique qui se traduit par la potentialisation des courants AMPA (Han and Whelan, 2009; Han et al., 2007). Chez les mammifères, cette régulation est facilitée par les récepteurs D1R (Barriere et al., 2004; Madriaga et al., 2004) et non par les récepteurs D2R, contrairement à ce que l'on retrouve chez la lamproie (Schotland et al., 1995), et cette action serait PKA-dépendante (Han and Whelan, 2009). En effet, un antagoniste D1R peut bloquer cette augmentation des courants excitateurs alors qu'un antagoniste D2R n'a pas d'effet à ce niveau. De plus, la dopamine (ou un agoniste de ses récepteurs) est capable de moduler les réseaux moteurs lombaires via un effet à long terme (jusqu'à 3h avec son agoniste SKF 38393). L'étude pharmacologique sur moelle isolée a permis de mettre en avant que la dopamine, via l'activation des D1R, augmente la période ainsi que l'amplitude de décharge de l'activité neuronale des motoneurons exprimant le récepteur NMDA ce qui à terme induit la locomotion (Barriere et al., 2004). En effet, l'application d'agoniste aux D1R sur moelle spinale isolée induit un rythme prolongé alors que l'application d'agoniste aux D2R n'a pas d'effet (Barriere et al., 2004). Cependant, l'application d'un antagoniste sélectif soit des D1R soit des D2R abolit complètement, dans les deux cas, l'activité rythmique induite par un bain de dopamine. Ceci suggère une implication des deux types de récepteurs à la dopamine dans l'induction

de l'activité motrice. La possibilité d'une interaction entre ces deux sous-types de récepteurs ne peut pas être exclue (Barriere et al., 2004).

La dopamine peut exercer un effet modulateur complexe sur l'activité rythmique qui dépend de l'activité des GPC. La dopamine, via les D1R atténue l'activité rythmique évoquée au niveau des interneurons pré-moteurs de la racine ventrale. Par ailleurs, l'action de la dopamine via les D2R permet d'inhiber un circuit de rétroaction excitateur réduisant ainsi l'activité locomotrice. La dopamine présente alors une modulation de balance de l'activité motrice spontanée, et la régulation via les deux voies de médiation par D1R et D2R est essentielle au bon fonctionnement moteur. Ceci est également retrouvé au niveau des ganglions de la base, où le contrôle moteur, via la dopamine, émane d'un juste équilibre entre les voies opposées : directe excitatrice médiée par D1R et la voie indirecte inhibitrice médiée par D2R.

II.3.2 La somatosensation

Il est communément accepté que le processus spinal somatosensoriel est modulé, entre autre, par les systèmes monoaminergiques descendants, comme il a été mentionné au cours du chapitre I.

Les voies dopaminergiques descendantes sont impliquées dans les effets anti-nociceptifs. Cet effet modulateur de suppression de la douleur impliquerait les récepteurs D2R-like spinaux (Tamae et al., 2005). La dopamine, en agissant sur les D2R au niveau post-synaptique des neurones de la lamina II (Substance Gélatineuse) entraînerait une hyperpolarisation du neurone (Tamae et al., 2005). Il a également été montré que la stimulation électrique du noyau A11 entraînait la suppression de réponse nociceptive au

niveau de certains neurones de la corne dorsale superficielle. Cette suppression est reversée par l'administration d'un antagoniste aux D2R-like (Fleetwood-Walker et al., 1988). Par ailleurs, l'administration intrathécale de dopamine est capable d'induire un effet de suppression de la douleur thermique et mécanique. Cet effet est mimé par l'administration d'un agoniste D2R-like mais n'est pas retrouvé lorsqu'il s'agit d'un agoniste D1R-like (Tamae et al., 2005). Ceci indique que la dopamine, via ses récepteurs D2R-like, joue un rôle important dans la composante nociceptive (thermique ou mécanique). Il est important de souligner que la dopamine peut moduler directement des réponses nociceptives au niveau supra-spinal (striatum) ou bien de façon indirecte, via l'intermédiaire du système opioïdérique (Magnusson and Fisher, 2000; Pertovaara et al., 2004). La morphine est connue pour avoir un effet analgésique via son action sur les récepteurs opioïdériques μ : MOR (Matthes et al., 1996) et est très utilisée pour traiter les douleurs chroniques sévères. Cependant, une exposition répétée à la morphine mène au développement d'une tolérance, mécanisme qui implique les MOR (Matthes et al., 1996). Il a été mis en évidence que les D2R co-localisent avec les MOR au niveau spinal, et que ces récepteurs étaient capables de former des hétérodimères (Dai et al., 2016). Un traitement chronique à la morphine augmente cette hétérodimérisation entre D2R et MOR. De plus, le blocage des D2R via administration d'un antagoniste sélectif permet de diminuer l'interaction MOR-D2R induite par une administration répétée de morphine mais également de diminuer le développement de la tolérance. D2R est important dans le mécanisme moléculaire impliqué dans la tolérance et semble donc jouer un rôle dans l'adaptation neuronale pendant un traitement chronique à la morphine.

II.3.3 Le syndrome des jambes sans repos (SJSR) ou le syndrome d'Ekbohm

Il n'est pas possible de parler des circuits spinaux sensorimoteurs modulés par la dopamine sans énoncer le SJSR. Cette pathologie est définie par un trouble sensorimoteur à l'origine de sensations anormales au niveau des jambes (CHAUDHURI et al., 2001; Ekbohm; Hening, 2004). Ces sensations s'atténuent avec le mouvement moteur mais s'empirent en période de repos. Un des premiers traitements pour cette pathologie cible le système dopaminergique central, particulièrement l'activation des récepteurs D2R-like (Hening et al., 2004). L'origine de cette pathologie serait un dysfonctionnement de la source dopaminergique spinale précédemment décrite ; le noyau du A11. Ce dysfonctionnement engendrerait une facilitation des réflexes de flexion, donnant naissance au phénotype du SJSR (Clemens et al., 2006). Bien que la mise en place de modèle animaux fut difficile pour cette pathologie, il a été montré qu'une lésion du noyau A11 chez le rat ou bien qu'un *knock-out* pour les récepteurs D3R conduisaient à un phénotype proche de celui observable chez les patients humains atteints du SJSR (Ondo et al., 2000, 2007). En effet, dans les deux cas, les souris sont hyperactives et leur cycle repos-activité est altéré (phase d'éveil augmentée). La lésion du A11 entraîne une réduction à long terme des seuils sensoriels. Les D3KO, en plus de leur hyperactivité, présentent aussi une augmentation dans l'activité locomotrice.

Les mécanismes des SJSR ne sont pas encore bien connus et bien qu'une altération du A11 semble avoir un effet, la voie diencephalospinale pourrait ne pas être la seule voie impliquée. En effet, en plus de projeter au niveau de la corne dorsale de la moelle spinale, le noyau du A11 projette vers différentes structures supra-spinales tels que le néocortex (Takada et al., 1988) et le noyau du Raphé (Peyron et al., 1995). Un dysfonctionnement

de l'afférence dopaminergique spinale pourrait avoir plusieurs conséquences menant au phénotype du SJSR (Figure 19).

- **Conséquences sur le circuit sympathique autonome**

Comme déjà mentionné, certains des symptômes des SJSR sont l'hyperactivité et l'hypercontractilité musculaire. Une hypothèse sur l'origine de cette hypercontractilité se base sur la modulation couplée de la DA et de la 5-HT des neurones pré-ganglionnaires du IML (noyau Intermédiolatéral). Ces neurones sont situés au niveau des segments thoraciques de la moelle spinale et sont l'origine de la voie pré-ganglionnaire sympathique. Le A11 exerce un effet inhibiteur sur ces neurones du IML (Gladwell and Coote, 1999) alors que le noyau du Raphé y exerce un effet excitateur via la 5-HT (Pickering et al., 1994). Ainsi, un dysfonctionnement de l'innervation dopaminergique des neurones du IML mène à un déséquilibre de la balance en faveur de l'excitation des neurones pré-ganglionnaires. Ce déséquilibre mène, à terme, à une surexcitabilité des fibres musculaires. Ce phénomène serait renforcé par la libération de NA au niveau des ganglions rénaux, contrôlés par la suractivité du système sympathique (Figure 19).

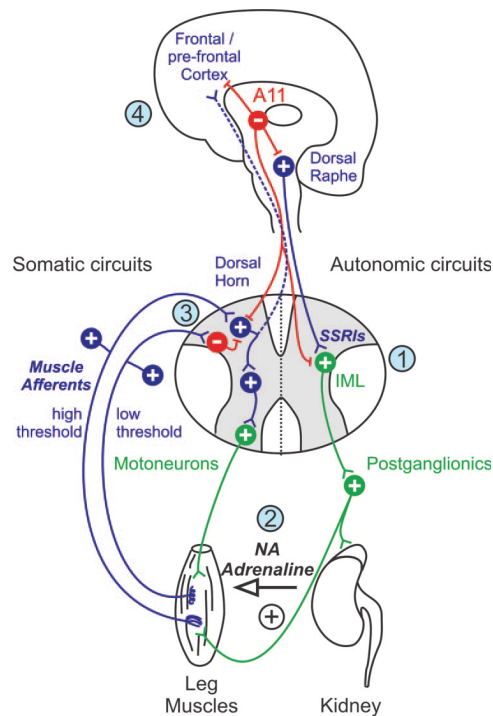


Figure 19 | Schéma des projections du A11, de leurs interactions avec les circuits spinaux et des conséquences potentielles de leurs dysfonctionnements sur le SJSR.

(1) déséquilibre de la balance 5-HT/DA sur les neurones pré-ganglionnaires de l'IML (2) Hypothèse sur l'augmentation de libération de NA résultant de l'excitabilité augmentée du système sympathique menant à l'activation aberrante des fibres musculaires (3) Transmission de l'activation aberrante des fibres musculaires (4) Contribution possible du CPF. D'après (Clemens et al., 2006)

- **Conséquence sur le circuit somatosensoriel**

Comme déjà énoncé, les muscles envoient des afférences au niveau de la corne dorsale pour informer de l'état de tension ou contraction musculaire. Ces informations passent par différentes fibres de hauts ou bas seuils. C'est au niveau de la corne dorsale superficielle que l'information des afférences musculaires de haut seuil arrive pour être transférée au cerveau (Seagrove et al., 2004). Une perte du contrôle descendant dopaminergique inhibiteur entraîne une transmission de l'information ascendante aberrante des fibres

musculaires ce qui finalement, mène à des troubles du mouvement. Il est possible que la perception de ces troubles par le cortex puisse être exacerbée par une modulation défaillante du A11 via des processus sensoriels du cortex frontal ou pré-frontale (Figure 20).

Pour conclure, la dopamine spinale, émanant d'une source majoritairement, voire uniquement, sous-corticale (le A11) joue un rôle tant dans la modulation des composantes motrices que sensorielles. Un dysfonctionnement des voies descendantes dopaminergiques peut à lui seul engendrer une physiopathologie tel que le SJSR.

Cependant tous les mécanismes par lesquels la dopamine exerce ses actions variées ne sont pas encore clairement connus. L'implication des récepteurs à la dopamine est étudiée de façon restreinte également, mais beaucoup d'éléments mettent en avant leurs expressions au niveau spinal ainsi que l'importance de ces récepteurs dans une grande variété de comportements. En effet, en fonction des récepteurs que la dopamine va activer, (D1 à D5) les effets modulateurs de celle-ci peuvent être opposés.

OBJECTIFS

La matière grise de la moelle spinale est organisée avec un haut niveau d'hétérogénéité et les réseaux neuronaux impliqués dans les composantes sensorimotrices sont très complexes. Comme il a été rapporté dans cette introduction, des études ont montré que certains de ces réseaux étaient modulés par la dopamine, notamment via les D2R et qu'un dysfonctionnement de la voie diencephalospinale pouvait être à l'origine de certains symptômes que l'on retrouve dans la pathologie du SJSR par exemple. Cependant, les mécanismes par lesquels la modulation dopaminergique se fait ne sont pas clairement compris. De plus, bien que la distribution des D2R spinaux ait été adressée par des approches d'hybridation in situ dans de précédentes études, l'identité cellulaire des neurones D2R-positifs n'est pas encore connue. Au vu de l'hétérogénéité des populations neuronales, il est important d'apporter une approche plus spécifique pour connaître les caractéristiques moléculaires des neurones exprimant D2R.

Le premier objectif de ce travail de thèse est de préciser l'identité cellulaire et moléculaire des cellules D2R-positives au niveau lombaire de la moelle spinale de souris, afin de réaliser un état des lieux précis pouvant ouvrir des portes quant aux futures approches fonctionnelles. Pour aller plus loin dans cette caractérisation, nous avons aussi décidé d'évaluer le rôle des D2R même au niveau de la moelle spinale dans les composantes sensorielles et motrices. Enfin, une étude a été menée en parallèle, visant à évaluer l'impact d'une sur-activation du système monoaminergique sur la moelle spinale.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles, âgées de minimum 8 semaines (Table A). Les lignées de souris transgéniques sont élevées en condition EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique). Les animaux sont hébergés sur portoir ventilé dans une pièce dont la température (22°C) ainsi que le cycle jour/nuit sont contrôlés. L'utilisation des animaux s'est faite en accord avec la directive 2010/63/UE et dans le respect des règles éthiques associées. Tous les animaux utilisés sont associés à des saisines validées.

Table A : Liste des lignées de souris utilisées

Lignée	n	Source
C57Bl6	74	Charles River/Janvie
Drd2-Cre	4	Tg(Drd2-cre)ER44Gsat
Drd2-Cre:RiboTag	26	(Puighermanal et al., 2015)
Drd2-f/f	24	Drd2tm ^{1Smoc}
Gad2-eGFP	4	Tg(Gad2-eGFP)DJ31Gsat
GlyT2-eGFP	4	Tg(Slc6a5-eGFP)1Uze

II. Traitements

Les composés pharmacologiques utilisés sont référencés dans la Table B, Ils ont tous été préparés dans une solution de 0,9% NaCl (solution saline).

Tableau B | Liste des composés pharmacologiques utilisés

Drogues	Concentration (mg/kg)	Volume d'injection	Voie d'injection
d-amphétamine	10	0,1 ml/kg	i.p.
d-amphétamine	1,6	5 µL	i.t.
Méthylphénidate	15	0,1 ml/kg	i.p.
Cocaïne	15	0,1 ml/kg	i.p.
Dizocilpine	0,3	0,1 ml/kg	i.p.
Morphine	5	0,1 ml/kg	s.c.
Imipramine	10	0,1 ml/kg	i.p.
Desipramine	15	0,1 ml/kg	i.p.
GBR12783	15	0,1 ml/kg	i.p.
SCH23390	0,1	0,1 ml/kg	i.p.

i.p : Intra-péritonéale ; i.t : Intratéchale ; s.c : Sous cutanée

Toutes les expériences sont précédées de 3 jours d'habituation durant lesquelles les souris sont manipulées et reçoivent des injections de solution saline (2 injections par jour matin et soir pendant 3 jours consécutifs). La Figure 21 résume les différents protocoles expérimentaux utilisés.

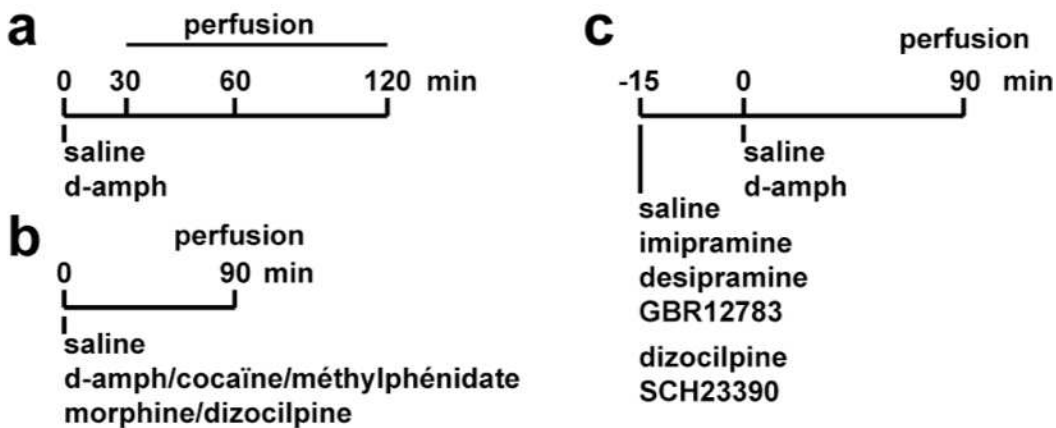


Figure 20 | Protocoles expérimentaux utilisés

(a) Protocole utilisé pour évaluer l'évolution de l'induction de pS32-cFos par administration de d-amphétamine en fonction du temps (b) Protocole utilisé pour évaluer l'effet d'autres psychostimulants et drogues sur l'induction de pS32-cFos (c) Protocole utilisé pour la pharmacologie

III. Immunofluorescence

III.1. Immunofluorescence sur coupes

III.1.1 Préparation des tissus

Les souris sont rapidement anesthésiées par administration d'Euthasol (340 mg/kg, i.p.) avant perfusion intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% (0-4°C) permettant de fixer les tissus. Après dissection de la colonne vertébrale, la moelle spinale est extraite et post-fixée à 4°C dans de la PFA 4% pendant la nuit. Les moelles sont ensuite incluses dans une solution d'agarose 4%. Les coupes saggitales de segments lombaires, d'une épaisseur de 40 µm, sont réalisées à l'aide d'un vibratome (*Leica VT 1000S*) et conservées dans une solution cryoprotectrice (30% Ethylene glycol, 30% Glycérol, 10% TB). Les coupes sont stockées à -20°C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées.

III.1.2 Protocole de marquage

Les coupes sélectionnées sont tout d'abord rincées trois fois 10 min dans une solution de TBS 1X, à température ambiante. S'en suit une période de 15 min durant laquelle, les coupes seront perméabilisées dans une solution de TBS contenant du Triton (10X). Après trois nouveaux rinçages de 10 min (TBS 1X), les coupes sont incubées pendant 60 min dans une solution de blocage contenant de la BSA (3%). Cette étape précède l'incubation des coupes avec les anticorps primaires (Table C). Ceux-ci sont préparés dans une solution de TBS contenant de la BSA (1%) et du Triton (0,1%). Les tranches sont alors incubées à 4°C de 24h à 48h.

Tableau C | Liste des anticorps primaires

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
HA	Souris	1 :1000	Biologend
HA	Lapin	1 :500	Rockland
Parvalbumine	Souris	1 :500	Millipore
Parvalbumine	Lapin	1 :1000	Swant
Calbindine-D28k	Souris	1 :500	Swant
Calbindine-D28k	Lapin	1 :1000	Swant
Calretinine	Souris	1 :500	Swant
Calretinine	Lapin	1 :1000	Swant
GFP	Poulet	1 :1000	Life Technologies
RFP	Lapin	1 :1000	MBL
ChAT	Lapin	1 :1000	Millipore
NeuN	Souris	1 :500	Millipore
Iba1	Lapin	1 :500	
GFAP	Lapin	1 :1000	Dako
TH	Lapin	1 :500	Millipore
PKC γ	Cobaye	1 :1000	Frontier Institut
pS32-cFos	Lapin	1 :500	Cell Signaling

Après la période d'incubation avec les anticorps primaires, les coupes sont à nouveau rincées trois fois 10 min dans une solution de TBS 1X, avant d'être incubées pendant 45 min à température ambiante avec les anticorps secondaires (Table D). Deux séries de rinçages de 10 min au TBS 1X puis au TB 1X précèdent le montage entre lames et lamelles avec le milieu de montage DPX.

Tableau D | Liste des anticorps secondaires

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur	Références
Anti souris – A488	Chèvre	1:500	Invitrogen	A11001
Anti souris – Cy3	Chèvre	1:500	jackson immunoresearch	115-165-075
Anti lapin – Cy3	Chèvre	1:500	Invitrogen	A10520
Anti lapin – A488	Chèvre	1:500	Invitrogen	A11034
Anti Cobaye - A647	Chèvre	1:500	Invitrogen	A21450
Anti-Poulet – A488	Chèvre	1:500	Invitrogen	A11039

III.2. Immunofluorescence sur organe entier : iDISCO

La méthodologie iDISCO permet de réaliser des immunomarquages sur organes entiers et de les imager en 3D.

III.2.1 Préparation des échantillons

La technique iDisco a été réalisée sur des moelles épinières de souris adultes de la lignée *Drd2-Cre:Ribotag*. La préparation des tissus est identique à celle décrite en III.1.a. Une

fois extraites les moelles sont post-fixées pendant 3h à température ambiante avant d'être stockées à 4°C dans du PBS 1X, jusqu'à utilisation.

III.2.2 Protocole iDISCO

Étape 1 : Déshydratation/Décoloration/Réhydratation

Dans un premier temps, les moelles ont été dans un premier temps déshydratées dans des bains successifs de méthanol (50%, 80% et 100%). Chaque bain d'une durée de 90 min a été réalisé à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été incubés toute la nuit à 4°C dans une solution de méthanol et H₂O₂ (6%) afin de décolorer les tissus. Après cette étape, les échantillons ont été réhydratés dans des bains successifs de méthanol (100%, 80% et 50% ; 90 min à température ambiante).

Étape 2 : Blocage et perméabilisation

Les échantillons ont ensuite été incubés dans du PBSG-T (gélatine 0,2%, Triton X-100 0,5% dans du PBS) à température ambiante, pendant 4 jours.

Étape 3 : Incubation avec les anticorps

L'étape d'incubation se fait à 37°C, en rotation (70 rpm), de façon à faciliter la pénétration de l'anticorps. Les moelles ont été incubées pendant deux semaines dans une solution de PBSG-T (gélatine 0,2%, Triton X-100 0,5% dans du PBS) et de saponine 0,1% (10 µg/ml) contenant l'anticorps primaire de souris anti-HA. Après 6 rinçages au PBSG-T (24h à température ambiante et en rotation), les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire préparé dans une solution de PBSG-T (gélatine 0,2%, Triton X-100 0,5% dans du PBS) et de saponine 0,1% (10 µg/ml). Les échantillons sont laissés en rotation (70 rpm)

à 37°C pendant 2 jours puis rincés à nouveau 6 fois dans du PBSG-T avant d'être stockés à 4°C jusqu'à l'étape de transparisation.

Étape 4 : Transparisation

Avant de commencer cette étape, les tissus sont transférés dans des tubes coniques de 15 ml résistants au Benzyl Ether (DBE). Tous les réactifs utilisés ici doivent être manipulés sous hotte et avec précaution. Pour chacune des incubations suivantes, les échantillons sont placés en rotation (12rpm) à température ambiante. Les tissus sont successivement incubés dans les solutions suivantes : Tetrahydrofuran (THF) 50% pendant une nuit, THF 80% pendant 1 ou 2h, THF 100% pendant 1 ou 2h (ce dernier bain étant répété deux fois). Puis, les échantillons sont transférés dans une solution de Dichlorometane (DMC) 100% pendant 30 min (l'échantillon doit couler au fond du tube, il est possible d'attendre plus de 30 minutes si nécessaire). Enfin, les tissus sont incubés quelques heures dans du DBE 100% jusqu'à devenir transparents. Les échantillons peuvent être conservés dans le DBE à température ambiante et à l'abri de la lumière. Notons que les différentes solutions de THF sont diluées dans de l'H₂O

IV. Hybridation in situ fluorescente multiplexée

Cette méthodologie (RNAscope), basée sur un système d'amplification multiplexe qui augmente le rapport signal sur bruit, permet de réaliser l'hybridation in situ simultanée de plusieurs gènes d'intérêts.

IV.1 Préparation des tissus

Après extraction, les moelles perfusées sont post-fixées 4h dans la PFA 4% à température ambiante, puis rincées dans une solution de PBS 1X. Les moelles sont ensuite immergées

dans des bains de concentration croissante de sucrose (10% pendant 4h, 20% pendant 6h et 30% pendant 24h) sous agitation à 4°C. Les moelles sont essuyées avant l'enrobage en OCT (Optimal Cutting Temperature). Les moelles enrobées dans l'OCT sont ensuite congelées dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les moelles sont stockées à -80°C jusqu'à la coupe. Cette dernière s'effectue à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050S). Des coupes de 14 µm sont montées directement sur lame « Superfrost ». Les lames ainsi prêtes à l'emploi peuvent être stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.2 Protocole

Les tissus préparés comme précédemment décrit doivent être sortis à température ambiante quelques minutes avant de commencer. Le protocole s'effectue sur deux jours.

JOUR 1 : Les lames sont mises sur un support résistant et incubées à 37°C dans un four *HybEZ II Oven* pendant 1h afin d'assurer la bonne adhésion des coupes sur les lames. Un lavage de 5 minutes au PBS 1X est ensuite réalisé, avant d'ajouter 80µL d'hydrogène peroxydase par tranche. L'incubation se fait à température ambiante pendant 15 minutes. Après avoir retiré l'hydrogène peroxydase, les tranches sont rincées 2 fois à l'eau distillée. La deuxième étape consiste au démasquage des sites grâce au réactif RNAscope Target Retrieval 1X. Ce dernier est porté à ébullition maximum 15 minutes avant d'y plonger les lames pendant 5 minutes. Puis, les tranches sont rapidement rincées à l'eau distillée avant d'être plongées quelques instants dans de l'éthanol 100% pour déshydratation. Les lames sont ensuite séchées à température ambiante. Une barrière hydrophobe peut alors être dessinée autour des tranches (3 à 4 passages au *DAKOpen*). Environ 2 ou 3h de séchage à température ambiante sont nécessaires avant de poursuivre le protocole. Ensuite, un

papier humidifié avec de l'eau distillée est placé dans le support et incubé à 40°C pendant une demie heure de façon à créer une chambre humide pour le reste de l'expérience. On y place ensuite les lames, avec 80µL de protéase 3 par tranche, que l'on incube pendant 30 minutes à 40°C. Puis, un rinçage à l'eau distillée est réalisé. Les sondes (tableau E) sont préalablement préparées. Pour ce faire il faut les chauffer pendant 10 minutes au bain-marie à 40°C, puis les diluer selon les proportions suivantes : 1 volume de C2, 1 volume de C3 dans 50 volume de C1 (ou de *probe diluent*, solution de dilution des sondes). Les sondes ainsi préparées peuvent être stockées jusqu'à 6 mois à 4°C. Une fois le mix prêt, 80µL est déposé sur chaque tranche. Les lames sont ainsi mises à incuber à 40°C pendant 2h. Après quoi deux rinçages de 2 minutes au *Wash Buffer* sont réalisés. Ici, les lames peuvent être conservées toute la nuit dans du SSC 5X.

JOUR 2 : 80µL de Flv2Amp1 sont déposés sur chaque tranche et laissés en incubation à 40°C, toujours dans une chambre humide, pendant 30 minutes. Deux rinçages de 2 minutes au *Wash Buffer* sont ensuite réalisés. Cette étape est répétée successivement avec le Flv2Amp2 et Flv2Amp3. Pour Flv2Amp3, l'incubation est de 15 minutes seulement. Après le dernier rinçage, les lames sont incubées avec les HRPC. Cette étape se fait de manière séquentielle pour chacun des trois canaux en suivant les étapes suivantes : Incuber 15 minutes à 40°C avec l'HRPC1 d'abord. Ensuite incuber à 40°C avec le fluorophore choisi (fluorescéine, Cy3, Cy5,...) pendant 30 minutes. Enfin, le bloqueur *HRP blocker* est déposé sur les tranches, l'incubation à 40°C se fait pendant 15 minutes. Chacune de ces étapes est entrecoupée par deux rinçages de 2 minutes au *Wash Buffer*. Pour les HRPC2 et HRPC3, le même procédé est suivi, avec les fluorophores adaptés. Il

est important de noter que les fluorophores sont préalablement dilués à une concentration de 1 :1000 dans le *TSA buffer*. Enfin, du DAPI est déposé sur chaque tranche pendant 30 secondes à température ambiante. Puis, après avoir retiré le DAPI, des lamelles sont montées sur ces lames avec du Prolong gold comme milieu de montage. Les lames sont mises à sécher toute la nuit dans le noir à 4°C.

Tableau E | Liste des sondes utilisées

Sondes (gène)	Sondes (protéine)	Référence
<i>Drd2</i>	D2R	Mm-Drd2-C2
<i>slc32a1</i>	VGAT	Mm-slc32a1-C2
<i>Slc17a6</i>	VGLUT2	Mm-slc17a6-C2
<i>Slc17a7</i>	VGLUT1	Mm-slc17a7-C3
<i>Penk</i>	ENKEPHALINE	Mm-penk
<i>Slc6a5</i>	GLYT2	Mm-slc6a5
<i>Tac1</i>	SUBSTANCE P	Mm-tac1

V. Acquisition des images et quantification

Les images issues des différents protocoles précédemment cités ont été acquises au microscope confocal *Zeiss LSM-780*. Les grossissements 10X et 20X ont été utilisés pour imager le segment lombaire de la moelle épinière. Ont été réalisés ; des mosaïques ou z-stack pour imager les moelles entière (cas pour la Figure 2) ainsi que des snaps au 10X pour imager les hémisphères des moelles spinales.

Enfin, les images ont été traitées avec ImageJ. Les quantifications ont été effectuées avec Adobe Photoshop CS5. Les quantifications ont été effectuées par hémisphère de moelle

spinale, et chaque hémisphère a été segmenté par laminae, manuellement. En moyenne 4 coupes de moelle d'une même souris ont été comptabilisées.

Pour la technique du iDisco, les tissus sont imagés au microscope *Light Sheet* et les images ont ensuite été traitées via le logiciel *Imaris*.

VI. Méthodologie RiboTag

Cette technique a été réalisée sur la lignée transgénique de souris *Drd2-Cre:Ribotag*. Ces souris expriment la sous-unité ribosomale Rpl22 étiquetée hémagglutinine (HA) dans les cellules exprimant le récepteur D2. Ce modèle transgénique permet donc d'isoler, après immunoprécipitation de l'étiquette, les ARN messagers (ARNm) enrichis dans les cellules exprimant le récepteur D2.

VI.1 Immunoprécipitation des Polysomes

Après dislocation cervicale, le corps de la souris est immergé pendant 4 sec dans de l'azote liquide. La colonne vertébrale est ensuite isolée sur glace et la moelle rapidement extraite. Les segments lombaires de moelle spinale de 3 souris sont regroupés puis homogénéisés avec une tige en verre dans 1 ml d'une solution tampon de polysome (50 mM Tris, pH7.4, 100 mM KCl, 12 mM MgCl₂ et 1% NP-40 avec 1 mM DTT, 1 mg/ml héparine, 100 µg/ml cycloheximide, 200 U/ml RNaseOUT, et un mix d'inhibiteurs de protéases). Les échantillons sont ensuite centrifugés (10000xg) à 4°C pendant 10 minutes pour recueillir le surnageant. 100 µl de chaque surnageant (input) est transféré dans un nouveau tube et sera utilisé pour valider l'enrichissement relatif des ARNm isolés après immunoprécipitation des ribosomes. L'anticorps anti-HA (5 µl/échantillon) est ajouté au surnageant restant et incubé pendant une nuit sur roue à 4°C. Le jour suivant, des billes

magnétiques sont ajoutées aux échantillons, l'ensemble est incubé pendant une nuit sur roue à 4°C. Le troisième jour, les billes magnétiques sont lavées sur deux périodes de 10 min dans un portoir aimanté dans un tampon à forte teneur en sel (50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 1% NP-40, 1 mM DTT et 100 µg/ml cycloheximide). Après lavage, 350 µl de tampon Qiagen RLT contenant du β-mercaptoéthanol ont été ajoutés aux échantillons (input et pellet). L'ARNm est ensuite extrait à l'aide du kit Qiagen RNeasy Micro et Mini et quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop 1000).

VI.2. Synthèse d'ADNc et qRT-PCR

La synthèse d'ADNc est réalisée sur les inputs (10% de l'homogénat) et les pellets (ribosomes immunoprécipités) à l'aide du kit SuperScript VILO cDNA synthesis (Invitrogen). L'ADNc résultant a permis de réaliser la qRT-PCR en utilisant le kit SYBR Green PCR mix sur le système de PCR en temps réel LC480 (Roche) et les séquences d'amorces détaillées dans la Table F. Les données sont analysées avec le logiciel LightCycler 480 (Roche) et sont exprimées en comparant le turn-over des gènes testés dans les fractions correspondant aux pellets et inputs.

Tableau F | Liste des séquences des amorces utilisées pour les qRT-PCR

Gènes	Protéine	Séquences
<i>β-actin</i>	β-Actin	F : CCCCAGCCAAGAAAGCTAT R : GCCCCACCGTGTGACATC
<i>Gadph</i>	GAPDH	F : CAACTACATGGTCTACATGTTCCA R : CCCATTCTCGGCCTTGACT
<i>Slc32a1</i>	VGAT	F : TCACGACAAACCCAAGATCAC R : GTCTTCGTTCTCCTCGTACAG
<i>Gad1</i>	GAD	F : TTGTGCTTTGCTGTGTTTTAGAGA

		R : CCCCCTGCCCAAAGATAGAC
Slc18a3	VACHT	F : GGCCTCGCTACCCCACAGAA R : CCCAGGCCAATAAGCAGCGG
Slc17a6	VGLUT2	F : CGCTGTCGGGGATGGTTTGC R : GTGGACGAGTGCAGCAATGAGG
Penk	Enképhaline	F : CTACAGTGCAGGCGGAATGC R : GTCCTTCACATTCCAGTGTGC
Chat	CHAT	F : CCATTGTGAAGCGGTTTTGGG R : GCCAGGCGGTTGTTTAGATACA
Drd2	D2R	F : CTCTTTGGACTCAACAACACAGA R : AAGGGCACGTAGAACGAGAC
Cnp	CNP	F : GCTGCACTGTACAACCAAATTCTG R : ACCTCCTGCTGGGCGTATT
Gfap	GFAP	F : AGCGAGCGTGCAGAGATGA R : AGGAAGCGGACCTTCTCGAT
Aif1	Iba1	F : CCCCAGCCAAGAAAGCTAT R : GCCCCACCGTGTGACATC
Itgam	cd111-b	F : ATGGTCACCTCCTGCTTGTGAG R : CCAGCAGTGATGAGAGCCAAGA
S100b	S-100B	F : TTCCACCAGTACTCCGGGCG R : GCGACGAAGGCCATGAACTCC
Tlx3	TLX3	F : AAATGACGGACGCGCAGGTC R : GAAGGCGTCGTGTTGCAGCT
Pax2	PAX2	F : CCATCCCCAGTACACCGCCT R : TCCCCGCGGTAAGTAGTGGC
Tac1	Substance P	F : TGGACTAATGGGCAAAGAGC R : CGTTCACTGCTCACTGACAC
Calb1	Calbindine	F : AGGAAAGGAGCTGCAGAACT R : CTCTCTGTCCATATTGATCCACA
Pvalb	Parvalbumine	F : TCGATGACAGACGTGCTCAG R : CTTACCTCATCCGGGTTCT
Calb2	Calretinine	F : TGAGAATGAACTGGACGCCCTC R : GTAGAGCTTCCCTGCCTCGG
Slc17a7	VGLUT1	F : TGTGCCCATCATCGTGGGT R : CGCTCATCTCCTCCGGCTCT
Slc6a5	GLYT2	F : TGATGCTCGCTGCTCCGTT R : CCCGCGGTGCTGAGCTAAGA

VII. Injection intraspinale

Les souris sont anesthésiées avec un mélange Kétamine (10 mg/ml) et Xylazine (1 mg/ml). Afin de prévenir une possible déshydratation, les souris reçoivent une injection saline (0,9% NaCl, s.c.) et une pommade ophtalmologique (Allergan) est appliquée sur les yeux. Après avoir rasé et nettoyé à la Bétadine le dos des souris, celles-ci sont placées sur le ventre afin de réaliser une incision d'environ 2 cm dans l'axe de la colonne vertébrale. Les muscles entourant cette dernière sont délicatement enlevés au scalpel afin d'avoir un meilleur accès à l'os de la colonne. Les souris sont placées en surélévation sur le cadre stéréotaxique (World Precision Instrument WPI), tenues au niveau lombaire de la colonne par une pince (adaptateur spinal pour souris WPI). Cette posture permet d'avoir un accès à la moelle épinière sans laminectomie. En effet, la courbure de la souris ainsi positionnée offre un espace suffisant entre deux vertèbres pour une injection intraspinale. Les muscles restants et les tissus conjonctifs au niveau des segments lombaires L2-L4 sont retirés jusqu'à ce que la moelle épinière soit visible. Une pipette de verre (diamètre de 8-10 μm), est préalablement adaptée à une seringue d'injection (65 RN 5 μl , Hamilton), placée sur un injecteur (UMP3 UltraMicroPump, WPI), le tout étant relié à un contrôleur digital des repères dans les trois axes (WPI). Cette pipette est alors placée bilatéralement entre 0,350 μm et 0,400 μm par rapport au vaisseau central de la moelle épinière, et à 350 μm de profondeur. Ainsi, les vecteurs viraux (Table G) ne seront délivrés qu'au niveau des lamina de la corne dorsale. Une fois la pipette de verre correctement positionnée, 2 min d'attente sont nécessaires avant d'injecter les vecteurs viraux (500 nl, 100 nl/min). Une période de 5 min post-injection est observée avant de relever lentement la pipette (0,300 μm /30 sec). Enfin, après avoir appliqué quelques gouttes de solution Saline 0,9% au

niveau de la plaie, la peau est suturée avec du fils Vicryl 6-0 (Ethicon). L'animal est surveillé jusqu'à son réveil. Après cette procédure chirurgicale, les souris sont stabulées pendant 3 semaines, période pendant laquelle des visites de contrôles quotidiennes sont effectuées.

Tableau G | Liste des vecteurs viraux utilisés

Virus	Titrage
AAVDJ.CamKII.Cre-mCherry	1.10^{13}
AAVDJ.CamKII.mCherry	1.10^{13}
AAV9.hEF1a.lox.mCherry.lox.mTFP1.lox.WPRE.hGH-InvCheTF	$1,93.10^{13}$

VII. Analyse comportementale : Activité locomotrice

Les différents tests comportementaux décrits ci-dessous ont été réalisés sur des animaux âgés au minimum de 11 semaines, mâles et femelles.

VII.1 Couloir circulaire

Le couloir circulaire (*Imetronic, France*) permet de mesurer l'activité motrice horizontale et verticale (redressements) de l'animal de façon spontanée. Il est composé de deux cylindres amovibles en PVC transparent. Les souris sont placées dans ce couloir circulaire pendant 90 minutes, temps pendant lequel l'animal est libre de se déplacer. Ce dispositif est équipé de plusieurs senseurs infrarouges qui détectent les mouvements de l'animal.

VII.2 Rotarod

La coordination motrice a été évaluée par le test du rotarod (Bioseb, France). Les animaux sont dans un premier temps habitués pendant deux jours à l'appareil. Cette phase d'habituatation comprend 6 sessions (3 sessions par jour espacées de 20 min) durant lesquelles les souris ont été placées sur la barre rotative (4 rpm) pendant 1 min. Le jour du test, les souris sont placées sur la barre rotative qui cette fois accélère progressivement (de 4 rpm à 30 rpm) pendant 5 min. Cette séquence qui correspond à une session est répétée 10 fois. La latence avant la chute ainsi que la vitesse de rotation au moment de la chute sont mesurées.

VII.3 Beam walking test

Ce test permet d'évaluer la coordination motrice fine de l'animal. Ce dernier est d'abord placé sur une tige en bois d'une longueur de 1 mètre et d'un diamètre de 3cm. Cette tige est positionnée à 40cm du sol. Les deux premières séances sont réservées à l'apprentissage. L'animal est libre de traverser d'un point A à un point B, et ce 3 fois à intervalle de temps réguliers (environ 15 minutes). Notons que le point de départ A est toujours le même pour chaque animal et qu'au point B, de la litière ainsi qu'une maison en plastique sont disposés de façon à réduire le stress de l'animal et à augmenter sa « volonté » de traverser la tige sur toute sa longueur. Le jour du test (jour3), l'animal effectue deux passages sur la tige de diamètre de 3cm, et deux passages sur une nouvelle tige en bois de 2cm de diamètre. Le temps passé sur la tige ainsi que le nombre de fois où la souris glisse avec ses pattes arrière sont mesurés. Enfin, un ratio entre le temps passé et le nombre de glissade est réalisé.

VII.4 Analyse des empreintes

Ce test permet de détecter des anomalies de la démarche. Les pattes de souris ont été trempées dans des peintures à base d'eau non toxiques (pattes antérieures en rouge et pattes postérieures en peinture noire). Les souris ont ensuite été autorisées à marcher sur une feuille de papier blanc disposée dans un couloir en carton (hauteur des murs 10 cm). Les souris sont entraînées les deux jours précédents le test. Chaque jour d'habituation comprend 2 sessions (matin/après-midi) pendant lesquelles l'animal traverse le couloir 3 fois. Avant chaque traversée, un pinceau est passé sous les pattes de l'animal et le pot de peinture est ouvert afin de familiariser les souris à l'odeur. En moyenne, 6 pas par animal ont été comptabilisés. Les distances d'un pas à l'autre entre les pattes arrière d'une part et les pattes avant d'autre part sont mesurées. Une moyenne entre les différents pas de l'animal est effectuée.

RESULTATS

ETUDE 1

Cette première étude avait pour objectif de réaliser une caractérisation anatomo-fonctionnelle des cellules de la moelle spinale exprimant les récepteurs dopaminergiques D2 (D2R). Après avoir analysé leur distribution au sein des différents segments spinaux, j'ai caractérisé leur identité cellulaire et moléculaire. Enfin, j'ai étudié les conséquences fonctionnelles de l'inactivation génétique des D2R spinaux. J'ai focalisé mon étude sur les segments lombaires de la moelle spinale.

I. Caractérisation anatomique et moléculaire des cellules spinales exprimant les D2R.

L'utilisation de la lignée de souris *Drd2-Cre:Ribotag* m'a permis de réaliser la caractérisation anatomique, cellulaire et moléculaire des cellules spinales exprimant les D2R. Ces souris permettent l'expression sélective de la sous unité ribosomale Rpl22 étiquetée avec l'hémagglutinine (HA) dans les cellules exprimant les D2R. En utilisant un anticorps anti-HA, j'ai donc pu marquer, d'une façon indirecte, les cellules D2R. La stratégie du Ribotag m'a également permis, après immunoprécipitation de l'étiquette HA, d'isoler les ARN messagers (ARNm) présents dans les cellules D2R-positives de la moelle spinale et d'évaluer par qRT-PCR l'enrichissement relatif de certains gènes de cette population cellulaire.

I.1 Distribution des cellules spinales exprimant les D2R

La technique de transparisation des tissus iDisco (*voir Matériels et Méthodes*) m'a permis de réaliser l'immunomarquage HA sur une moelle entière et d'analyser la distribution

spatiale des cellules spinales exprimant les D2R sur l'extension rostro-caudale de la moelle. Ainsi j'ai pu démontrer que les cellules exprimant les D2R étaient présentes dans tous les segments de la moelle spinale (cervical, thoracique, lombaire et sacré) et préférentiellement distribuées dans la corne dorsale (Figure 21a). Pour la suite de mon étude, j'ai focalisé mes analyses sur le segment lombaire de la moelle spinale. La quantification des cellules immunoréactives HA, au sein des différentes couches, a permis d'établir une cartographie précise de la distribution des cellules exprimant les D2R (Figure 21b). Ainsi, 67% des cellules D2R positives sont concentrées dans la corne dorsale de la moelle contre 23% dans la corne ventrale. Notons que l'on retrouve 10% de ces cellules D2R-positives au niveau du canal central (lamina X). Au sein de la corne dorsale, les D2R sont principalement exprimés dans des cellules des laminae II et III, où ils représentent respectivement ~27% et ~20% des cellules HA-positives (Figure 21c). Dans la corne ventrale, les cellules exprimant les D2R sont majoritairement retrouvées au niveau de la lamina VII (Figure 21c).

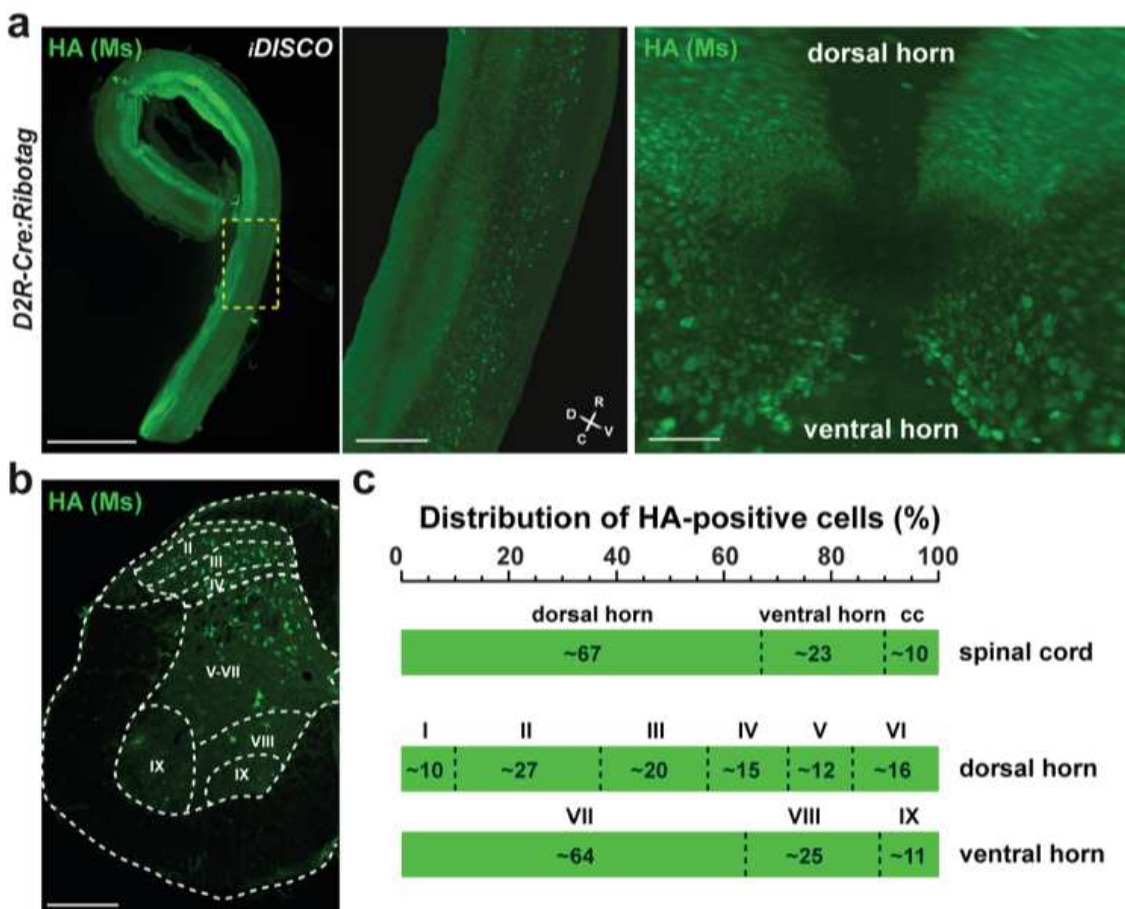


Figure 21 | Distribution des cellules HA au niveau lombaire de la moelle spinale.

(a) Images issues de la technique iDisco couplée à un marquage HA, réalisée sur une moelle spinale de souris *Drd2-Cre:Ribotag*. (b) Immunofluorescence anti-HA au niveau lombaire de la moelle spinale de souris *Drd2-Cre:Ribotag*. (c) Estimation du nombre de cellules HA-positives par lamina. Pourcentage calculé en fonction du nombre total de cellules HA-positives comptées (3737 cellules, n = 6 souris, n = 2 tranches par souris).

Afin de vérifier que le marquage HA observé n'était pas la conséquence d'une accumulation d'expression au cours du développement, j'ai injecté au niveau du segment lombaire de la moelle spinale de souris *Drd2-Cre*, un vecteur viral dont l'expression de la protéine fluorescente rouge dépend de l'activité de l'enzyme Cre-recombinase (AAV9-hEF1 α -DIO-XFP-InvCheTF) (Figure 22a). La détection d'immunofluorescence RFP m'a

permis de confirmer l'activité de la Cre-recombinase suggérant que le promoteur D2R est toujours actif à l'âge adulte (Figure 22b). De manière intéressante, la diversité morphologique des neurones marqués suite à l'injection du vecteur viral suggère que les D2R sont exprimés par différents types de cellules spinales (Figure 22c-f).

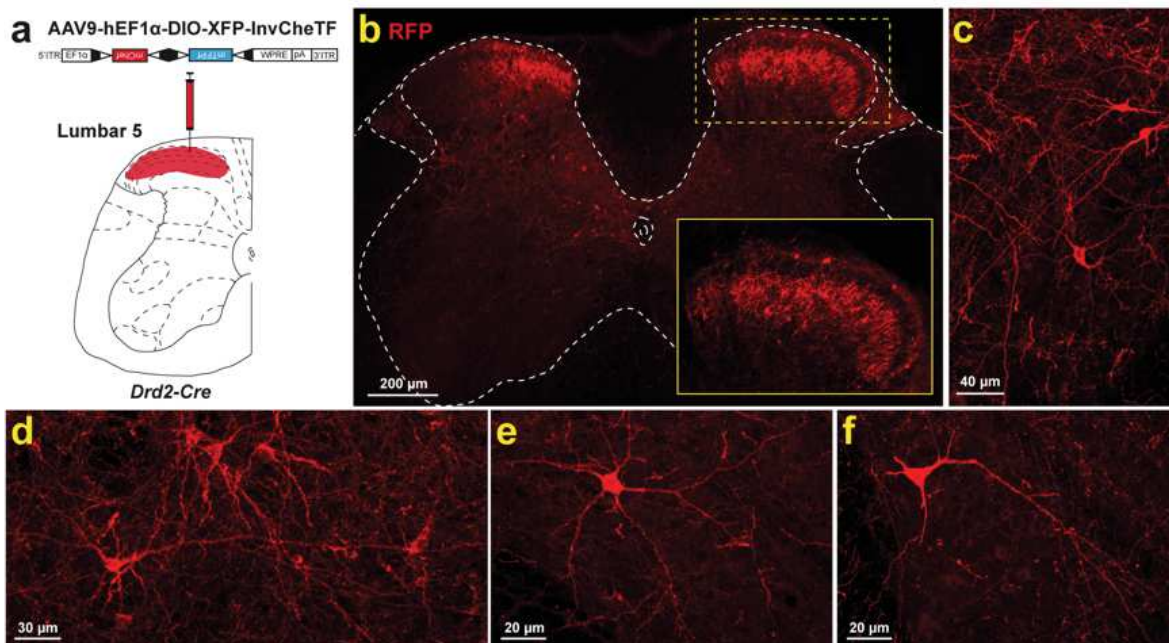


Figure 22 | Vérification de l'activité du promoteur Cre par injection intra-spinale de virus AAV9- hEF1 α -DIO-XFP-InvCherTF

(a) Recombinaison du virus AAV9-hEF1 α -DIO-XFP-InvCheTF au niveau lombaire de la moelle spinale de souris *Drd2-Cre*. (b-f) Exemples de cellules D2R-positives exprimant la protéine fluorescente rouge mCherry, révélée ici à l'aide d'un anticorps anti-RFP.

Afin de démontrer que les cellules D2R-positives expriment les ARNm du gène codant pour D2R, j'ai utilisé la méthodologie Ribotag (voir Matériels et Méthodes). Ainsi, l'analyse par qRT-PCR des transcrits purifiés après immunoprécipitation de l'étiquette HA m'a permis de démontrer que les ARNm du gène codant pour D2R étaient enrichis dans les cellules immunoréactives HA (Figure 23a, b).

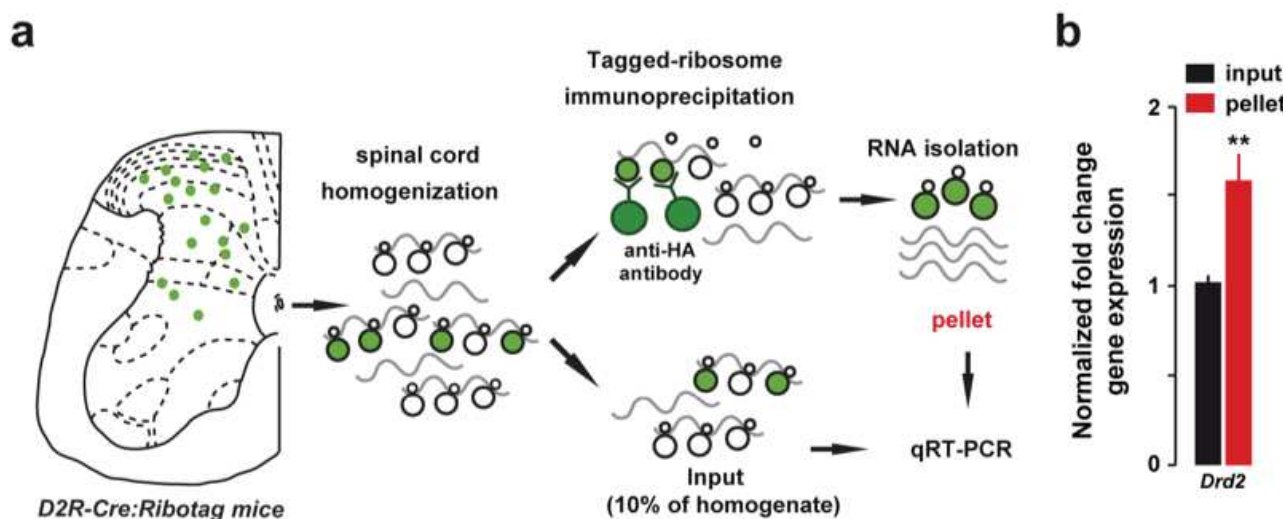


Figure 23 | Validation de l'enrichissement du gène *Drd2* dans les cellules HA-positives

(a) Schéma explicatif de la technique d'immunoprécipitation suivie d'une qRT-PCR sur la moelle spinale des souris *Drd2-Cre:Ribotag*. Détails de la méthode dans la section Matériels et Méthodes. (b) Comparaison par qRT-PCR de l'expression du gène *Drd2* entre les inputs et dans les pellets (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié).

1.2 Identité des cellules spinales exprimant les D2R

L'analyse du pourcentage de cellules HA exprimant le marqueur neuronal, NeuN (Fox-3) (Figure 24a) a permis de mettre en évidence que les D2R étaient préférentiellement exprimés par les neurones (~90% de co-localisation NeuN/HA) (Figure 24b). L'absence de cellules HA/GFAP- et HA/Iba1-positives suggère que les D2R spinaux ne sont pas exprimés par les cellules gliales (astrocytes) et la microglie (Figure 25a, b). Ces dernières observations ont été confirmées par l'utilisation de l'approche Ribotag qui a révélé que les cellules immunoréactives HA exprimaient peu ou pas les transcrits de gènes codant pour

des protéines enrichies dans les astrocytes (*Gfap*, *S100b*), la microglie (*Aif1*, *Irgam*) et les oligodendrocytes (*Cnp*) (Figure 26c).

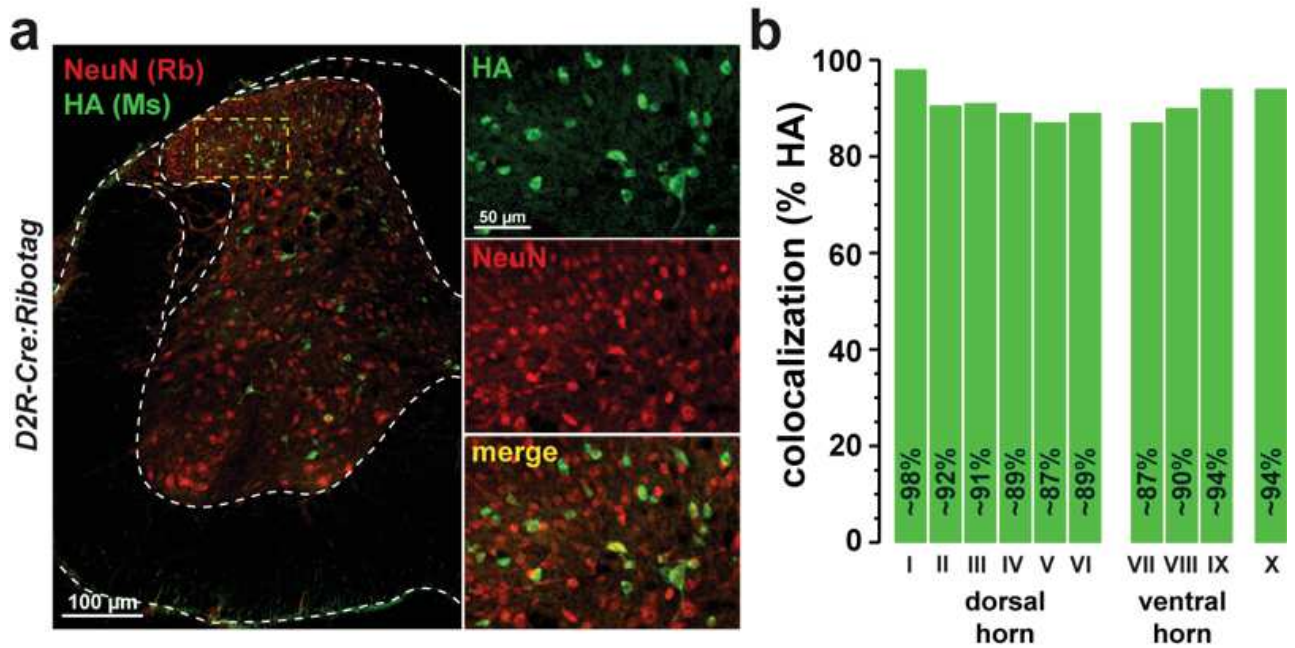


Figure 24 | Les cellules D2R de la moelle spinale expriment le marqueur neuronal NeuN

(a) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et NeuN (en rouge). (b) Estimation du nombre de cellules HA/NeuN-positives par couche. Pourcentage calculé en fonction du nombre total de cellules HA-positives comptées par couche (1732 cellules, n = 4 souris, n = 2-3 tranches par souris).

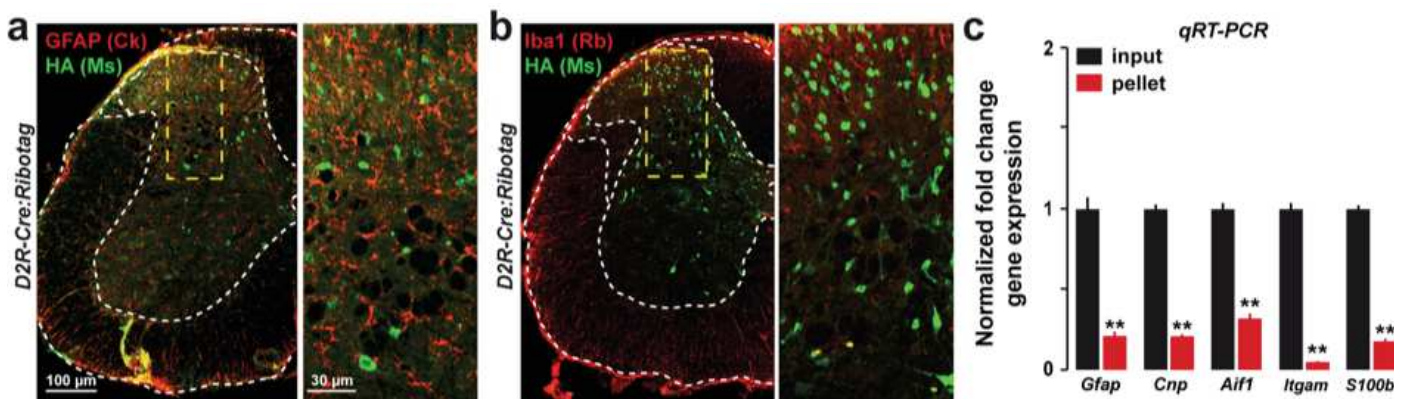


Figure 25 | Les D2R de la moelle spinale ne sont pas exprimés par les cellules gliales

(a) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et GFAP (marqueur des astrocytes en rouge). (b) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et Iba1 (marqueur de la microglie en rouge). (c) Analyse par qRT-PCR des niveaux d'expression de différents marqueurs des cellules gliales : astrocytes (*Gfap*, *S100b*), microglie (*Itgam*, *Aif1*) et oligodendrocytes (*Cnp*) dans les cellules D2R-positives (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié).

1.3 Identité moléculaire des neurones spinaux exprimant les D2R

Afin de déterminer l'identité des neurones exprimant les D2R, j'ai recherché si ceux-ci correspondaient préférentiellement à une population de neurones glutamatergiques (excitateurs) ou GABAergiques (inhibiteurs). Les anticorps de la plupart des marqueurs excitateurs ou inhibiteurs (transporteurs vésiculaires) ne permettant la visualisation que des fibres et non des corps cellulaires, il m'était impossible de répondre à cette question par des approches d'immunofluorescence. J'ai donc réalisé sur des segments lombaires de moelle de souris de type sauvage, des hybridations *in situ* fluorescentes multiplexées (RNAscope). Cette technique m'a permis de visualiser et d'estimer le degré de co-

localisation entre les ARNm des gènes codant pour les D2R (*Drd2*) et VGLUT2 (*Slc17a6*), un des transporteurs vésiculaires du glutamate (Figure 26a, b). Les résultats de mes quantifications ont permis d'établir que ~48% et ~77% des cellules *Drd2*-positives de la corne dorsale et ventrale, respectivement, expriment *Slc17a6* (Figure 26b). L'enrichissement dans les neurones spinaux exprimant D2R, de *Slc17a6* ainsi que de deux autres marqueurs de neurones excitateurs (*Slc17a7* et *Tlx3*), a été confirmé par qRT-PCR après purification des ARNm des cellules HA-positives de la moelle des souris *Drd2*-Cre:Ribotag (Figure 26c). Par ailleurs, le faible pourcentage de cellules HA/PKCγ suggère que les D2R spinaux ne sont que faiblement exprimés par les interneurons excitateurs PKCγ (Figure 27a, b).

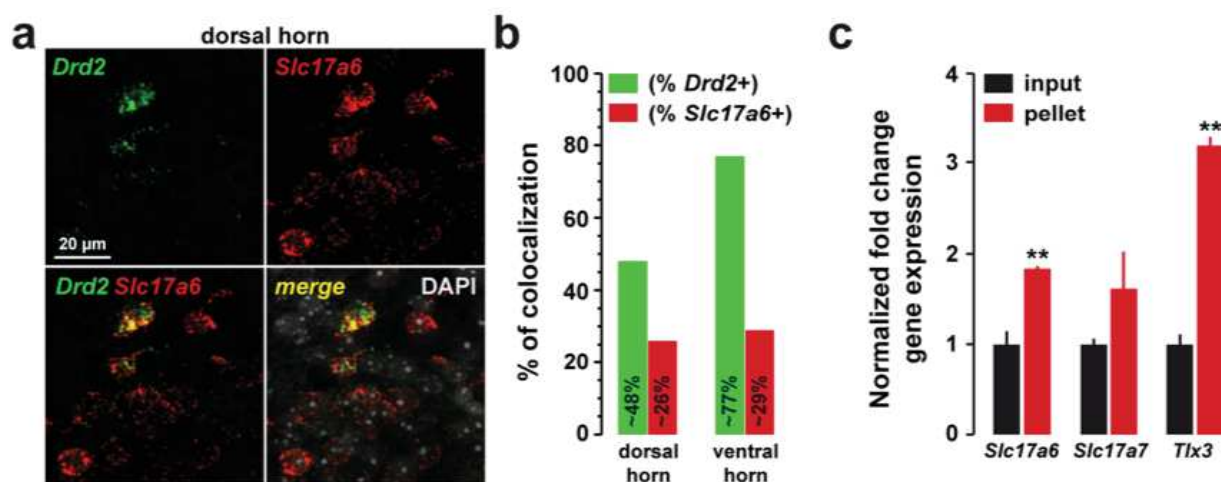


Figure 26 | Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones excitateurs

(a) Expression des ARNm de *Drd2* (en vert) et du marqueur excitateur *Slc17a6* (VGLUT2, en rouge). (b) Estimation du pourcentage de co-localisation entre *Drd2* et *Slc17a6* calculé par rapport au nombre total de cellules *Drd2*-positives (soit 472 dans la corne dorsale et 58 dans la corne ventrale) et *Slc17a6*-positives (soit 874 dans la corne dorsale et 149 dans la corne ventrale) comptées (n = 2 souris, n = 8 tranches/souris). (c) Analyse par qRT-PCR des niveaux d'expression des gènes *Slc17a6*, *Slc17a7* et *Tlx3* dans les cellules D2R-positives de la moelle (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié)

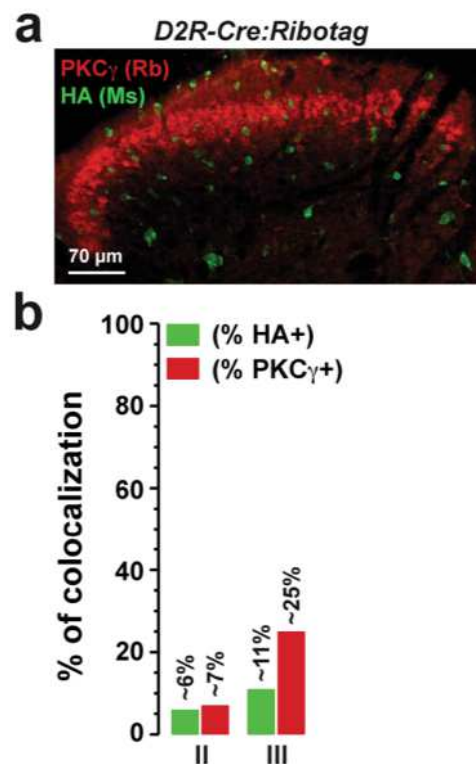


Figure 27 | Les D2R spinaux sont faiblement exprimés par les interneurons excitateurs PKC γ

(a) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et PKC γ (en rouge). (b) Estimation du pourcentage de neurones HA/PKC γ en fonction du nombre total de cellules HA ($n = 142$ et $n = 105$ dans les couches II et III, respectivement) et PKC γ ($n = 128$ et $n = 48$ dans les couches II et III, respectivement). ($n = 1$ souris, $n = 6$ tranches).

En utilisant des stratégies identiques, j'ai pu mettre en évidence que ~66% et ~44% des cellules de la corne dorsale et ventrale, respectivement, contenant *Drd2* exprimaient également *Slc32a1* (VGAT), *Gad1* et *Pax2*, trois gènes connus comme étant des marqueurs de neurones inhibiteurs (Figure 28a-c). Dans la moelle spinale, les principaux neurotransmetteurs inhibiteurs sont le GABA et la glycine. En combinant des approches d'hybridation *in situ* et d'analyse des transcrits par qRT-PCR, j'ai pu mettre en évidence que les neurones spinaux *Drd2* expriment pour une fraction d'entre eux *Slc6a5*, le gène du

transporteur à la glycine (GlyT2) (Figure 29a, b). En effet, au niveau de la corne dorsale, en moyenne 76% des neurones *Drd2*-positifs expriment *Slc6a5* (Figure 29b).

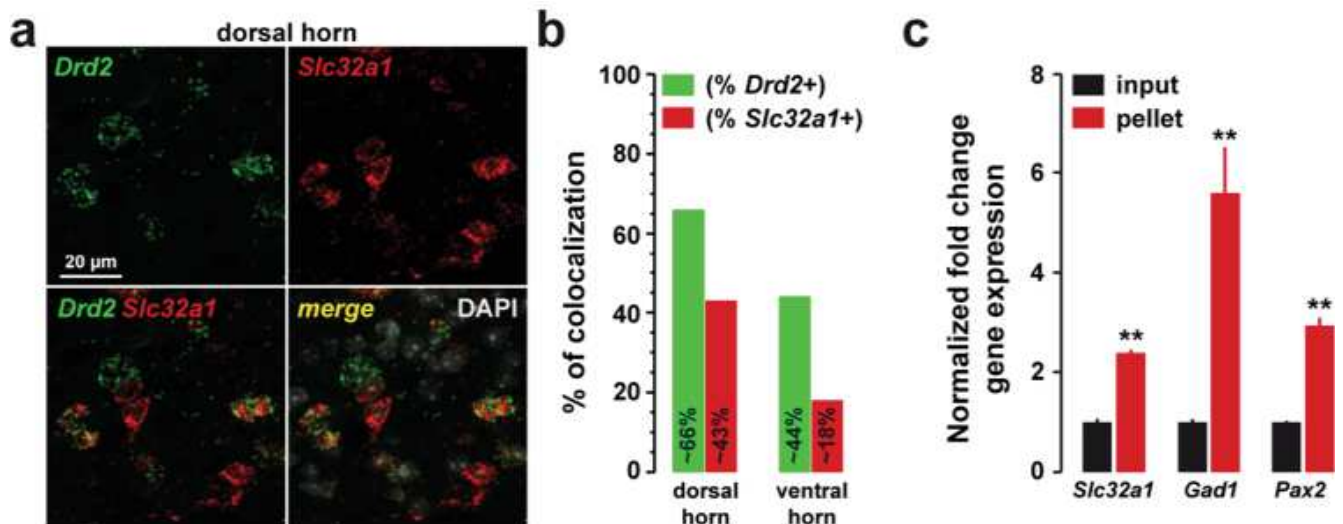


Figure 28 | Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones inhibiteurs

(a) Expression des ARNm de *Drd2* (en vert) et du marqueur inhibiteur *Slc32a1* (VGAT, en rouge). (b) Estimation du pourcentage de co-localisation entre *Drd2* et *Slc32a1* calculé par rapport au nombre total de cellules *Drd2*-positives (soit 431 dans la corne dorsale et 80 dans la corne ventrale) et *Slc32a1*-positives (soit 657 dans la corne dorsale et 198 dans la corne ventrale) comptées ($n = 2$ souris, $n = 6$ tranches/souris). (c) Analyse par qRT-PCR des niveaux d'expression des gènes *Slc32a1*, *Gad1* et *Pax2* dans les cellules D2R-positives de la moelle ($n = 15$ souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). ** $p < 0,01$ input vs pellet (test de Student non apparié).

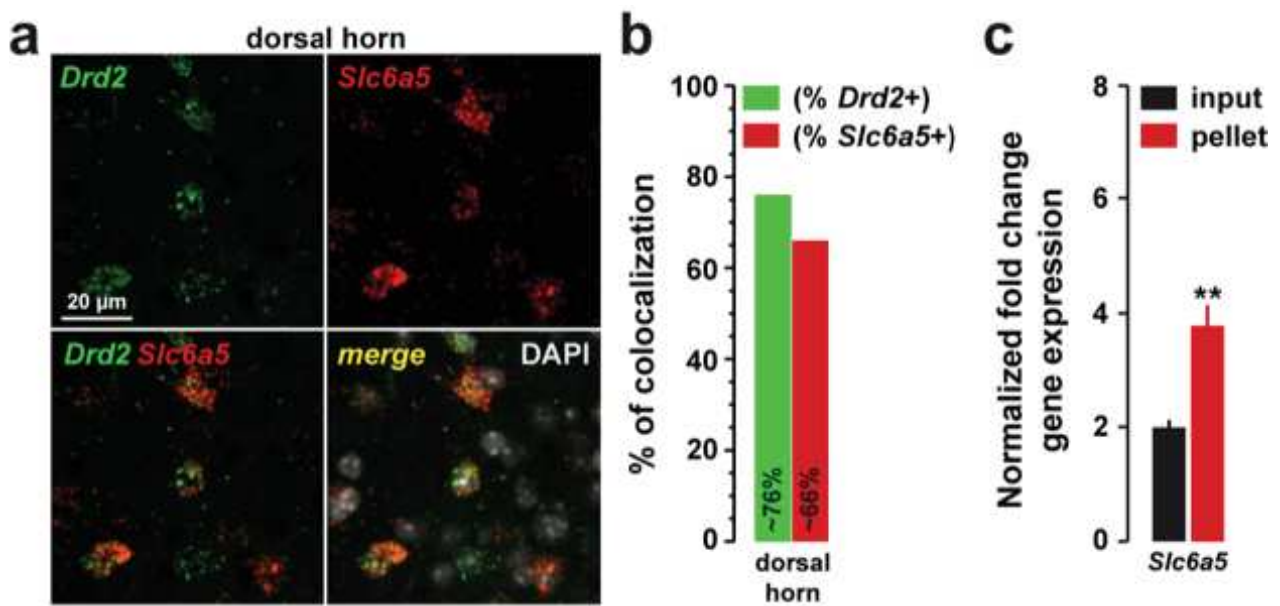


Figure 29 | Les D2R spinaux sont exprimés par des neurones inhibiteurs

(a) Expression des ARNm de *Drd2* (en vert) et du marqueur inhibiteurs *Slc6a5* (GlyT2, en rouge). (b) Estimation du pourcentage de cellules co-exprimant *Drd2* et *Slc6a5* calculé par rapport au nombre total de cellules *Drd2*-positives ($n = 160$) et *Slc6a5*-positives ($n = 184$) comptées. ($n = 2$ souris, $n = 3$ tranches/souris). (c) Analyse par qRT-PCR du niveau d'expression du gène *Slc6a5* dans les cellules D2R-positives de la moelle ($n = 15$ souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). ** $p < 0,01$ input vs pellet (test de Student non apparié).

Enfin, l'absence de co-localisation entre les cellules positives HA et ChAT (Figure 30a) ainsi que la très faible expression des ARNm des gènes codant pour des protéines enrichies dans les neurones cholinergiques (*Chat*, *Slc18a3*) (Figure 30b), suggèrent l'absence de D2R dans les motoneurones.

Pour résumer, l'ensemble de ces résultats suggèrent qu'au niveau du segment lombaire de la moelle, les D2R sont exprimés par des populations neuronales inhibitrices (GABAeriques et glycinergiques) et excitatrices (glutamatergiques) hétérogènes. En revanche, les motoneurones et les cellules gliales n'expriment pas les D2R.

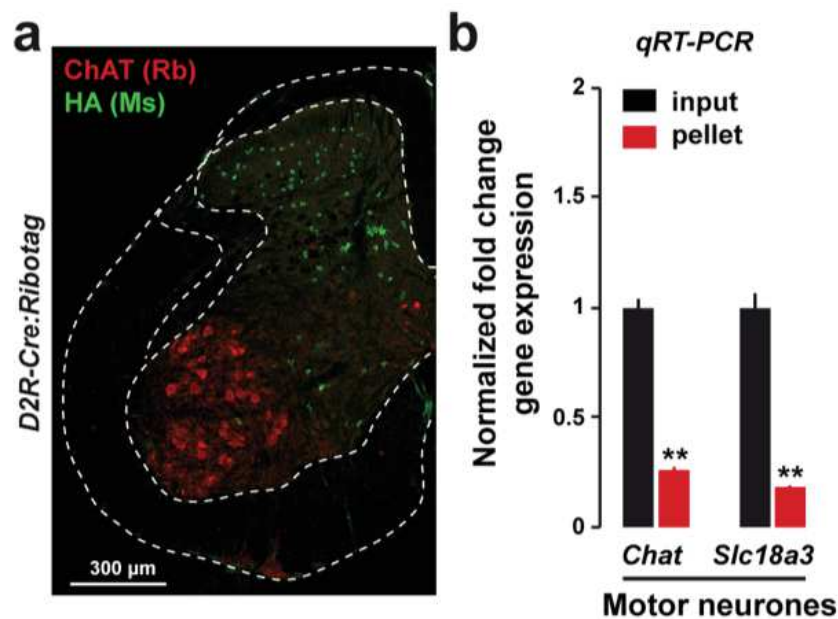


Figure 30 | Les D2R ne sont pas exprimés dans les motoneurones

(a) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et ChAT (en rouge). (b) Analyse par qRT-PCR du niveau d'expression des gènes *Chat* et *Slc18a3* dans les cellules D2R-positives de la moelle (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié).

I.4 Hétérogénéité moléculaire des neurones spinaux exprimant les D2R

- *Protéines liant le calcium (Calcium Binding Protein, CBP)*

Les CBP, telles que la calrétinine (CR), calbindine-D28k (CB) et parvalbumine (PV), sont des protéines permettant aux ions calcium d'exercer leurs actions physiologiques au niveau intracellulaire en jouant sur les cascades de signalisation dépendantes du calcium. Elles sont abondantes dans le système nerveux et ont une distribution spécifique et complémentaire. Elles sont ainsi très communément utilisées comme marqueurs de sous populations neuronales. L'analyse des doubles immunofluorescences entre HA et les CBP

(CR, CB et PV) (Figure 31) et des niveaux d'expression des gènes codant pour ces protéines a permis de mettre en évidence que les neurones spinaux D2R exprimaient les trois CBP mais de façon contrastée (Figure 31b). Parmi les trois CBP, la CR est celle qui présente le plus faible taux de co-expression avec les cellules exprimant D2R (Figure 31a, b). Une co-expression plus importante est observée avec la CB, notamment au niveau des laminae superficielles où 22% des cellules HA-positives sont également immunoréactives pour la CB (Figure 31b). Enfin, une fraction des neurones D2R spinaux de la corne dorsale expriment également la PV, entre 5 et 15% suivant les laminae analysées (Figure 31b).

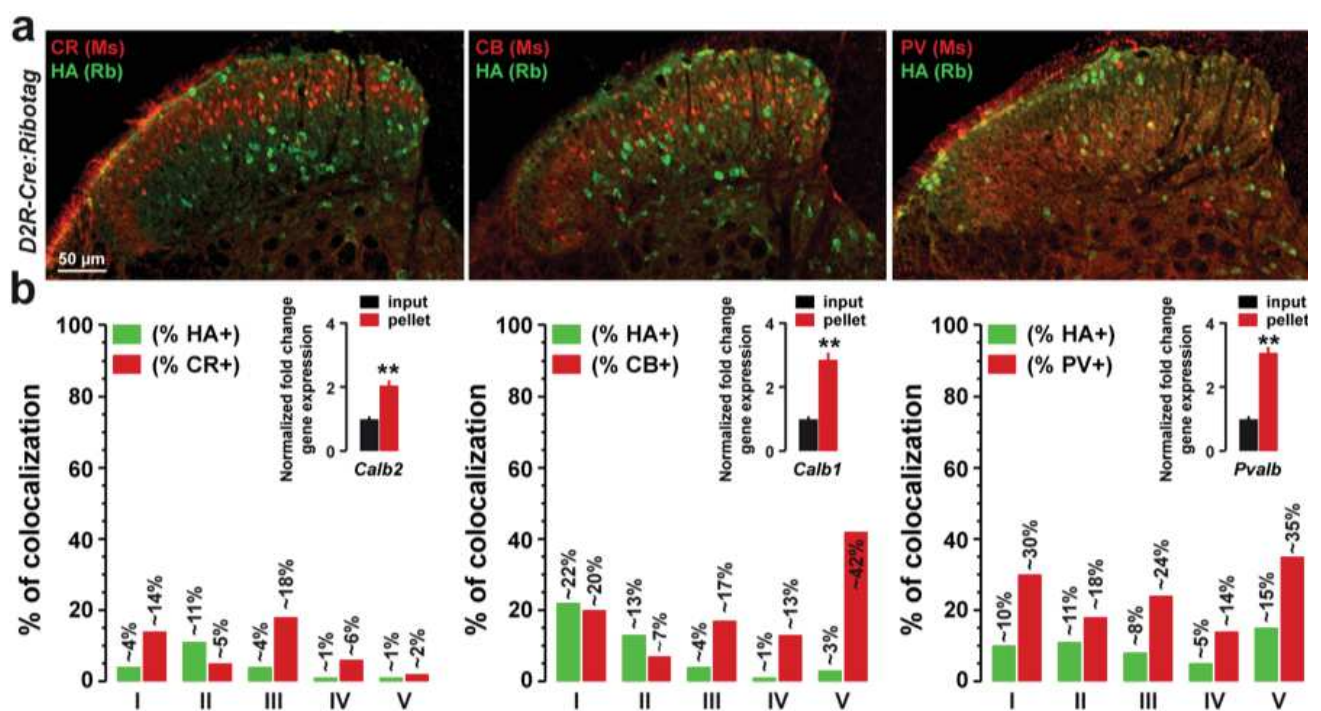


Figure 31 | Distribution des neurones spinaux exprimant les D2R au sein des neurones identifiés par les protéines liant le calcium

(a) Double immunofluorescence pour HA (en vert) et la Calrétinine (CR, en rouge), la Calbindine-D28k (CB, en rouge) et la Parvalbumine (PV, en rouge). (b) Estimation du pourcentage de neurones HA/CR, HA/CB et HA/PV en fonction du nombre total de

cellules HA (n = 807, 863 et 832, respectivement) et CR (n = 40), CB (n = 41) et PV (n = 83). (n = 2 souris, n = 2-3 tranches/souris). L'expression des D2R dans les populations des CBP est confirmée par l'analyse par qRT-PCR du niveau d'expression des gènes *Calb2*, *Calb1* et *Pvalb* dans les cellules D2R-positives de la moelle (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié).

- *Peptides opioïdiques.*

L'analyse de l'identité des neurones en fonction de l'expression de certains neuropeptides, notamment opioïdiques, m'a permis de raffiner la caractérisation moléculaire des neurones spinaux exprimant D2R. Une nouvelle fois en combinant l'hybridation *in situ* fluorescente multiplexée et l'analyse des transcrits par qRT-PCR, j'ai mis en évidence que les neurones glutamatergiques identifiés par la présence de la substance P (*Tac1*) n'exprimaient pas les D2R (Figure 32a, c). En revanche, les neurones spinaux *Drd2* sont enrichis en *Penk*, neuropeptides principalement exprimés au niveau des neurones GABAergiques, glutamatergiques et glycinergiques sensoriels primaires de la corne dorsale (Figure 32b, c).

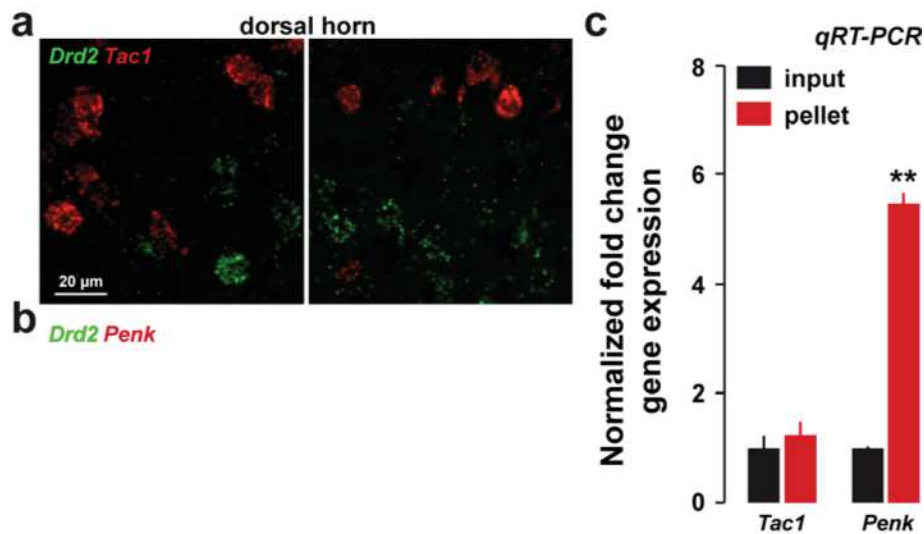


Figure 32 | Distribution des neurones spinaux exprimant les D2R au sein des neurones identifiés par les peptides opioïdiques

(a-b). Expression des ARNm de *Drd2* (en vert) et des gènes *Tac1* (en rouge) codant pour la substance P et *Penk* (en rouge) codant pour la Proenképhaline. (c) Analyse par qRT-PCR du niveau d'expression des gènes *Tac1* et *Penk* dans les cellules D2R-positives de la moelle (n = 15 souris, 5 groupes de 3 souris, mâles et femelles). **p<0,01 input vs pellet (test de Student non apparié).

Nos approches multidisciplinaires nous ont permis de montrer que les cellules exprimant les D2R étaient distribuées tout au long de la moelle spinale avec une expression préférentielle au niveau de la corne dorsale. En utilisant différentes approches moléculaires, l'identité des cellules spinales exprimant D2R a pu être mise en avant, indiquant que les D2R étaient exprimés exclusivement par des neurones et ne se trouvent pas au niveau des cellules gliales. L'hétérogénéité moléculaire des neurones exprimant D2R a pu être observée grâce aux techniques d'immunofluorescences, de RNAscope et de qRT-PCR. Mes résultats montrent que les D2R ne sont pas exprimés par les motoneurones mais qu'en revanche, les D2R sont présents dans des populations glutamatergiques, GABAergiques ainsi que glycinergiques. Ils sont par ailleurs fortement

enrichis dans la population neuronale identifiée par l'expression de proenképhaline. La co-expression des D2R dans des neurones exprimant les différentes CBP n'a pas permis de mettre en évidence une ségrégation préférentielle des D2R dans une des populations CBP-positives.

II. Rôle fonctionnel des D2R spinaux du segment lombaire.

Pour étudier le rôle des D2R spinaux du segment lombaire nous avons généré un modèle de knock-out conditionnel pour *Drd2*. Pour ce faire, un vecteur viral (AAVDJ-CamKII-Cre-mCherry) permettant l'expression de l'enzyme Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur CamKII (ubiquitaire au sein de la moelle spinale), a été injecté de façon bilatérale dans la moelle de souris *Drd2*-f/f (Figure 33). Au vu de l'expression préférentielle des D2R au niveau de la corne dorsale, les injections virales ont été réalisées à ce niveau.

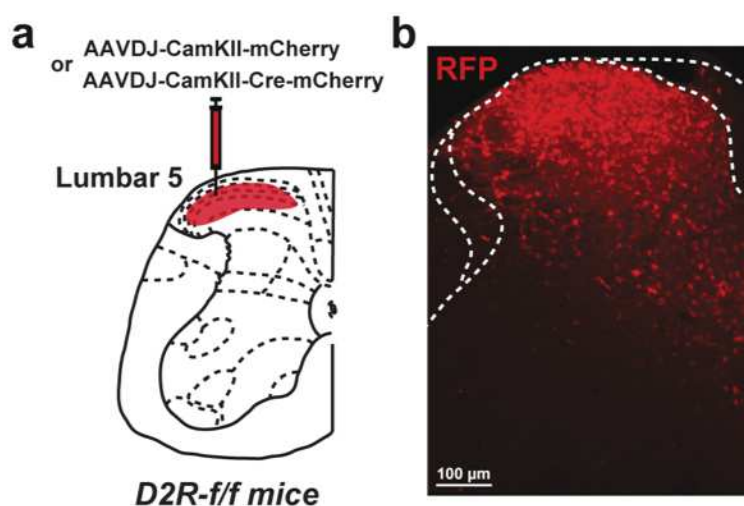


Figure 33 | Stratégie d'inactivation des D2R spinaux du segment lombaire

(a) Schéma du site d'injection du virus AAVDJ-CamKII-Cre-mCherry (groupe cKo) ou AAVDJ-CamKII-mCherry (groupe contrôle) dans les souris *D2R*-f/f. (b).

Immunofluorescence RFP (mCherry) d'une moelle spinale de souris D2R-f/f indiquant le site d'injection du vecteur viral AAVDJ-CamKII-Cre-mCherry.

II.1 Impact de la délétion des D2R sur l'activité locomotrice spontanée.

Pour évaluer l'effet de la délétion des D2R sur le comportement ambulateur des souris mâles et femelles, nous avons utilisé le test du Cyclotron. L'animal est libre d'explorer le couloir circulaire pendant 1h30, période durant laquelle les mouvements horizontaux et verticaux (redressements) sont mesurés. Les résultats indiquent que la délétion des D2R au niveau lombaire ne semble pas altérer l'activité ambulateur (Figure 34). Cependant, il semble y avoir une tendance à l'hyperlocomotion chez les mâles (Figure 34a) que l'on ne retrouve pas chez femelles (Figure 34d). Principalement sur la première période (20 premières minutes) où l'on observe une hyperactivité induite par la nouveauté. Il est intéressant de noter que les mâles ont une activité locomotrice plus élevée (en moyenne $1071 \frac{1}{4}$ turns per 5 minutes) que les femelles (en moyenne $724 \frac{1}{4}$ turns per 5 minutes) (Figure 34b, e). Le nombre de redressements n'est pas modifié chez les souris invalidées pour D2R (Figure 34c, f).

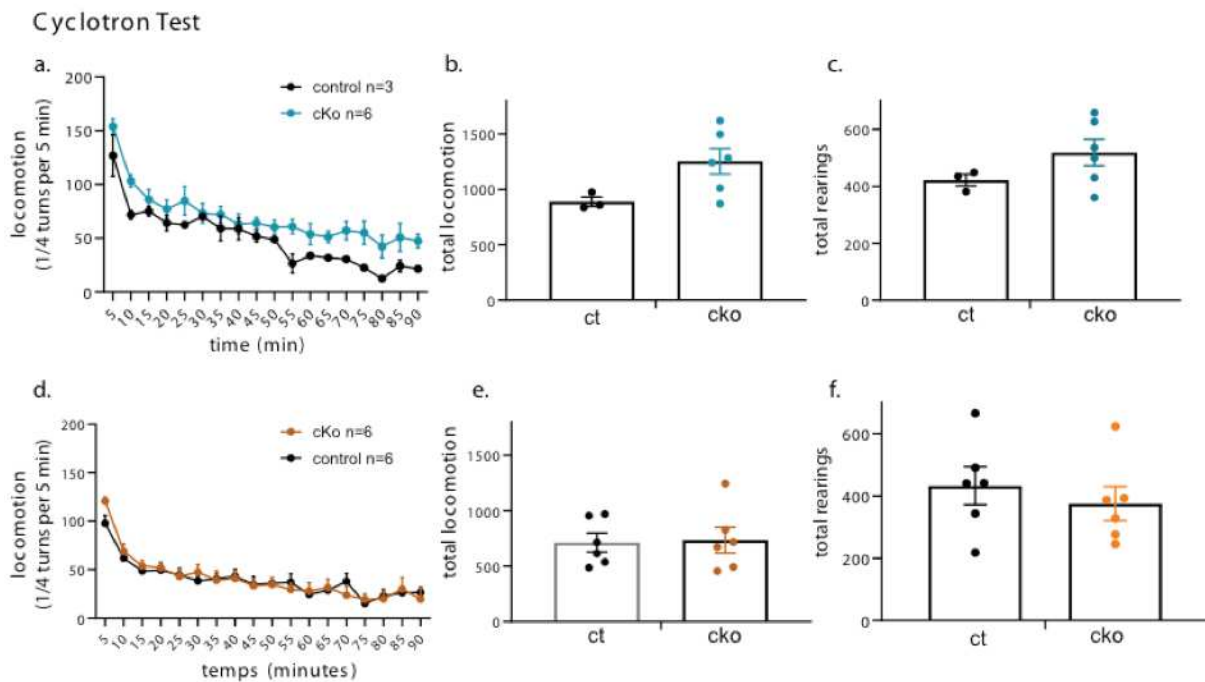


Figure 34 | La délétion des D2R au niveau lombaire

(a) Graphique représentant la locomotion des souris mâles au cours du temps sur une période de 90 minutes. (Two-way ANOVA : génotype $F(1, 7) = 4,523$, $P = 0,0710$; temps $F(17, 119) = 26,46$, $P < 0,0001$; Interaction $F(17, 119) = 0,8998$, $P = 0,5756$). (b) Représentation de l'activité locomotrice horizontale totale des souris mâles sur la période 90 minutes. (Student t-test : $t(7) = 2,127$, $P = 0,0710$). (c) Nombre de redressements des souris mâles sur la période de 90 minutes. Student t-test sur échantillons non appariés : $t(7) = 1,394$, $P = 0,2059$). (d-f). Même représentation qu'en a-c pour les souris femelles. (d) (Two-way ANOVA : génotype $F(1,10) = 0,02285$, $P = 0,8828$; temps $F(7.255, 72.55) = 37,48$, $P < 0,0001$; Intéraction $F(17,170) = 1,313$, $P = 0,1896$). (e) Student t-test sur échantillons non appariés : $t(10) = 0,1512$, $P = 0,8828$). (f) Student t-test sur échantillons non appariés : $t(10) = 0,7001$, $P = 0,4999$).

II.2 Impact de la délétion des D2R sur la coordination motrice.

Pour évaluer si la délétion des D2R au niveau lombaire entraîne une altération de la coordination sensorimotrice, nous avons utilisé le test du Rotarod en protocole accéléré (4 rpm à 40 rpm en 5 minutes). Cette tâche oblige l'animal à adapter son allure et à coordonner ses mouvements pour ne pas tomber du cylindre en rotation. Aussi, en réalisant 8 sessions de Rotarod pour chaque souris et en comparant la première session à la dernière nous sommes capables d'évaluer s'il y a une différence dans l'apprentissage moteur entre les différents groupes. Les courbes représentant la latence avant la chute de l'animal en fonction des différentes sessions du rotarod (de 1 à 8) montrent qu'indépendamment du sexe de l'animal, il n'y a pas de différence entre les groupes cKo et contrôle (Figure 35a, c). Aucun défaut d'apprentissage moteur n'a été observé. En effet, tous les animaux ont été capables d'améliorer leur performance entre la première et dernière session (Figure 35b, d).

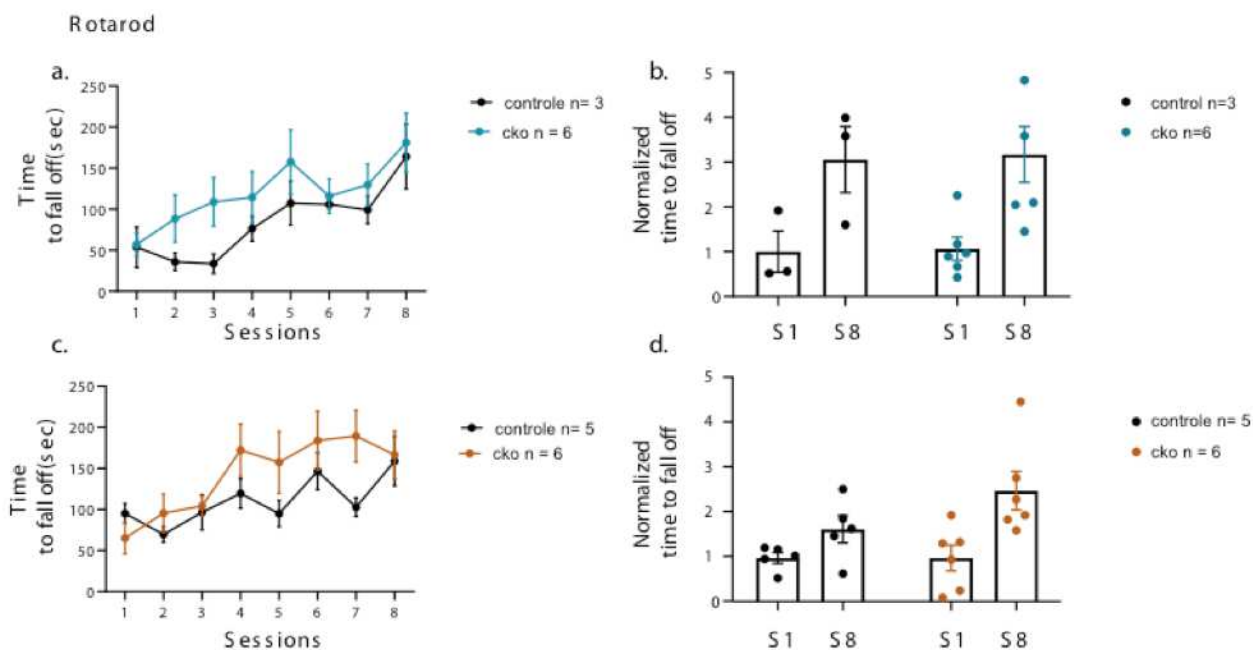


Figure 35 | La délétion des D2R au niveau lombaire n'altère ni la coordination motrice ni l'apprentissage moteur

La coordination motrice ainsi que l'apprentissage moteur ont été évalués par le test du Rotarod. (a) Graphique représentant la latence en seconde avant la chute de l'animal en fonction des sessions (souris mâles). Test du two-way ANOVA : génotype $F(1,7) = 0,9261$, $P = 0,3679$; temps $F(3.516,24.62) = 7,607$, $P = 0,0006$; Interaction $F(7, 49) = 0,7192$, $P = 0,6562$). (b) Évaluation de l'apprentissage moteur en comparant la latence avant chute de l'animal entre la première et dernière session du Rotarod (souris mâles) Student t-test sur échantillons non appariés: $t(2) = 0,06038$, $P=0,9573$. (c.-d) Même représentation qu'en (a-b) pour les souris femelles. (c) Test du two-way ANOVA : génotype $F(1, 9) = 1,740$, $P = 0,2198$; temps $F(7, 63) = 5,671$, $P<0,0001$; Interaction $F(7, 63) = 1,606$, $P = 0,1502$). d. Student t-test sur échantillons non appariés: $t(2) = 0,5255$, $P=0,6517$

II.3 Impact de la délétion des D2R sur la coordination motrice fine.

Le test du *beam walking* peut être utilisé pour détecter des déficits de contrôle moteur fin ou un déséquilibre moteur. Les souris doivent traverser deux poutres de diamètres différents (1,4 ou 2 cm). Cette tâche implique que l'animal doit coordonner ses mouvements et réguler finement son équilibre pour éviter de glisser ou de tomber de la poutre. Les résultats concernant les mâles n'indiquent aucune différence (Figure 36a). Les résultats obtenus chez les femelles montrent que le nombre de glissades effectuées par les pattes arrière par rapport au temps de traversée est significativement plus élevé dans le groupe cKo lorsque les souris traversent la poutre de plus petit diamètre (1,4 cm) (Figure 36b). En effet, le ratio glissades/temps des femelles du groupe contrôle est de 0,18 contre 0,39 pour les femelles du groupe cKo. Ces données montrent que la délétion des D2R spinaux au niveau lombaire entraîne une altération de la coordination fine chez les femelles lorsque l'adaptation motrice demandée est plus importante.

Beam Walking Test

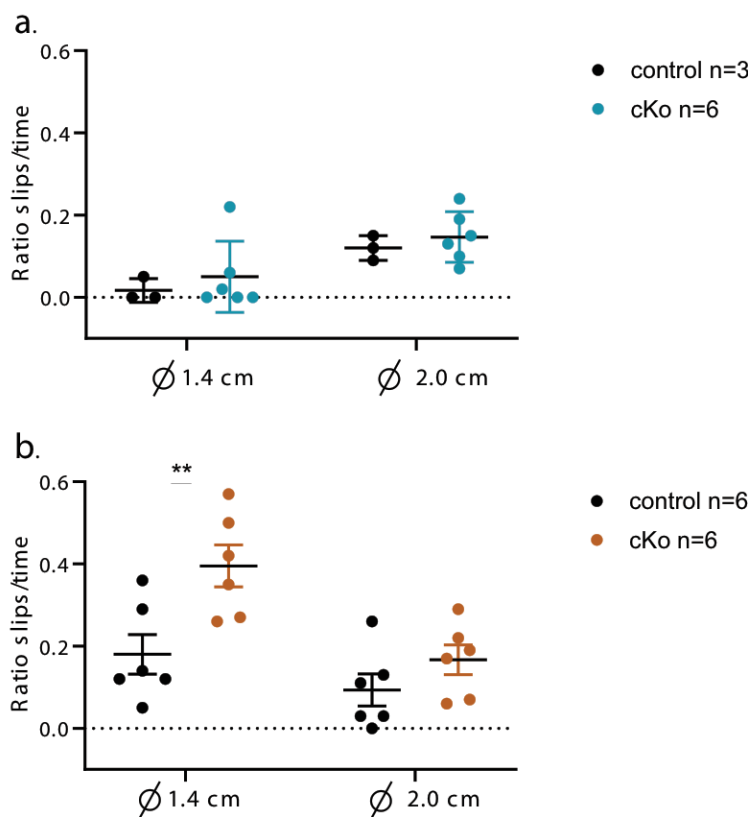


Figure 36 | La délétion des D2R au niveau lombaire n'altère pas la coordination motrice fine.

(a-b) Coordination motrice fine évaluée par le test du beam walking. Représentation du ratio nombre de glissade effectuée par les pattes arrière/temps de traversée des deux poutres (diamètre 1,4 cm et 2,0 cm) chez les mâles (a) two-way ANOVA : génotype $F(1,7) = 0,5132$, $P = 0,4969$; diamètre $F(1,7) = 26,17$, $P = 0,0014$; Interaction $F(1,7) = 0,029$, $P = 0,8694$ et femelles (b) two-way ANOVA : génotype $F(1,10) = 10,87$, $P = 0,0081$; diamètre $F(1,10) = 12,50$, $P = 0,0054$; Interaction $F(1,10) = 2,527$, $P = 0,1430$). Test post hoc de Tukey, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$: diamètre 1,4 cm ; $P = 0,005$. Toutes les données représentées sont moyennées \pm SEM.

En conclusion, ces résultats indiquent que la délétion partielle des D2R spinaux du segment lombaire n'engendre pas de problèmes moteurs apparents. En effet, l'activité locomotrice spontanée et la coordination motrice ne sont pas affectées. En revanche, la coordination motrice fine est altérée chez les femelles. Ces observations préliminaires devront être complétées par des analyses comportementales permettant une analyse plus fine de la composante motrice. D'autre part, comme mentionné précédemment, les D2R étant principalement exprimés au niveau de la corne dorsale, là où toutes les afférences sensorielles arrivent, il sera important d'évaluer la composante somatosensorielle (perception mécanique, thermique).

ETUDE 2

III. Étude des réseaux neuronaux de la moelle spinale activés par la stimulation de la transmission dopaminergique

En parallèle de l'étude du rôle des D2R spinaux, j'ai mené une étude dont l'objectif était l'identification et la caractérisation cellulaire des réseaux neuronaux de la moelle spinale activés en réponse à la modulation de la transmission monoaminergique. Pour ce faire, j'ai analysé par immunofluorescence le patron d'expression de la protéine cFos phosphorylée sur son résidu Ser32 (pS32-cFos) dans les différentes laminae de la moelle spinale de souris injectées avec divers composés pharmacologiques augmentant les niveaux extracellulaires de monoamines (Figure 37) (d-amphétamine, cocaïne, méthylphénidate, désipramine, imipramine, GBR).

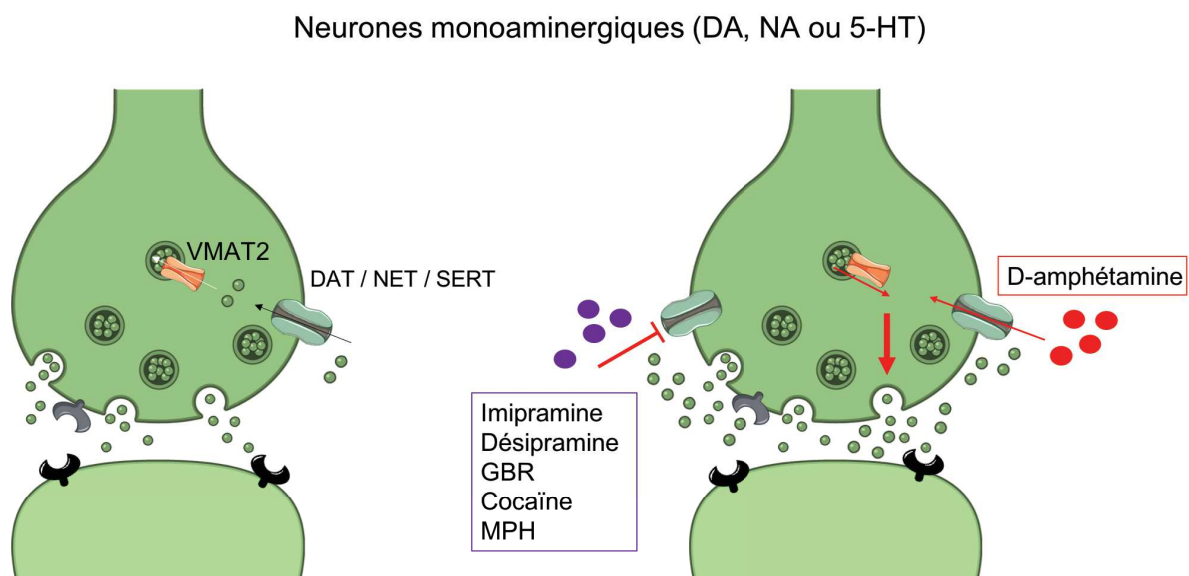


Figure 37 | Action des psychostimulants sur les neurones monoaminergiques

(Gauche) Neurone monoaminergique en condition physiologique. DAT : transporteur de la DA, NET : transporteur de la NA, SERT : transporteur de la 5-HT, VMAT2, transporteur

vésiculaire des monoamines 2. (Droite) Action des psychostimulants sur le neurone. La d-amphétamine (en rouge) entre par le transporteur (DAT, NET ou SERT) et inverse le transport de VMAT2, créant ainsi un gradient de concentration de monoamine au niveau intracellulaire. Ceci va induire une libération des monoamines et une inversion du transporteur (DAT, NA ou SERT) pour rétablir un équilibre du gradient de concentration intracellulaire. Les autres drogues (en violet) bloquent le transporteur (DAT, NET ou SERT) induisant ainsi une augmentation de la concentration de monoamines au niveau de la fente synaptique.

III.1 L'administration systémique de d-amphétamine induit une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos au niveau de la moelle spinale.

Dans un premier temps, j'ai recherché si l'administration systémique aiguë de d-amphétamine (10mg/kg, i.p.) entraînait une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au niveau du segment lombaire de la moelle spinale. Pour ce faire, j'ai réalisé une cinétique d'activation de pS32-cFos en réponse à l'injection de d-amphétamine (Figure 38). Chez les souris traitées avec une solution saline, un faible niveau d'immunoréactivité pS32-cFos est détectable principalement dans les laminae II, III, VI et VII (Figure 38a-b). Ces niveaux de base ne sont que faiblement altérés 30 min après l'administration de d-amphétamine (Figure 38a-b). En revanche, le nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives augmente progressivement dans les laminae V, VI, VII, VIII et IX, 60 et 120 minutes après l'administration de d-amphétamine, (Figure 38a-b). Afin de déterminer si cet effet dépendait en partie d'une augmentation de la libération de monoamines au niveau de la moelle spinale, j'ai réalisé des injections intrathécale de d-amphétamine (1,6 mg/kg, i.t.) (Figure 39). La quantification du nombre de cellules pS32-

cFos immunoréactives révèlent une augmentation significative dans les laminae II, IV et VII 90 min après injection (Figure 39).

L'ensemble de ces résultats montre que l'administration aiguë systémique ou locale de d-amphétamine induit une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos préférentiellement dans des réseaux neuronaux de la corne ventrale de la moelle spinale.

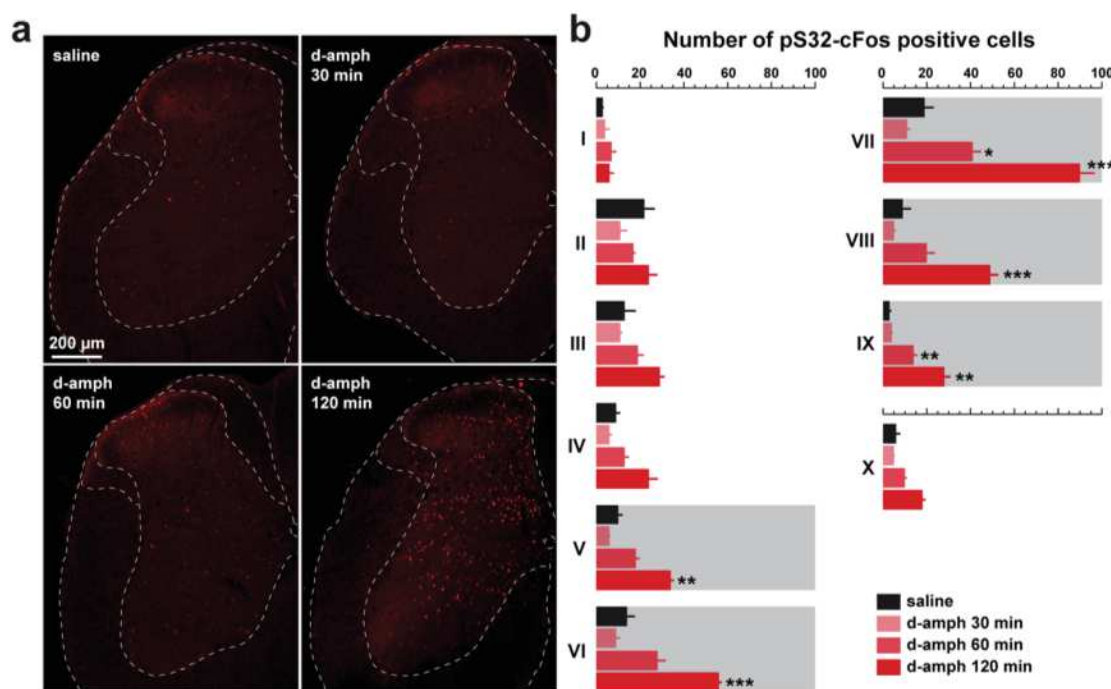


Figure 38 | . Cinétique d'induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de d-amphétamine.

(a) Cinétique d'induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 30, 60 et 120 minutes après l'administration de d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.). (b) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale. (n = 3 souris par groupe, n = 3 tranches par souris). Les comptages sont moyennés ± SEM. Analyse statistique : one-way ANOVA, couche I (F(3,33) = 1,622, P = 0,2030), couche II (F(3,34) = 7,133, P = 0,0008), couche III (F(3,34) = 18,87, P < 0,0001), couche IV (F(3,34) = 20,79, P < 0,0001), couche V (F(3,34) = 87,49, P < 0,0001), couche VI (F(3,34) = 63,70, P < 0,0001), couche VII (F(3,34) = 116,4, P < 0,0001), couche VIII (F(3,34) = 59,38, P <

0,0001), couche IX ($F(3,34) = 52,91$, $P < 0,0001$), couche X ($F(3,34) = 32,72$, $P < 0,0001$). Post-hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ saline vs d-amphétamine.

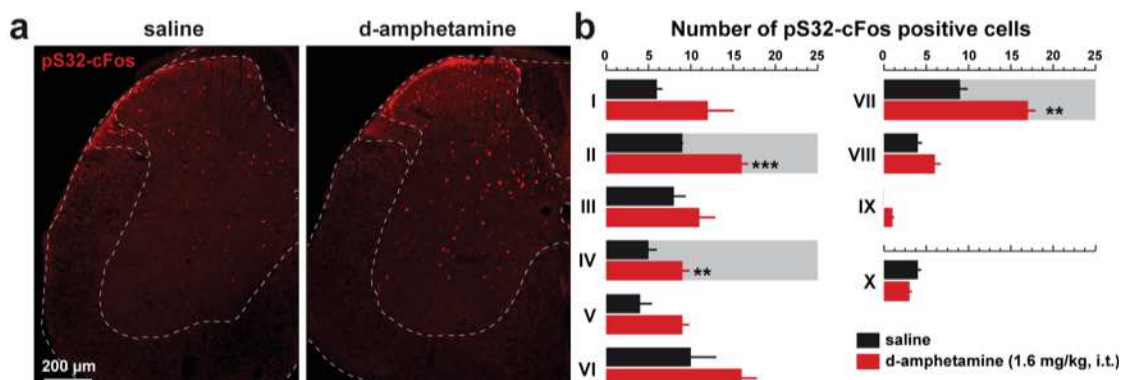


Figure 39 | Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse à l'administration intrathécale de d-amphétamine

(a) Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 90 minutes après l'administration de d-amphétamine (1,6mg/kg, i.t.). (b) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale. (n = 4 souris par groupe, n = 4 tranches par souris). Les comptages sont moyennés \pm SEM. Student t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ saline vs d-amphétamine.

III.2. Caractérisation moléculaire des cellules pS32-cFos immunoréactives en réponse à l'administration de d-amphétamine.

Afin de préciser l'identité moléculaire des cellules dans lesquelles la d-amphétamine entraîne une augmentation de pS32-cFos, j'ai analysé par double immunofluorescence le pourcentage de co-localisation entre les neurones pS32-cFos immunoréactifs et ceux exprimant la calbindine-D28k (CB), la calrétinine (CR), et la parvalbumine (PV) (Figure 40).

Nos résultats révèlent que peu (<2%) ou pas de cellules pS32-cFos immunoréactives expriment la CB (Figure 40a, b), la CR (Figure 40c, d) ou la PV (Figure 40e, f).

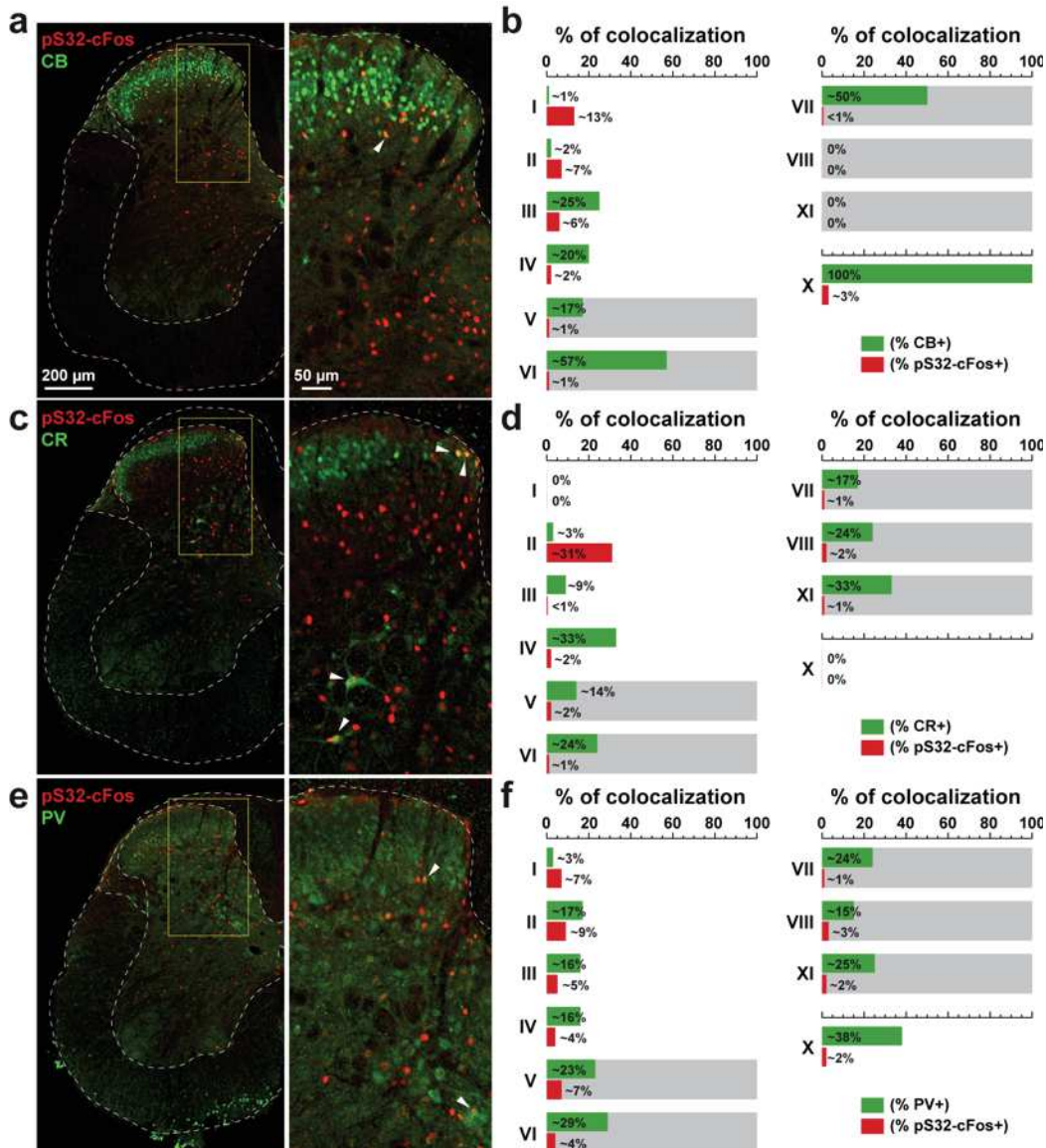


Figure 40 | Distribution des cellules pS32-cFos positives au sein des neurones identifiés par les protéines liant le calcium

(a, c, e) Double immunofluorescence pS32-cFos (rouge) et calbindine-D28K (CB, vert) (a), calrétinine (CR) (b), parvalbumine (PV) (c) au niveau du segment lombaire de la moelle spinale 90 minutes après l'administration de d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.). (b, d, f) Estimation du pourcentage de neurones pS32-cFos/CB, pS32-cFos/CR et pS32-cFos/PV en fonction du nombre total de cellules pS32-cFos (n = 1788, 1945 et 1768,

respectivement) et CB (n = 891), CR (n = 780) et PV (n = 318). (n = 2 souris, n = 3 tranches/souris).

Afin de déterminer si les cellules pS32-cFos immunopositives correspondaient préférentiellement à une population de neurones excitateurs (glutamatergique) ou inhibiteurs (GABAergique et glycinergique), différentes lignées de souris transgéniques me permettant d'identifier ces populations neuronales ont été utilisées (GAD67-eGFP, GlyT2-eGFP et VGluT2-Cre:Ribotag). J'ai dans un premier temps analysé le pourcentage de co-localisation entre les neurones pS32-cFos immunoréactifs et ceux exprimant la protéine verte fluorescente (GFP) sous contrôle du promoteur Gad37 (neurones GABAergiques) (Figure 41a, b). Au niveau des laminae superficielles, nos quantifications révèlent qu'un pourcentage important des cellules pS32-cFos co-expriment la GFP (~35% et ~25% dans les laminae I et III respectivement). En revanche, ce pourcentage réduit drastiquement (~6%) dans les laminae dans lesquelles la d-amphétamine induit pS32-cFos (Figure 41a, b). L'analyse réalisée sur les souris GlyT2-eGFP révèle un profil tout à fait différent. Ainsi, l'absence totale de co-localisation observée au niveau des laminae superficielles I et II contraste avec le fort pourcentage de cellules pS32-cFos/GFP détectées au niveau des laminae V, VI et VIII (Figure 41c, d).

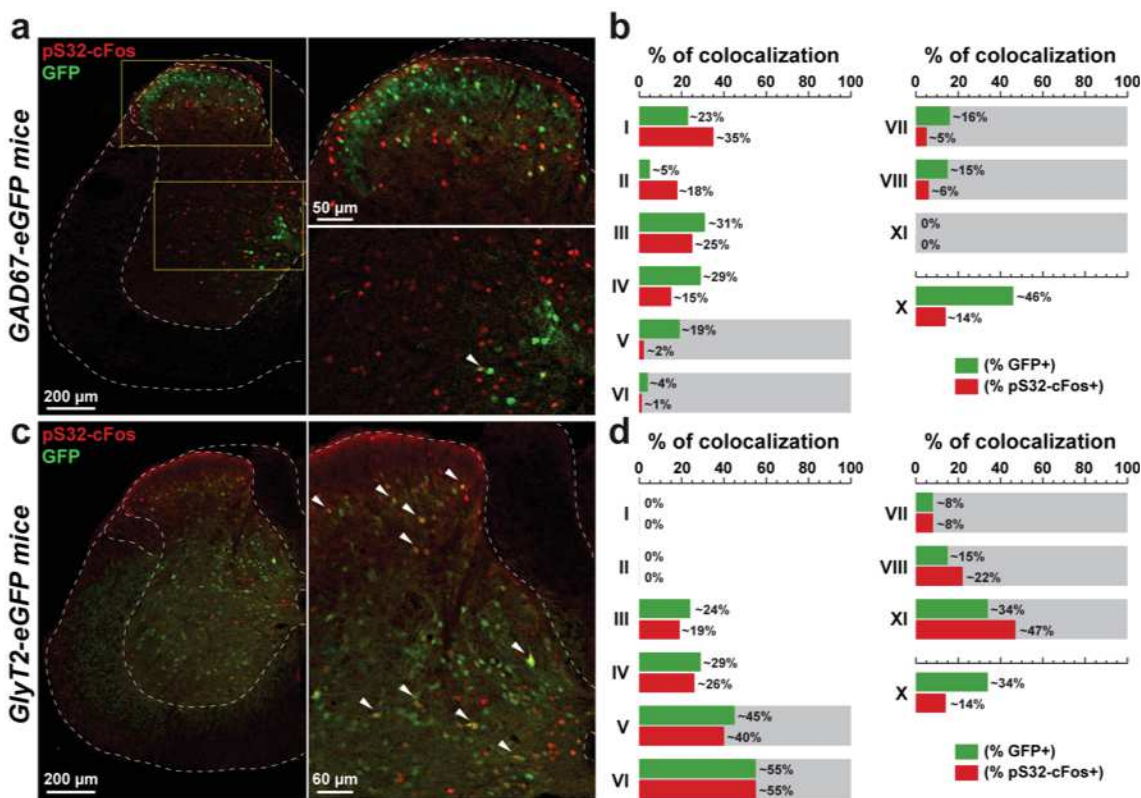


Figure 41 | Distribution des cellules pS32-cFos positives au sein des neurones GABAergiques, Glycinergiques.

Double immunofluorescence pS32-cFos (rouge) et GFP (vert) (a, c) ou HA (vert) (d) au niveau du segment lombaire de la moelle spinale de souris GAD67-eGFP (a), GlyT2-eGFP (c) et VGluT2:Ribotag (e), 90 minutes après l'administration de d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.). (b, d, f) Estimation du pourcentage de neurones pS32-cFos/GFP, pS32-cFos/GFP et pS32-cFos/HA en fonction du nombre total de cellules pS32-cFos (n = 2495, 2842) et GFP (n = 1298), GFP (n = 2567) (n = 4 souris, n = 4 tranches/souris).

III.3 Induction de pS32-cFos dans la moelle spinale en réponse à l'administration systémique de cocaïne et méthylphénidate.

Afin de déterminer si la régulation précédemment décrite était propre à l'administration de d-amphétamine, j'ai évalué si d'autres psychostimulants tels que la cocaïne ou le

méthylphénidate étaient capables d'induire une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au niveau spinal (Figure 42). En accord avec nos précédentes conclusions, j'ai observé une augmentation de pS32-cFos au niveau des laminae profondes V, VI et VII 90 min après l'administration de d-amphétamine (Figure 42a, b). De manière intéressante, une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos a été observée dans ces mêmes laminae en réponse à l'administration de cocaïne (15 mg/kg, i.p.) et de méthylphénidate (15 mg/kg, i.p.) (Figure 42c-f). Si l'augmentation de pS32-cFos dans les laminae V, VI et VII semble être une caractéristique commune des psychostimulants, l'induction dans les autres laminae semble dépendre de la nature du composé administré (Figure 42c-f). Ainsi, l'augmentation de pS32-cFos dans la lamina VIII est spécifique à l'amphétamine alors que celle des laminae I ou X n'est observée qu'après administration de cocaïne et méthylphénidate, respectivement (Figure 42b, d et f).

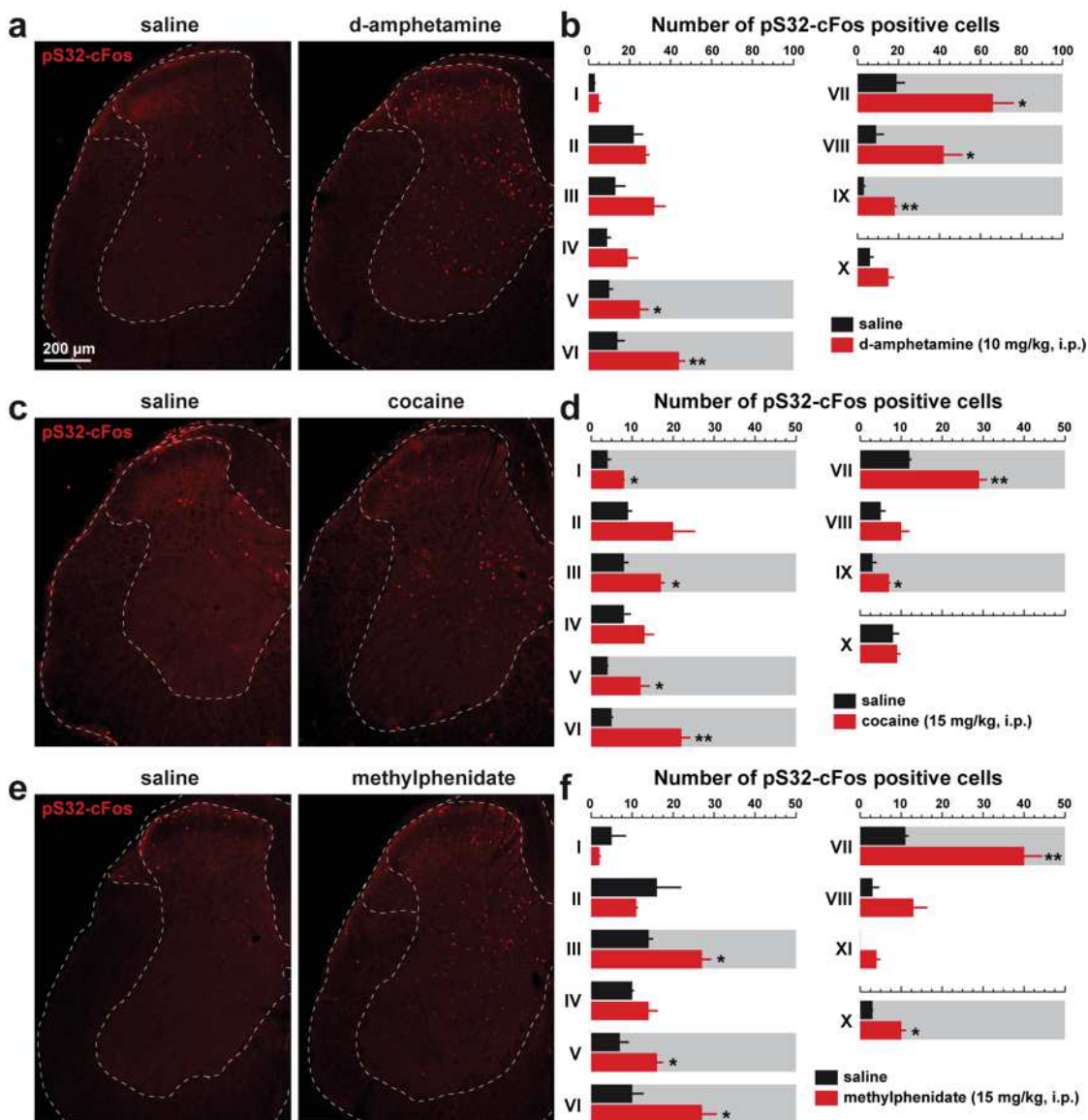


Figure 42 | Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de psychostimulants.

(a, c, e) Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 90 minutes après l'administration de d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.) (a), de cocaïne (15 mg/kg, i.p.) (c) et de méthylphénidate (15 mg/kg, i.p.) (e). (b, d, f) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale (n = 3 souris par groupe, n= 3 tranches/souris) Les comptages sont moyennés ± SEM. Student t-test, *p<0,05, **p<0,01 saline vs psychostimulants.

III.4 L'augmentation de pS32-cFos dans la moelle spinale en réponse à l'administration systémique de psychostimulants est-elle le reflet d'une hyperactivité locomotrice?

L'administration de psychostimulants tels que la d-amphétamine, la cocaïne ou le méthylphénidate entraîne une forte augmentation de l'activité locomotrice. Afin de déterminer si l'induction de pS32-cFos observée au niveau lombaire de la moelle spinale est une conséquence directe de l'hyperlocomotion induite par les psychostimulants, j'ai analysé l'induction de pS32-cFos en réponse à l'administration de morphine (5 mg/kg, s.c.) et de dizocilpine (MK801) (0,3 mg/kg, i.p.). Ces deux composés, au mode d'action pharmacologique distinct des psychostimulants, sont connus pour induire une forte augmentation de l'activité locomotrice (Figure 43a-d). L'analyse de mes quantifications révèle que l'administration de morphine ou de dizocilpine n'entraîne pas d'augmentation du nombre de cellules pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale. L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de pS32-cFos induite par l'administration de psychostimulants n'est pas le simple reflet d'une hyperactivité locomotrice.

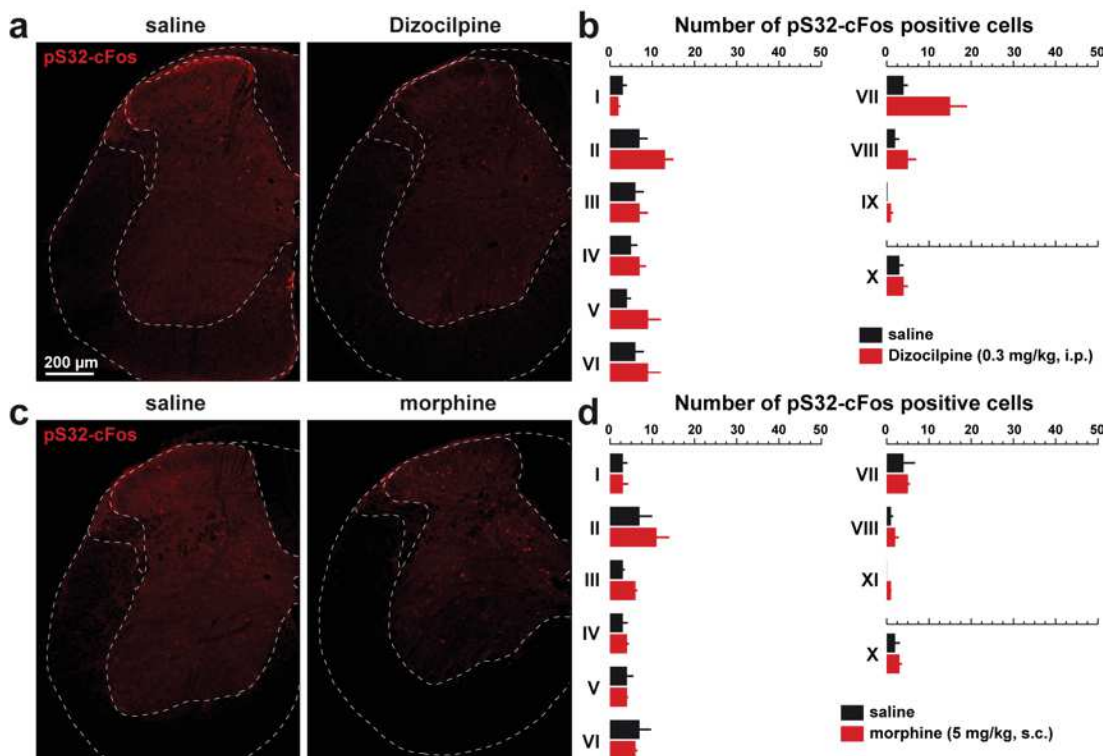


Figure 43 | Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale en réponse l'administration de morphine et dizocilpine

(a, c) Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 90 minutes après l'administration de dizocilpine (0.3 mg/kg, i.p.) (a) et de morphine (5 mg/kg, s.c.) (b). (b, d) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale. (n = 5 souris par groupe, n = 4 tranches par souris) Les comptages sont moyennés \pm SEM. Student t-test,

III.5 Régulation de pS32-cFos au niveau de la moelle spinale en réponse à l'administration d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de dopamine, noradrénaline et sérotonine.

La d-amphétamine est un substrat du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2) et va ainsi faciliter la libération de monoamines à partir de leurs sites de stockage. En agissant comme un faux substrat, la d-amphétamine va également pouvoir enclencher le transport inverse des monoamines, via leurs transporteurs, du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Nous avons cherché à déterminer quel système monoaminergique était préférentiellement impliqué dans l'augmentation de pS32-cFos induite par la d-amphétamine. Pour ce faire, j'ai analysé l'induction de pS32-cFos en réponse à l'administration d'inhibiteur sélectif de la recapture de la dopamine (GBR12783), de la noradrénaline (désipramine) ou de la sérotonine (imipramine) seule ou en combinaison avec la d-amphétamine (Figure 44). Nos résultats révèlent que l'administration de désipramine ou d'imipramine n'entraîne aucune augmentation du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives dans la moelle spinale (Figure 44a, b). De plus, l'induction de pS32-cFos en réponse à l'administration de d-amphétamine n'est pas altérée chez des souris traitées préalablement par l'imipramine ou la désipramine (Figure 44a, b). En revanche, le blocage de la recapture de dopamine par le GBR12783 est suffisant pour induire un patron d'expression de pS32-cFos semblable à celui observé en réponse à l'administration de d-amphétamine (augmentation dans les laminae V, VI, VII et VIII) (Figure 44a, b). L'absence d'une augmentation additive du nombre de cellules pS32-cFos en réponse à l'administration de d-amphétamine chez les souris prétraitées par le GBR12783 suggère que la signalisation dopaminergique est suffisante pour les effets de d-amphétamine observés au niveau du segment lombaire de la moelle spinale.

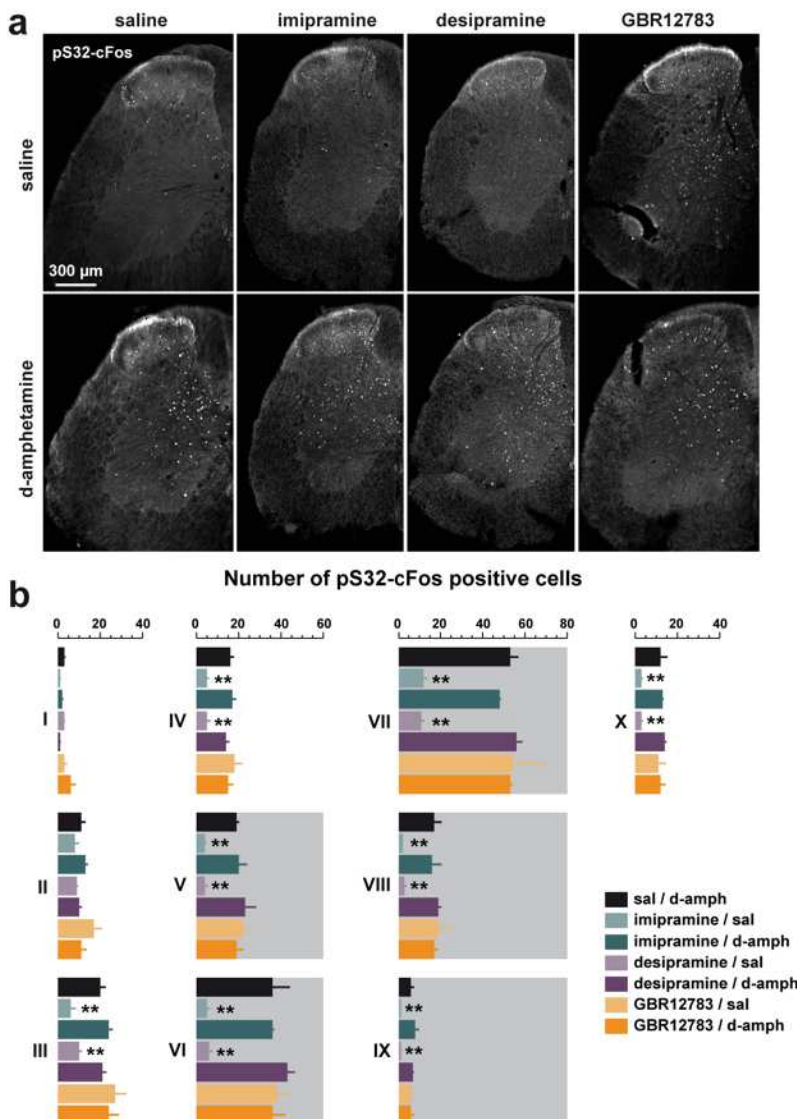


Figure 44 | Induction de pS32-cFos en réponse l'administration d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de monoamines

(a) Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 90 minutes après l'administration d'imipramine (10 mg/kg, i.p.), de désipramine (15 mg/kg, i.p.) et de GBR12783 (15 mg/kg, i.p.) seuls ou en combinaison avec la d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.). (b, d) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale. (n = 3 souris par groupe, n = 4 tranches par souris). Les comptages sont moyennés \pm SEM. Analyse statistique : one-way ANOVA, couche I ($F(6,84) = 7,3386$, $P < 0,0001$), couche II ($F(6,84) = 9,553$, $P < 0,0001$), couche III ($F(6,86) = 13,33$, $P < 0,0001$), couche

IV ($F(6,86) = 14,94$, $P < 0,0001$), couche V ($F(6,86) = 9,926$, $P < 0,0001$), couche VI ($F(6,86) = 35,65$, $P < 0,0001$), couche VII ($F(6,86) = 15,01$, $P < 0,0001$), couche VIII ($F(6,86) = 13,38$, $P < 0,0001$), couche IX ($F(6,86) = 14,53$, $P < 0,0001$), couche X ($F(6,86) = 12,38$, $P < 0,0001$). Post-hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ saline/d-amphétamine vs autres groupes.

III.6 Rôle des récepteurs D1 et NMDA dans la régulation de pS32-cFos en réponse à l'administration d'amphétamine.

J'ai ensuite recherché si les récepteurs D1 pouvaient participer à la régulation de pS32-cFos induit par l'administration d'amphétamine. Comme illustrer dans la Figure 45, l'augmentation du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives en réponse à l'administration d'amphétamine n'est pas diminuée chez les souris ayant été prétraitées par le Sch23390 (0,1mg/kg, i.p.), un antagoniste D1/D5.

Dans le striatum la régulation de l'induction de cFos requiert la stimulation synergique des récepteurs dopaminergiques D1 et glutamatergiques NMDA. J'ai donc testé si dans la moelle spinale les récepteurs NMDA pouvaient participer à l'induction de pS32-cFos induite par l'amphétamine. Tout comme avec le Sch23390, les souris prétraitées par un antagoniste non compétitif des NMDA, la dizocilpine (0,3 mg/kg, i.p.) montrent, en réponse à l'administration d'amphétamine, une augmentation du nombre de cellules pS32-cFos positives équivalente à celle observée chez les souris n'ayant reçu que l'amphétamine (Figure 45). Ces résultats suggèrent que les mécanismes impliqués dans l'induction de pS32-cFos dans la moelle spinale diffèrent de ceux classiquement décrits au niveau du striatum. Des études complémentaires devront être réalisées pour identifier les récepteurs dopaminergiques impliqués dans cette régulation.

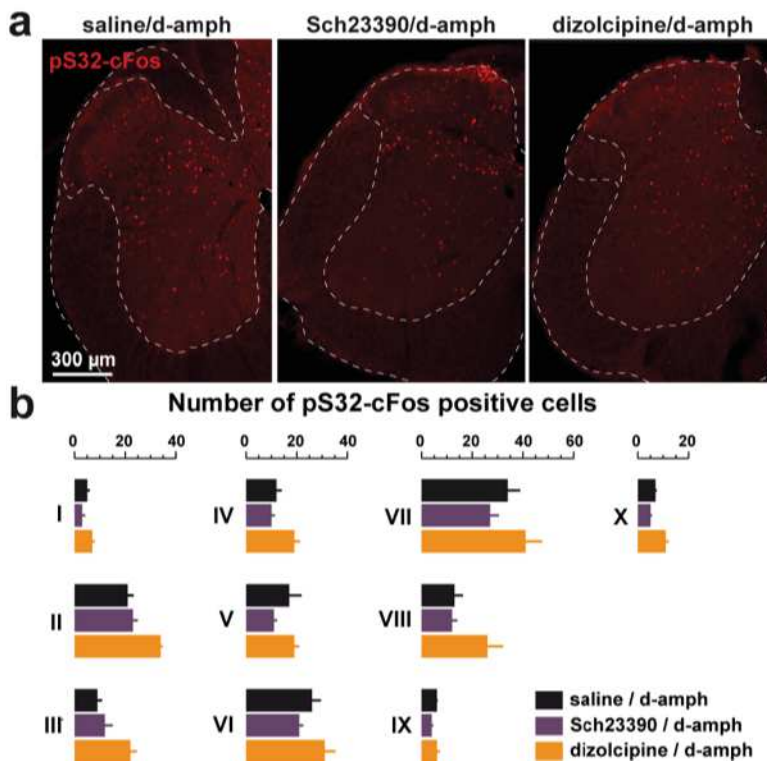


Figure 45 | Rôle des récepteurs D1 et NMDA dans la régulation de pS32-cFos en réponse à l'administration de d-amphétamine

(a) Induction de pS32-cFos au niveau du segment lombaire de la moelle spinale, visualisée par immunofluorescence 90 minutes après l'administration de d-amphétamine (10 mg/kg, i.p.) chez des souris préalablement injectées avec une solution saline ou une solution contenant un antagoniste des récepteurs D1R/D5R (Sch23390, XX mg/kg, i.p.) ou des récepteurs NMDA (dizolcipine, 0,3 mg/kg, i.p.). (b) Quantification du nombre de cellules pS32-cFos immunoréactives au sein des différentes couches de la moelle spinale. (n = 3 souris par groupe, n = 4 tranches par souris). Les comptages sont moyennés \pm SEM. Analyse statistique : one-way ANOVA, lamina I ($F(2,34) = 1,842$, $P = 0,1739$), lamina II ($F(2,34) = 18,83$, $P < 0,0001$), lamina III ($F(2,34) = 19,01$, $P < 0,0001$), lamina IV ($F(2,34) = 23,99$, $P < 0,0001$), lamina V ($F(2,34) = 10,36$, $P = 0,0003$), lamina VI ($F(2,34) = 8,406$, $P = 0,0011$), lamina VII ($F(2,34) = 9,464$, $P = 0,0005$), lamina VIII ($F(2,34) = 15,17$, $P < 0,0001$), lamina IX ($F(2,34) = 1,448$, $P = 0,2491$), lamina X ($F(2,34) = 17,78$, $P < 0,0001$). Post-hoc Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ saline/d-amphétamine vs autres groupes.

**DISCUSSION &
PERSPECTIVES**

I. Hétérogénéité des neurones spinaux exprimant les D2R

Alors que quelques études suggéraient un rôle des D2R au niveau de la moelle spinale, très peu d'informations étaient disponibles quant à l'identité des cellules spinales exprimant ce sous-type de récepteur dopaminergique (Zhu et al., 2007b). L'utilisation de la souris *Drd2-Cre:RiboTag*, générée au laboratoire, m'a permis de réaliser une caractérisation anatomique et moléculaire des cellules spinales exprimant les D2R, prérequis nécessaire à l'étude du rôle fonctionnel de ces récepteurs au sein de la moelle. En combinant des approches d'immunofluorescence, d'hybridation in situ fluorescente multiplexées et la méthodologie Ribotag, j'ai pu mettre en évidence que l'expression des D2R est très hétérogène au sein des diverses populations de neurones spinaux excitateurs et inhibiteurs.

La technique iDISCO nous a tout d'abord permis de montrer que les cellules spinales exprimant les D2R étaient présentes au niveau de tous les segments de la moelle avec une expression préférentielle au niveau de la corne dorsale de la moelle. Cette cartographie précise offre une vision globale de la distribution des cellules D2R positives et permet de compléter les premières observations faites par des approches plus traditionnelles et moins résolutes (Zhu et al., 2007b). Notre caractérisation moléculaire a quant à elle révélée un degré d'hétérogénéité conséquent. En effet, les D2R sont exprimés au sein de neurones spinaux excitateurs et inhibiteurs hétérogènes. Nos résultats enrichissent les récentes observations faites par séquençage sur cellule unique réalisé dans la corne dorsale de la moelle (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018). Ainsi, l'analyse croisée entre nos résultats et ces données indiquent que, bien que

faiblement exprimés, les transcrits *Drd2* sont plus particulièrement enrichis dans 2 des 15 sous populations de neurones GABAergiques qui expriment la parvalbumine (GABA14 et 15, définies par l'expression de *Crabp1*) (Häring et al., 2018). En ce qui concerne, les populations de neurones excitateurs, les transcrits *Drd2* sont concentrés dans des populations définies par l'expression de *Cck* et *Maf* (Häring et al., 2018) ainsi que dans celle exprimant l'enképhaline, une observation corroborant nos résultats (Sathyamurthy et al., 2018). Cette étude qui constitue une première étape dans la caractérisation de l'identité des neurones spinaux exprimant les D2R, pose la question de la dynamique temporelle et spatiale (cervical vs thoracique) de l'expression des D2R aux différents stades du développement de la moelle spinale. Ainsi, l'identification des progéniteurs neuronaux et des modules de régulation transcriptionnelle conduisant à l'expression des D2R spinaux nous permettra de mieux comprendre le rôle de ce récepteur au sein de circuits spinaux.

La diversité des neurones exprimant les D2R au sein de la moelle spinale n'est pas une particularité de cette structure. En effet, de récentes études suggèrent l'existence d'une telle hétérogénéité au sein de l'hippocampe dorsal, où les D2R sont exprimés à la fois par les cellules moussues excitatrices du gyrus dentelé et par une grande variété d'interneurones (Gangarossa et al., 2012; Puighermanal et al., 2015). Fait intéressant, cette diversité existe également au sein de neurones longtemps considérés comme identiques, comme c'est le cas pour les neurones du striatum exprimant les D2R (neurones épineux moyens striatopallidaux et interneurones cholinergiques) (Gokce et al., 2016; Saunders et al., 2018). Nos résultats soulèvent la question de savoir si cette même diversité existe au sein des cellules spinales exprimant les autres récepteurs dopaminergiques notamment D1R et D3R. Des analyses complémentaires permettront de

répondre à cette question et de déterminer notamment le degré de ségrégation entre les neurones exprimant les D1R et D2R qui peut varier considérablement suivant les structures cérébrales analysées (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gangarossa et al., 2019).

Très peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la stimulation des D2R sur l'activité des neurones spinaux. Les seules données disponibles à ce jour indiquent que la stimulation des D2R hyperpolarisent les neurones de la substantia gelatinosa (laminae II) via un mécanisme impliquant les GIRK (Tamae et al. 2005; Taniguchi et al. 2011). Il serait bien évidemment intéressant d'étendre cette analyse des réponses électrophysiologiques aux autres laminae de la corne dorsale et de les ré-analyser en tenant compte de la diversité cellulaire et moléculaire des neurones spinaux exprimant les D2R. En effet, seule cette dissection minutieuse permettra de déterminer si la stimulation des D2R s'accompagne systématiquement d'une hyperpolarisation des neurones ou si à cette diversité moléculaire s'ajoute une hétérogénéité des réponses électrophysiologiques déjà observée dans d'autres structures cérébrales. Ainsi, dans l'hippocampe la stimulation des D2R va entraîner une augmentation de l'excitabilité des cellules moussues du gyrus denté via un mécanisme indépendant des protéines G mais impliquant les arrestines et la voie de signalisation intracellulaire Akt/GSK3 (Etter and Krezel, 2014). De plus, la connaissance de l'identité des neurones enregistrés permettra de mieux caractériser et comprendre les effets présynaptiques inhibiteurs des D2R sur la transmission synaptique des neurones spinaux (Taniguchi et al., 2011).

II. Caractérisation fonctionnelle des D2R spinaux

En parallèle de notre caractérisation anatomique et moléculaire, nous avons initié une série d'expériences dont le but était de déterminer le rôle fonctionnel des D2R spinaux.

Pour ce faire, nous avons réalisé une invalidation conditionnelle des D2R au niveau de la corne dorsale des segments lombaires de la moelle spinale. Pour cette première série d'expérience nous avons opté pour une invalidation large (non restreinte à une lamina en particulier) et peu sélective (non restreinte à une population neuronale) en utilisant un vecteur viral dont l'expression de la Cre recombinase était sous contrôle du promoteur de la CaMKII (ubiquitaire au niveau de la moelle). L'absence de phénotype comportemental illustre la limite de notre approche et suggère que le rôle fonctionnel des D2R spinaux ne peut être appréhendé sans tenir compte de la diversité cellulaire exprimant ces récepteurs. De fait, l'invalidation des D2R dans un sous-type neuronal génétiquement identifié semble être la stratégie la plus rationnelle. Au vu de notre caractérisation moléculaire montrant un enrichissement des transcrits *Penk* dans les neurones spinaux exprimant les D2R, l'invalidation des D2R au sein de la population de neurones spinaux exprimant l'enképhaline serait tout à fait pertinente. Il est important de faire remarquer ici que l'approche Cre/loxP classique qui consisterait à croiser les souris *Penk-Cre* avec les *Drd2-f/f* ne peut être envisagé. En effet, ces souris présenteraient un phénotype moteur fort (hypolocomotion, akinésie) résultant de l'invalidation des D2R dans les neurones striatopallidaux. Une stratégie alternative est cependant envisageable et nécessiterait de générer une souris *Penk-Flp* qui, croisée avec la *Drd2-f/f*, permettrait d'invalider sélectivement les D2R des neurones spinaux enképhalines-positifs après injection d'un vecteur viral permettant l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle de la flipase. Cette approche nous permettrait de déterminer si les D2R présents sur les neurones spinaux enképhalinerigiques participent à l'action antinociceptive de la dopamine (Almanza et al., 2015; Liu et al., 1992; Taniguchi et al., 2011). L'invalidation sélective des D2R dans d'autres sous-types neuronaux spinaux permettrait également de tester l'implication de

ces récepteurs dans le contrôle d'autres modalités somatosensorielles (mécanoception, thermoception,...) et de préciser leur rôle dans la modulation des réseaux moteurs. Enfin, une question que nous n'avons pas pu aborder lors de ce travail concerne le rôle des neurones définis par l'expression des D2R. Des stratégies de génétique intersectionnelle nous permettraient de manipuler sélectivement certaines des sous populations neuronales exprimant les D2R (Box 2).

De nombreuses études cliniques supportent l'hypothèse selon laquelle le syndrome des jambes sans repos (SJSR) induit ou non par les antipsychotiques résulte en partie d'une perturbation de la transmission dopaminergique. À ce jour, le ropinirole ou le pramipexole, deux agonistes dopaminergiques ciblant préférentiellement les D2R-like, restent les molécules de référence classiquement utilisées pour le traitement symptomatique du SJSR (Clemens et al., 2006). Ainsi, il serait intéressant de déterminer les conséquences fonctionnelles d'une exposition répétée au ropinirole et/ou pramipexole et aux antipsychotiques (haloperidol) sur les neurones spinaux exprimant les D2R. Dans ce contexte, l'utilisation de nos souris *Drd2-Cre:Ribotag* nous permettrait d'identifier par des approches de séquençage d'ARNm à haut débit les altérations moléculaires prenant place spécifiquement au sein des neurones spinaux exprimant les D2R. Cette stratégie permettrait d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-tendant le SJSR.

III. Les neurones dopaminergiques diencéphalospinaux

Au cours de ce travail de thèse nous avons focalisé notre attention sur les neurones dopaminoceptifs de la moelle spinale exprimant les D2R mais il est évident que l'appréhension du rôle de ces récepteurs ne peut se faire sans une meilleure

connaissance des circuits dopaminergiques diencephalospinaux. Alors que les données de la littérature s'accordent à dire que le noyau dopaminergique diencephalique A11 constitue la seule source de dopamine au niveau de la moelle spinale (Qu et al., 2006; Skagerberg et al., 1982), l'existence d'autres sources de dopamine ne peut être complètement exclue. Ainsi, un faisceau d'arguments suggère que la dopamine pourrait être libérée par certains neurones sensoriels provenant des ganglions rachidiens. En effet, une fraction de ces neurones exprime la TH (Brumovsky, 2016) ainsi que le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2 (Goswami et al., 2014) suggérant que la dopamine pourrait être non seulement synthétisée mais également stockée au sein de vésicules et de fait libérée au sein de la moelle spinale. Parmi les stratégies permettant de répondre à cette question, celle couplant la photostimulation des neurones sensoriels exprimant la TH à la mesure de la libération de dopamine par la technique de voltammétrie semble de loin la plus appropriée. En effet, elle nous permettrait de contrôler les paramètres de stimulation mais également d'être extrêmement résolutive concernant les aspects temporels de la libération de dopamine. Enfin, les neurones noradrénergiques descendants provenant du locus coeruleus pourrait constituer une source additionnelle de dopamine. En effet, deux études récentes ont montré qu'au sein de l'hippocampe dorsal ces neurones libéraient conjointement de la noradrénaline et de la dopamine (Kempadoo et al., 2016; Takeuchi et al., 2016). Il serait donc intéressant de déterminer si ces caractéristiques sont retrouvées au sein des neurones noradrénergiques du locus coeruleus innervant la moelle spinale.

Alors que les approches optogénétiques et pharmacogénétiques ont permis de mettre en évidence que l'activation des neurones dopaminergiques du noyau A11 est suffisante pour promouvoir la locomotion (Barriere et al., 2004; Koblinger et al., 2018), peu d'études se

sont intéressées à la physiologie de ces neurones ni à la nature des stimuli capables de moduler leur activité. Ainsi, des enregistrements extracellulaires unitaires nous renseigneraient sur l'activité spontanée (fréquence de décharge/burst) de ces neurones DA et nous permettraient également de déterminer leur activité (excitation et/ou inhibition) en réponse à la présentation d'un stimulus appétitif ou aversif. Il serait alors intéressant d'analyser ces résultats à la lumière des connaissances existantes sur les propriétés des neurones dopaminergiques des noyaux A9 et A10 du mésencéphale. Ces analyses pourraient être complétées par des expériences utilisant des microscopes miniaturisés épifluorescents, nous permettant de visualiser, via l'imagerie calcique, l'activité des neurones DA diencephalospinaux chez des animaux libres de leurs mouvements lors de différentes tâches comportementales (activité locomotrice spontanée, forcée, réponses somatosensorielles...). Enfin, il serait intéressant de déterminer si les neurones DA diencephalospinaux constituent une population homogène ou s'il existe, comme il a été décrit pour les neurones DA mésencéphaliques (Brichta et al., 2015; Poulin et al., 2014, 2018) différents sous-types de neurones DA ayant des propriétés moléculaires, anatomiques et fonctionnelles distinctes.

IV. Analyse des ensembles neuronaux spinaux activés en réponse à la manipulation de la transmission monoaminergique

En parallèle de la caractérisation anatomo-fonctionnelle des neurones spinaux exprimant les D2R, nous avons réalisé une étude dont l'objectif était d'évaluer les conséquences de la stimulation pharmacologique du système dopaminergique sur l'activité neuronale au niveau de la moelle spinale. Pour ce faire, nous avons analysé la régulation de

l'expression du gène immédiat précoce c-Fos en réponse à l'administration de différents psychostimulants (d-amphétamine, cocaïne, méthylphénidate) qui ont tous la capacité d'augmenter la concentration extracellulaire de DA (Borgkvist and Fisone, 2007; Di Chiara and Imperato, 1988; Wang and McGINTY, 1999). Alors que le patron d'expression de c-Fos dans les structures du cerveau antérieur a été largement caractérisé (Kovács, 1998; Sagar et al.), les données disponibles concernant une éventuelle régulation au niveau de la moelle spinale restent parcellaires. Nos résultats indiquent clairement que l'administration de psychostimulants augmentent le nombre de cellules exprimant la forme phosphorylée de c-Fos suggérant que ces composés sont capables d'activer des circuits neuronaux spinaux. Nos analyses révèlent que l'expression de p-cFos n'est pas restreinte à une lamina et n'est pas spécifique d'un sous-type de neurones spinaux. Il est intéressant de noter qu'au sein de la moelle spinale, l'administration d'amphétamine n'induit pas l'expression de cFos dans les neurones exprimant les D2R. Ce résultat contraste avec ce qui a été précédemment observé au sein du striatum où l'augmentation de c-Fos est retrouvée dans les neurones exprimant les D1R mais aussi les D2R (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si les neurones spinaux activés expriment préférentiellement les D1R. L'utilisation de bloqueurs spécifiques des différents transporteurs des monoamines (SERT, NET et DAT) nous a permis de privilégier l'hypothèse de la contribution de la dopamine dans la régulation de l'expression de c-Fos induite par les psychostimulants. En effet, parmi les composés utilisés, seul le bloqueur sélectif du transporteur de la DA a été capable d'induire un patron de régulation de c-Fos similaire à celui induit par l'amphétamine, la cocaïne ou le méthylphénidate suggérant que la libération de DA est suffisante pour récapituler ces effets. A ce stade, il serait intéressant de tester l'impact de l'inactivation pharmacogénétique des neurones DA

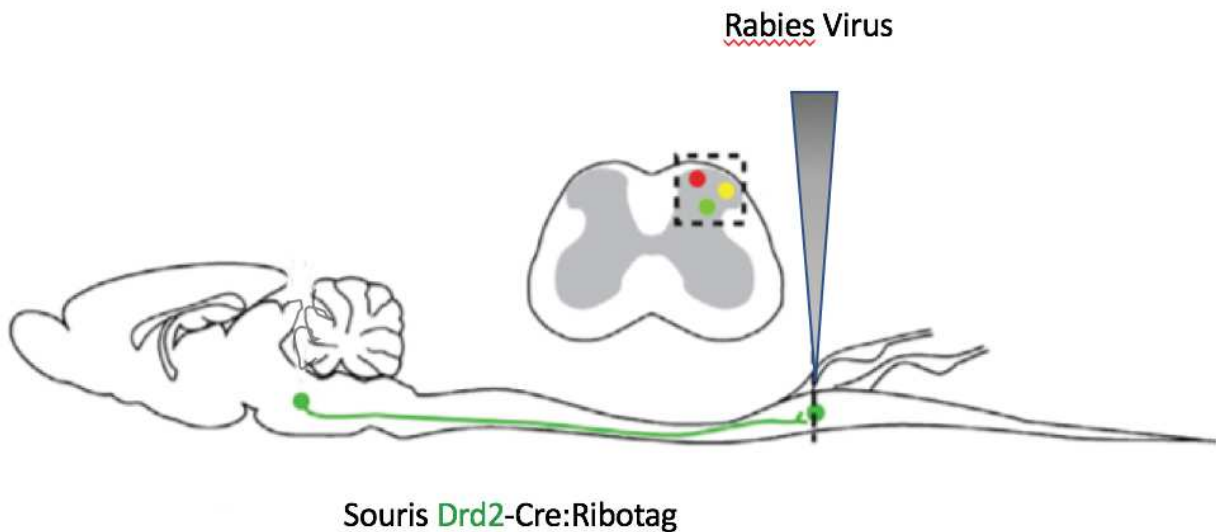
diencephalospinaux sur le patron d'expression de c-Fos induit par l'administration des psychostimulants. Nos résultats soulèvent bien évidemment la question du rôle fonctionnel des neurones c-Fos positifs dans les réponses comportementales induites par les psychostimulants. L'injection de vecteurs viraux permettant l'expression d'opsines activatrices (channelrhodopsin 2) ou inhibitrices (ArchT) ou de DREADD (*pour Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*) au niveau de la moelle spinale de souris de la lignée c-Fos-CreERT2 nous permettrait de contrôler temporellement et spatialement l'activité des cellules qui auront exprimés c-Fos en réponse à une première administration de psychostimulants. Ainsi, nous pourrions évaluer si ces neurones participent aux effets psychomoteurs induits par ces composés. Cette stratégie d'étiquetage de neurones activés pourrait également nous permettre d'évaluer si les mêmes neurones spinaux sont réactivés lors d'injections répétées de psychostimulants. De telles expériences constitueraient un premier pas vers la démonstration de la mise en place d'une plasticité neuronale induite par les drogues au sein des circuits neuronaux spinaux.

Outre l'hyperactivité motrice et l'hyperréflexie, les psychostimulants ont la caractéristique commune d'augmenter les perceptions sensorielles qu'elles soient auditives, visuelles ou tactiles (Cherng et al., 2007). Les stimulations tactiles à la périphérie peuvent moduler l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV projetant vers le circuit de la récompense (Brischoux, 2009; de Lafuente and Romo). L'habénula latérale est une structure au centre de cette interaction entre perception sensorielle et récompense (Benabid and Jeaugey, 1989; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Shelton et al., 2012). La perception de stimuli tactiles douloureux (Benabid and Jeaugey, 1989; Nagao et al., 1993) et non douloureux (Chang et al., 2017) est capable d'activer les neurones de l'habénula.

Cette activation résulte en une innervation GABAergique des structures limbiques impliquées dans le circuit de la récompense tel que le Nacc et entraîne ainsi une inhibition de ce circuit qui se traduit en une diminution de libération de dopamine (Mathis, 2019; Salas) et du comportement d'addiction (moins d'hyperactivité locomotrice, moins de recherche abusives de drogue) (Kim et al., 2013; Wang et al., 2000; Yang et al., 2011). Il existe donc une voie ascendante permettant aux informations sensorielles de la périphérie d'atteindre le système mésolimbique, via l'intermédiaire de l'habénula. On parle de voie spino-mésolimbique (Chang et al., 2017). Cette voie spino-mésolimbique passe par la colonne dorsale (DC) de la moelle spinale formant une des deux voies majeures de la transmission de l'information tactile. La DC traite les informations modulant la discrimination tactile, les vibrations, la proprioception (Inman and Steward, 2003). En ce sens, il serait intéressant de déterminer si 1) les patrons d'activation de c-Fos dans la moelle spinale induits par les psychostimulants varient en fonction de la nature des stimuli somatosensoriels auxquels les souris sont exposées lors des injections et si 2) la texture des sols (agréables ou aversifs) peut influencer les propriétés motivationnelles des psychostimulants mesurées dans des protocoles de préférence de place conditionnée et enfin 3) si les neurones s'activant au niveau de la moelle après administration de psychostimulants peuvent être responsable de l'activation des neurones de l'habénula. De telles expériences permettraient d'apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes neuronaux sous-tendant les effets aversifs induits par les psychostimulants fréquemment observés une fois les effets positifs dissipés (Jhou et al., 2013).

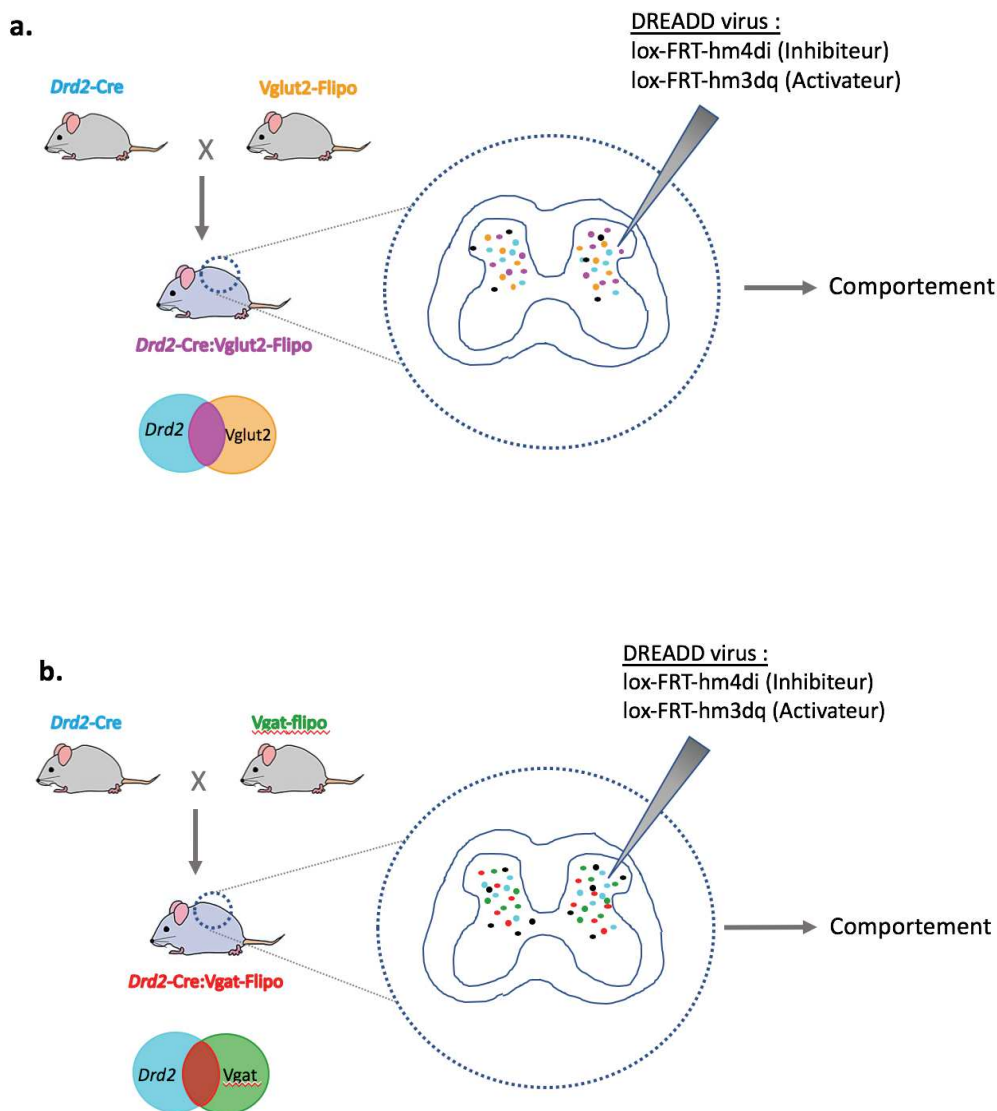
PERSPECTIVES (Box 1-3)**Box 1 : Déterminer le connectome des neurones spinaux exprimant les D2R**

Cette question pourra être abordée par des techniques de traçage rétrograde transsynaptique en utilisant un virus de la rage modifié permettant d'établir une cartographie précise des neurones faisant synapse sur les neurones spinaux exprimant les D2R.



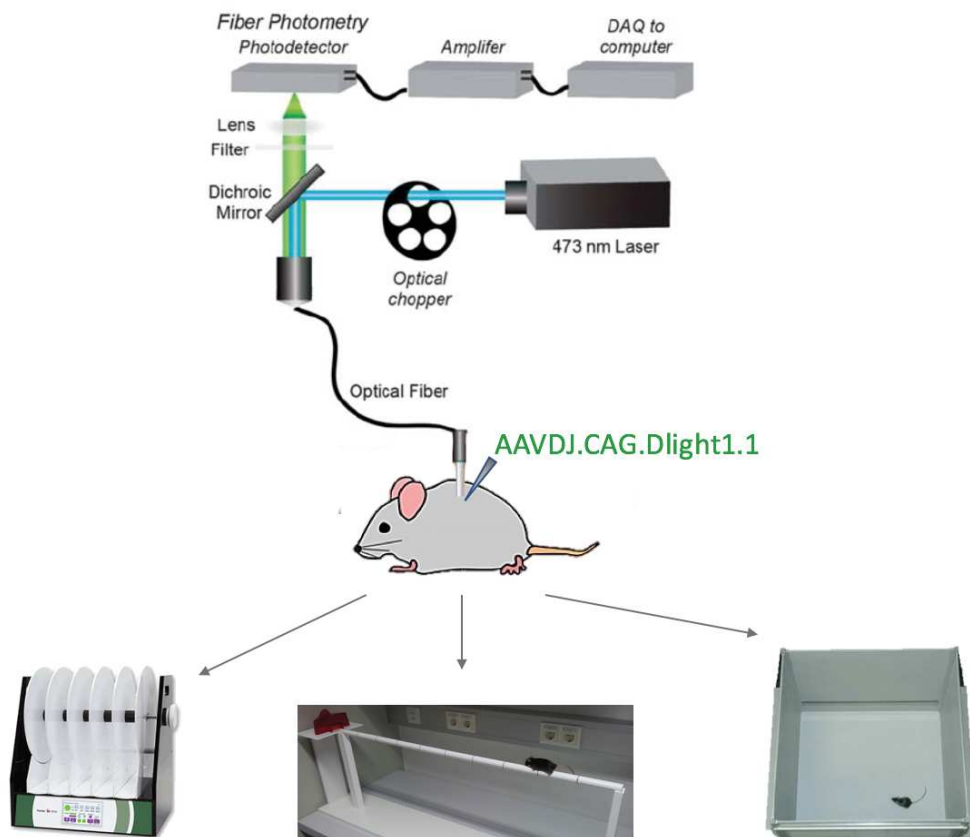
BOX 2 : Étudier le rôle des neurones spinaux excitateurs vs inhibiteurs exprimant les D2R

Ce point nécessitera la mise en œuvre d'une stratégie de génétique dite intersectionnelle. Le croisement entre des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Drd2* et la Flpo recombinase sous contrôle des promoteurs (a) *Vglut2* ou (b) *Vgat* nous permettra après l'injection de vecteurs viraux exprimant des opsines ou des DREADD de visualiser, d'activer ou de rendre fonctionnellement silencieux les neurones spinaux D2R excitateurs vs inhibiteurs. Cette même stratégie pourra être appliquée à des populations neuronales plus restreintes (SOM, PV, Penk).



Box 3 : Mesurer la libération de DA dans la moelle spinale d'animaux en comportement

L'utilisation de la photométrie fibrée couplé à l'utilisation de la sonde Dlight1.1 (Patriarchi et al., 2018) permettra d'enregistrer la libération de DA au niveau de la moelle spinale chez l'animal libre de ses mouvements et réalisant une tâche comportementale



CONCLUSION

Il est clair que beaucoup de réseaux spinaux sont modulés par la dopamine, notamment via l'implication des D2R. Cependant, les mécanismes par lesquels la dopamine agit ainsi que le rôle des D2R sont encore très flous. Ces travaux de thèse avaient pour objectifs d'apporter d'abord une caractérisation poussée des cellules D2R-positives au sein de la moelle spinale de souris. Nous avons pu réaliser un état des lieux précis concernant l'identité cellulaire et neurochimique des cellules D2R-positives du niveau lombaire de la moelle spinale, grâce à différentes techniques de biochimie et à la lignée de souris *Drd2-Cre:Ribotag* développée au sein du laboratoire. Les D2R sont exprimés dans tous les segments de la moelle spinale et présentent une expression préférentielle au niveau de la corne dorsale. De plus, ces récepteurs sont exclusivement présents dans les populations neuronales et non gliales. Nous avons mis en avant le grand niveau d'hétérogénéité des neurones D2R-positifs, qui sont exprimés aussi bien dans des populations de neurones excitateurs qu'inhibiteurs. L'approche fonctionnelle utilisée pour comprendre le rôle de D2R spinaux au niveau lombaire ne nous permet pas de conclure sur un phénotype clair. Cependant, le KO conditionnel du gène *Drd2* au niveau de la corne dorsale du segment lombaire de la moelle n'altère pas la locomotion et n'entraîne pas d'ataxie ou de paralysie. Les prochaines étapes de cette étude pourraient être de viser une approche fonctionnelle plus précise. En effet, la caractérisation réalisée des neurones D2R-positifs de la moelle ouvre de nouvelles portes pour permettre d'avoir des approches fonctionnelles plus spécifiques en ciblant des sous-populations neuronales. Ainsi, il serait intéressant de comprendre le rôle des D2R au sein des différentes populations pour, à terme, avoir une vue d'ensemble plus claire sur les réseaux neuronaux modulés par la dopamine via ces récepteurs. Une compréhension des mécanismes de modulation dopaminergique au niveau spinal pourrait également permettre d'ouvrir des champs de recherche encore plus

poussés pour comprendre les réels mécanismes dopaminergiques et circuits spinaux impliqués dans le SJSR.

ANNEXE



En parallèle de ces travaux de thèse, j'ai contribué à une étude faisant l'objet d'une publication parue en 2019 dans *Journal Of Neurochemistry*.

Ces travaux avaient pour but de déterminer si des stimuli de natures différentes (aversifs vs gratifiants) pouvaient moduler l'activation des neurones de projection (*Striatal Spiny Projection neuron*) de la partie caudale du striatum (TS pour *Tail of the Striatum*). Pour répondre à cet objectif, une caractérisation de la distribution des récepteurs D1R et D2R du TS a d'abord été réalisée dans le but de définir différents territoires du striatum. Puis l'activation de la protéine kinase ERK au niveau du TS a été évaluée en réponse à des stimuli aversifs et gratifiants. Cette étude a mis en avant l'existence d'un patron d'activation opposé de la protéine ERK au niveau du TS en fonction de la nature du stimulus.

Pour ce projet, j'ai participé aux expériences pharmacologiques en réalisant certains traitements sur des souris *Drd2eGFP* (IP de différentes drogues ; amphétamines, Lithium) ainsi qu'aux techniques d'histologies (Prélèvement des tissus (cerveaux), coupes et immunohistochimie). J'ai également contribué à réaliser un test comportemental visant à induire un stress naturel chez la souris, en la mettant en contact avec des cotons imbibés d'eau (contrôle) ou d'une substance présente dans l'urine de renard (stress naturel). Ces expériences ont été réalisées au sein de notre laboratoire avec l'aide des membres de l'équipe.

ORIGINAL
ARTICLE

Contrasting patterns of ERK activation in the tail of the striatum in response to aversive and rewarding signals

Giuseppe Gangarossa*[†] , Laia Castell*, Liliana Castro[‡] , Pauline Tarot*, Frederic Veyrunes[§], Pierre Vincent[‡], Federica Bertaso* and Emmanuel Valjent*

*IGF, CNRS, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France

[†]Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, Paris, France[‡]Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, Paris, France[§]Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, ISEM, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

Abstract

The caudal part of the striatum, also named the tail of the striatum (TS), defines a fourth striatal domain. Determining whether rewarding, aversive and salient stimuli regulate the activity of striatal spiny projection neurons (SPNs) of the TS is therefore of paramount importance to understand its functions, which remain largely elusive. Taking advantage of genetically encoded biosensors (A-kinase activity reporter 3) to record protein kinase A signals and by analyzing the distribution of dopamine D1R- and D2R-SPNs in the TS, we characterized three subterritories: a D2R/A2aR-lacking, a D1R/D2R-intermingled and a D1R/D2R-SPNs-enriched area (corresponding to the amygdalostriatal transition). In addition, we provide evidence that the distribution of D1R- and D2R-SPNs in the TS is evolutionarily conserved (mouse, rat, gerbil). The *in vivo* analysis of extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation in these TS subterritories in

response to distinct appetitive, aversive and pharmacological stimuli revealed that SPNs of the TS are not recruited by stimuli triggering innate aversive responses, fasting, satiety, or palatable signals whereas a reduction in ERK phosphorylation occurred following learned avoidance. In contrast, D1R-SPNs of the intermingled and D2R/A2aR-lacking areas were strongly activated by both D1R agonists and psychostimulant drugs (d-amphetamine, cocaine, 3,4-methyl enedioxy methamphetamine, or methylphenidate), but not by hallucinogens. Finally, a similar pattern of ERK activation was observed by blocking selectively dopamine reuptake. Together, our results reveal that the caudal TS might participate in the processing of specific reward signals and discrete aversive stimuli.

Keywords: D1R, D2R, dopamine, ERK, psychostimulants, striatum.

J. Neurochem. (2019) <https://doi.org/10.1111/jnc.14804>

Received February 8, 2019; revised manuscript received May 13, 2019, NaN, ; accepted June 19, 2019.

Address correspondence and reprint requests to Giuseppe Gangarossa and Emmanuel Valjent, IGF, CNRS, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France. E-mails: giuseppe.gangarossa@univ-paris-diderot.fr and emmanuel.valjent@igf.cnrs.fr.

Abbreviations used: 5-HT, serotonin; A2aR, adenosine A2a receptor; AKAR3, A-kinase activity reporter 3; AST, amygdalostriatal transition area; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; D1R, dopamine D1 receptor; D2R, dopamine D2 receptor; DA, dopamine; DARPP-32, dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein Mr 32 kDa; DAT, dopamine transporter; DOI, 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine; DS,

dorsal striatum; eGFP, enhanced green fluorescence protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HFHS, high-fat high sugar; LGN, lateral geniculate nucleus of the thalamus; MDMA, 3,4-methyl enedioxy methamphetamine; MGN, medial geniculate nucleus of the thalamus; NE, norepinephrine; NET, norepinephrine transporter; PCP, phencyclidine; PDE10A, phosphodiesterase type 10; PDE4, phosphodiesterase type 4; PKA, protein kinase A; PTZ, pentylentetrazole; rDS, rostral part of the dorsal striatum; RFP, red fluorescent protein; RRID, research resource identifier; SERT, serotonin transporter; SNc, substantia nigra pars compacta; SPNs, striatal projection neurons; TMT, 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline; TS, tail of the striatum; VGLUT2, vesicular glutamate transporter type 2; VPn, ventral posterior nucleus.

The striatum, the main input structure of the basal ganglia circuit, controls distinct functions ranging from motor actions to reward processing and motivated behaviors (Nicola 2007; Balleine *et al.* 2007; Gerfen and Surmeier 2011; Graybiel and Grafton 2015). This functional diversity in part relies on its ability to dynamically integrate multimodal excitatory inputs arising from the cortex and the thalamus (Huerta-Ocampo *et al.* 2014). These excitatory inputs are topographically segregated, delineating functional boundaries among the three classical striatal domains that include sensorimotor, associative, and limbic domains (Yin and Knowlton 2006; Belin *et al.* 2009; Gruber and McDonald 2012).

However, recent large-scale mouse projectome studies support the existence of a fourth domain (Menegas *et al.* 2015; Hunnicutt *et al.*, 2016). Corresponding to the tail of the striatum (TS), this domain is densely innervated by excitatory inputs from the entorhinal, auditory and visual cortices and sensory thalamic nuclei including the lateral and medial geniculate thalamus and the ventral posterior nucleus (Gangarossa *et al.* 2013b; Menegas *et al.* 2015; Hunnicutt *et al.*, 2016; Jiang and Kim 2018). The integration of the information arising from these cortical and thalamic areas is modulated by dopaminergic (DA) neurons clustered in the lateral part of the substantia nigra pars compacta (Gangarossa *et al.* 2013b; Menegas *et al.* 2015; Poulin *et al.* 2018). These DA neurons, which express VGLUT2 and lack D2 autoreceptors (Gangarossa *et al.* 2013b; Poulin *et al.* 2018), contribute to reinforcement learning that promotes avoidance of threatening stimuli (Menegas *et al.* 2018).

In addition to its specialized inputs connectivity, the TS is also characterized by a topographic non-random distribution of striatal projection neurons (SPNs) expressing D1R (D1R-SPNs) and D2R/A2aR (D2R/A2aR-SPNs). Indeed, we have previously identified in the TS a territory lacking D2R/A2aR-SPNs and exclusively composed of D1R-SPNs (Gangarossa *et al.* 2013b). Although this peculiar organization suggests that information processed within the TS could differ from the one described in the sensorimotor, associative and limbic domains, the nature of the stimuli that recruit the SPNs of the TS remain largely unknown.

The present study aims to determine whether stimuli of different nature (rewarding, aversive and salient) modulate the activation of SPNs in the TS. We first performed an accurate characterization of the distribution of D1R- and D2R/A2aR-SPNs within the TS, which allowed us to delineate three striatal subterritories, namely the (i) intermingled area, the (ii) D2R/A2aR-lacking area and the (iii) amygdalostriatal transition (AST) area. We also analyzed the ability of distinct appetitive, aversive and pharmacological stimuli to activate caudal SPNs by monitoring ERK phosphorylation (P-ERK), used here as a molecular readout of striatal activation (Bertran-Gonzalez *et al.* 2010; Gangarossa *et al.* 2013c; Hutton *et al.* 2017; Valjent *et al.* 2019). Our results reveal opposing patterns of ERK activation in the TS

in response to innate or learned avoidance behaviors compared to rewarding experiences evoked by psychostimulant drugs.

Materials and methods

Animals

C57Bl/6J ($n = 153$) (RRID:IMSR_JAX:000664 from Charles River Laboratories, France, RRID:SCR_003792), FVB/N ($n = 3$) (RRID:IMSR_JAX:001800 from Janvier Laboratories, France), *Drd2*-eGFP ($n = 53$) (RRID:MMRRC_000230-UNC), *Nr4a1*-eGFP ($n = 7$) (RRID:MMRRC_012015-UCD) (Gong *et al.* 2003) and *Drd2*-eGFP/*Drd1a*-tdTomato ($n = 4$, kindly provided by C. Kellendonk, Columbia University, NY USA and previously characterized (Biezonski *et al.* 2015)) mice were used in the present study. *Drd2*-eGFP/*Drd1a*-tdTomato mice were generated by crossing *Drd1a*-tdTomato (Tg(*Drd1a*-tdTomato)6Calak/J, RRID:IMSR_JAX:016204) and *Drd2*-eGFP (Tg(*Drd2*-EGFP)S118Gsat/Mmnc, RRID:IMSR_MMRRC:000230) mice. Only male 8- to 10-week-old mice (25-30 grams) were used in the current study.

Unless specifically stated, all animals (mice, rats, and gerbils) were housed in groups of 2 to 5 per cage (standard sizes according to the European animal welfare guidelines 2010/63/EC) and maintained in a 12 h light/dark cycle (lights on from 7:30 am to 7:30 pm), in stable conditions of temperature (22°C) and humidity (60%), with food and water provided *ad libitum*. This study was not pre-registered.

We used PCR to determine the genotype of our transgenic mice. The following PCR primers were used: 5'-GCAGAAGAACGG-CATCAAG-3' (forward) and 5'-GCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3' (reverse) for GFP; 5'-CTTCTGAGGCGGAAAGAAC-3' (forward) and 5'-TTTCTGATTGAGAGCATTTCG-3' (reverse) for tdTomato.

Eighteen adult males from nine different wild mouse taxa (genus *Mus*), which included three subspecies of *Mus musculus* [*Mus musculus domesticus* ($n = 2$), *Mus musculus castaneus* ($n = 2$) and *Mus musculus musculus* ($n = 2$)], four species of the subgenus *Mus* [*Mus spretus* ($n = 2$), *Mus spicilegus* ($n = 2$), *Mus macedonicus* ($n = 2$) and *Mus caroli* ($n = 2$)] and two species from other subgenera (*Nannomys minutoides* ($n = 2$) and *Coelomys pahari* ($n = 2$)), were purchased from the Wild Mouse Genetic Repository of Montpellier (France) except for *Nannomys minutoides* that were raised at the breeding facility (CECEMA) of the University of Montpellier, France. Male 3- to 4-month-old Mongolian gerbils ($n = 3$, 70–80 g) (Janvier Laboratories, France) were kindly provided by Gilles Desmadryl (INM Montpellier France). Male 10-week-old Sprague-Dawley rats ($n = 3$, 450 g, RRID:RGD_734476) were purchased from Charles River Laboratories (RRID:SCR_003792, France). All experiments were performed during the light phase (notably, 10 am to 4 pm). Male wild mouse taxa, gerbils and rats were used exclusively for the neuroanatomical characterization (Fig. 1). For behavioral and pharmacological experiments arbitrary assignments were used to allocate mice to specific groups. No randomization was performed to allocate subjects in the study. No blinding was performed for animal experiments. Housing and experimental procedures were approved by the French Agriculture and Forestry Ministry (C34-172-13). Experiments were performed in accordance with the animal welfare guidelines 2010/63/EC of the European Communities Council Directive regarding the care and

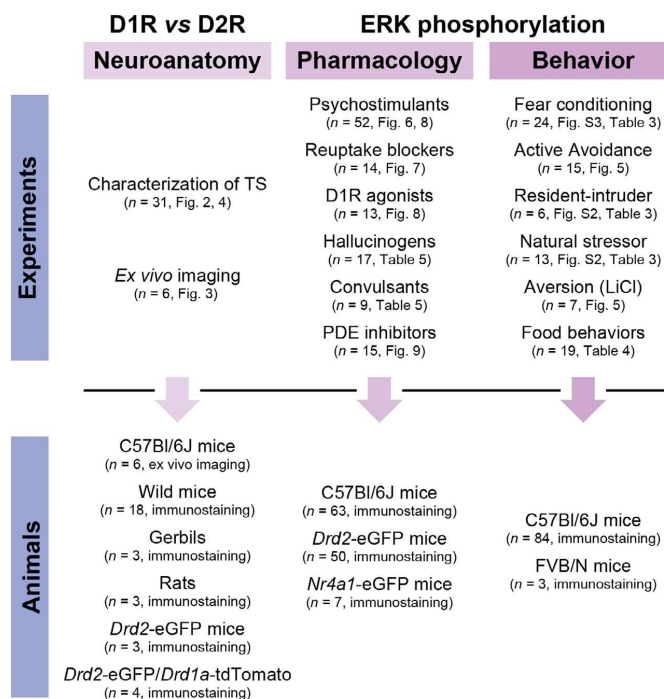


Fig. 1 Description of the study. The whole study was designed in order to characterize the cell-type specific organization (Neuroanatomy) as well as the molecular patterns of ERK phosphorylation (Pharmacology and Behavior) within the territories of the tail of the striatum (TS). The figure summarizes the experimental conditions and the animal strains used for each purpose (*n* = number of mice). For the detailed repartition of the experimental groups please see Figures, Tables and Supplemental Tables. For the detailed description of each experiment please see Material and Methods. No animals were excluded in this study. D1R: dopamine D1 receptor; D2R: dopamine D2 receptor; ERK: extracellular signal-regulated kinase; LiCl: lithium chloride; PDEs: phosphodiesterases; TS: tail of the striatum.

use of animals for experimental procedures. All animals were anaesthetized (euthasol, 360 mg/kg, i.p., TVM lab, France) immediately after acute pharmacological or behavioral experiments (see *Tissue preparation and immunofluorescence* section) (Fig. 1). None of these manipulations required painful and invasive techniques. Male wild mouse taxa, gerbils and rats were immediately anaesthetized (euthasol, 360 mg/kg, i.p.) in their home cages (no pharmacological or behavioral experiments) before transcardiac perfusion with 4% (weight/vol) paraformaldehyde and exclusively used for the neuroanatomical characterization (see Figs 1 and 4 and *Tissue preparation and immunofluorescence* section). No invasive or painful techniques (surgery) were used during our manipulations.

Drugs and treatment

Drugs and treatment are detailed in Table 1. All drugs were acquired within the last 5 years and stored following the manufacturers recommendation. Drugs were administered at doses in agreement with previous studies showing behavioral and/or molecular modifications (see Table 1). For *in vivo* pharmacological experiments, mice were habituated to handling and saline injections three consecutive days before the experiments. Drugs were dissolved in

0.9% (w/v) NaCl (saline) and administered on day 4. All the mice were injected in the home cage and perfused 15 or 30 min after injection.

Animal behaviors

Auditory fear conditioning

The experiments were carried out in a fear conditioning apparatus comprising two test boxes placed within ventilated and soundproof cubicles (Imetronic, Pessac, France). Two different contextual configurations were used for the conditioning (box A: smooth white foam on the walls, square cage, metal grid, smooth floor; box B: dark honeycomb foam on the walls, circle cage, metal grid, rough floor). Boxes were cleaned before and after each session with 70% ethanol. After 10 min of habituation to box A or B, mice received 5 pairings of one tone (CS+, 10 s) with an unconditioned stimulus (US: 0.6 mA scrambled footshock, 2 s, coinciding with the last 2 s of CS + presentation). The interval between each pairing was arbitrarily assigned between 35 and 60 s. The session finished 30 s after the end of the last CS+. Freezing behavior was recorded using a tight infrared frame and the threshold for considering freezing

Table 1 List of drugs

Drugs	Doses	Catalog N	Supplier (RRID)	References
d-amphetamine	10 mg/kg, i.p.	#2813	RRID:SCR_003689	Gangarossa <i>et al.</i> (2013a)
Cocaine	15 mg/kg, i.p.	#C5776	RRID:SCR_008988	Gangarossa <i>et al.</i> (2013a)
MDMA	10 mg/kg, i.p.	#M5029	RRID:SCR_008988	Doly <i>et al.</i> (2009)
Methylphenidate	15 mg/kg, i.p.	#M2892	RRID:SCR_008988	Pascoli <i>et al.</i> (2005)
GBR12783	10 mg/kg, i.p.	#0513	RRID:SCR_003689	Valjent <i>et al.</i> (2010)
Desipramine	20 mg/kg, i.p.	#3067	RRID:SCR_003689	Valjent <i>et al.</i> (2004)
Fluoxetine	10 mg/kg, i.p.	#0927	RRID:SCR_003689	Valjent <i>et al.</i> (2004)
SKF81297	5 mg/kg, i.p.	#1447	RRID:SCR_003689	Gangarossa <i>et al.</i> (2013c)
SKF83822	5 mg/kg, i.p.	#2075	RRID:SCR_003689	(Gangarossa <i>et al.</i> 2011)
SKF83959	5 mg/kg, i.p.	#2074	RRID:SCR_003689	Gangarossa <i>et al.</i> (2011)
Apomorphine	3 mg/kg, s.c.	#2073	RRID:SCR_003689	Gangarossa <i>et al.</i> (2013c)
SCH23390	0.1 mg/kg, i.p.	#0925	RRID:SCR_003689	Valjent <i>et al.</i> (2000)
LiCl	150 mg/kg, i.p.	#L4408	RRID:SCR_008988	Longoni <i>et al.</i> (2011)
DOI	10 mg/kg, i.p.	#D101	RRID:SCR_008988	Halberstadt <i>et al.</i> (2009)
Phencyclidine	3 mg/kg, s.c.	#P3029	RRID:SCR_008988	Mouri <i>et al.</i> (2012)
Dizocilpine	0.3 mg/kg, i.p.	#0924	RRID:SCR_003689	Valjent <i>et al.</i> (2000)
PTZ	60 mg/kg, i.p.	#P6500	RRID:SCR_008988	Assaf <i>et al.</i> (2011)
Kainate	20 mg/kg, i.p.	#K0250	RRID:SCR_008988	Blüthgen <i>et al.</i> (2017)
Papaverine	30 mg/kg, i.p.	#P3510	RRID:SCR_008988	Nishi <i>et al.</i> (2008)
Rolipram	10 mg/kg, i.p.	#0905	RRID:SCR_003689	Nishi <i>et al.</i> (2008)
SKF38393	1 μ M	#0922	RRID:SCR_003689	Polito <i>et al.</i> (2015)
CGS21680	1 μ M	#1063	RRID:SCR_003689	Polito <i>et al.</i> (2015)
Forskolin	12.5 μ M	#1099	RRID:SCR_003689	Polito <i>et al.</i> (2015)

d-amph, d-amphetamine; MDMA, 3,4-Methylenedioxyamphetamin; LiCl, Lithium chloride; DOI, 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine; Dizocilpine, MK801; PTZ, Pentylentetrazol

behavior was set up at 2 s. The first 10 min of habituation were used to assess the basal freezing. Mice were perfused immediately after conditioning.

Active avoidance

The experiments were carried out in a shuttle box placed within a ventilated and soundproof cubicle (Imetronic, Pessac, France). The apparatus consisted in two square compartments (20 × 20 cm) separated by a partition. Each compartment was equipped with metal grid, independent houselights, and tight infrared beams frame to measure locomotor activity. Between each session the apparatus was cleaned with 70% ethanol. Mice were first subjected to a habituation session during which they were exposed to 10 alternating presentations of two different tones (8 s). The two tones were stopped as soon as mice moved to the adjacent compartment. A conditioning session (30 min) comprised 30 training trials. A training trial consisted of an 8 s avoidance interval, followed by a 5 s escape interval. During the avoidance interval, a tone (CS+) was presented for the duration of the interval or until the mice shuttled (avoidance behavior) to the other compartment. If the animal avoided, the CS + was terminated and no escape interval was presented. If the animal did not avoid, an unconditioned stimulus (US: 0.7 mA scrambled footshock coinciding with the last 5 s of CS + presentation) was delivered through the grid floor of the occupied half of the shuttle box. In such paradigm, the US was used to motivate the animal to move to the other compartment (escape), thus terminating the trial. During the intertrial interval, the animal awaited the next trial and was free to cross between compartments at

will. During the conditioning session mice were also randomly exposed to the other tone (CS-, 8 s), which was never associated with the US. The percentage of avoidances was used as an index of the learning performance. Mice were perfused immediately after the habituation to the shuttle box, the first or the second conditioning session.

Resident-intruder

This test is based on territory defensive behaviors against unfamiliar intruding conspecifics. A single-housed resident male (3- to 6-month-old sexually experienced male FVB/N, 40 g) was confronted in its home-cage to a group-housed intruder male C57Bl/6J mouse for 10 min. Both the resident and intruder were perfused immediately after the test.

Natural stressors

The mice were habituated in a medium-sized box during the first day. Twenty-four hours later each animal was transferred to the same cage. After 15 min of habituation, a petri dish containing either mouse's own bedding (control condition) or rat bedding was introduced in the cage. Similarly, after 15 min of habituation mice were exposed to a filter paper impregnated with water (control condition) or 20 μ L of 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT) (2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline, a constituent of fox urine). Rat bedding and TMT represent two natural stressors (predator odors). All mice were perfused immediately after 15 min of exposure to mouse bedding, rat bedding, water, or TMT.

Food-related behavior

Mice were single-housed during the whole protocol. Five groups of mice were used: (i) a control group with *ad libitum* access to chow pellets, (ii) a fasted group food-deprived for 12 h (dark period), (iii) a group of fasted/refed mice (one cycle), (iv) a group of fasted/refed mice during six cycles and (v) a group of bingeing mice daily exposed to high-fat high-sugar (HFHS) diet during 1 h/day for six intermittent days. All mice were perfused with PFA 4% 30 min following the last exposure to food (chow or HFHS diet).

Tissue preparation and immunofluorescence

All animals were rapidly anaesthetized with euthasol (360 mg/kg, i.p., TVM lab, France) and transcardially perfused with 4% (weight/vol) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5). Euthasol (360 mg/kg, i.p.), a pentobarbital sodium solution, allows rapid, efficient, and deep anesthesia necessary to preserve phosphorylation. For the neuroanatomical characterization mice were perfused with no specific order. For the pharmacological and behavioral experiments mice were perfused every 6 min by arbitrarily alternating subjects and groups (behavioral conditions or pharmacological treatments). Brains were post-fixed overnight in the same solution and stored at 4°C. Tissues were prepared as previously (Gangarossa *et al.* 2013a). Thirty micrometer-thick sections were cut with a vibratome (Leica, France, RRID:SCR_008960) and stored at -20°C in a solution containing 30% (vol/vol) ethylene glycol, 30% (vol/vol) glycerol, and 0.1 M sodium phosphate buffer, until they were processed for immunofluorescence. Striatal sections were identified using the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos 2008) and sections comprised between -1.40 and -1.70 mm from bregma were included in the analysis. Sections were processed as follows: free-floating sections were rinsed three times (10 min/wash) in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5). After 15 min of incubation in 0.2% (vol/vol) Triton X-100 in TBS, sections were rinsed again in TBS and then blocked for 1 h in a solution of 3% BSA in TBS. Sections were then incubated overnight or for 72 h at 4°C with the primary antibodies (Table 2) diluted in a TBS solution containing 1% BSA and 0.15% Triton X-100. Sections were rinsed three times for 10 min in TBS and incubated for 45 min with goat Cy3-coupled anti-rabbit (1 : 500, Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA; Cat# 111-165-003, RRID:AB_2338000), goat Alexa Fluor 647-coupled anti-guinea pig (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, Cat# A-21450, RRID:AB_

141882) and goat Alexa Fluor 488-coupled anti-chicken (1:500, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France; Cat# A-11039, RRID:AB_2534096) antibodies. Sections were rinsed for 10 min (twice) in TBS and twice in Tris-buffer (1 M, pH 7.5) before mounting in DPX (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Confocal microscopy and image analysis were carried out at the Montpellier RIO Imaging Facility. All images covering the TS were single confocal sections acquired using sequential laser scanning confocal microscopy (Leica SP8, Wetzlar, Germany) and stitched together as a single image. Double-labeled images from each region of interest were also single confocal sections obtained using sequential laser scanning confocal microscopy (Leica SP8 and Zeiss LSM780). eGFP-immunopositive cells were pseudocolored cyan and other immunoreactive markers were pseudocolored magenta or yellow as indicated in figures. Images used for quantification were all single confocal sections. Cells were considered positive for a given marker (eGFP and P-ERK) only when the nucleus was clearly visible. The D2R/A2AR-lacking, intermingled and the AST areas were identified using *Drd2-eGFP* mice or the anti-A2aR antibody. Quantification was performed manually using the cell counter plugin of the ImageJ software (RRID:SCR_003070) taking as standard reference a fixed threshold of fluorescence. Figures represent the number of neurons averaged from 3 to 4 adjacent sections.

Brain slices preparation

Experiments were performed with 8–11 days old C57Bl/6J mice. Mice were housed under standardized conditions with a 12 h light/dark cycle, stable temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), controlled humidity ($55 \pm 10\%$), and food and water *ad libitum*. All animal procedures were performed in accordance with the Sorbonne University animal care committee regulations and the French Ministry of Agriculture and Forestry guidelines for handling animals. The protocol has been described previously in more details (Yapo *et al.* 2017). Briefly, 300 μm -thick coronal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica, RRID:SCR_008960). Slices were prepared in an ice-cold solution of the following composition: 125 mM NaCl, 0.4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 20 mM glucose, 2.5 mM KCl, 5 mM sodium pyruvate and 1 mM kynurenic acid, saturated with 5% CO_2 and 95% O_2 . The slices were incubated in this solution for 30 min and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50%

Table 2 List of primary antibodies

Antigen	Host	Dilution	Supplier	Catalog N°	RRID
eGFP	Chicken	1 : 1000	Life Technologies	A10262	RRID:AB_2534023
RFP	Rabbit	1 : 1000	MBL	PM005	RRID:AB_591279
DARPP-32	Rabbit	1 : 1000	Cell Signaling	#2306	RRID:AB_823479
D2R	Guinea Pig	1 : 1000	Frontier Institute	D2R-GP-Af500	RRID:AB_2571597
A2aR	Guinea Pig	1 : 1000	Frontier Institute	A2A-GP-Af1000	RRID:AB_2571656
D1R	Guinea Pig	1 : 1000	Frontier Institute	D1R-GP-Af500	RRID:AB_2571595
ERK1/2	Rabbit	1 : 500	Cell Signaling	#4695	RRID:AB_390779
P-ERK1/2	Rabbit	1 : 500	Cell Signaling	#9101	RRID:AB_331646

eGFP, enhanced green fluorescent protein; RFP, red fluorescent protein; DARPP-32, Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa; D2R, dopamine D2 receptor; A2aR, adenosine A2a receptor; D1R, dopamine D1 receptor.

Hanks' Balanced Salt Solution, 5.5 g/L glucose, penicillin-streptomycin, Invitrogen). We used the Sindbis virus as a vector to induce expression of the A-kinase activity reporter 3 (AKAR3) biosensors after overnight incubation. The coding sequences of AKAR3 (Allen and Zhang 2006) were inserted into the viral vector pSinRep5 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). This viral vector was added on the brain slices ($\sim 5 \times 10^5$ particles per slice), and the infected slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5% CO₂. Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl and 5 mM sodium pyruvate saturated with 5% CO₂ and 95% O₂). Recordings were performed with a continuous perfusion of the same solution at 32°C.

Biosensor imaging and data analysis

Live imaging was performed on brain slices, which expressed the AKAR3 biosensor (Polito *et al.* 2014). Slices were kept at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ in the recording solution saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ for around 30 min before imaging. The composition of the recording solution was the same as the slicing solution except that it contained no kynurenic acid and CaCl₂ was 2 mM. The slice was imaged in a temperature controlled (32°C) recording chamber and continuously perfused at 2 mL/min using a peristaltic pump. The same perfusion system was used to apply drugs (SKF38393, Cat. #0922; CGS21680, Cat. #1063; Forskolin, Cat. #1099 purchased from Tocris, RRID:SCR_003689) onto the recorded slice. Wide field imaging was performed using Olympus BX50WI or BX51WI upright microscopes with a 40X 0.8 NA water immersion objective. The donor excitation was provided by an LED source (420 nm diode, Mightex) with a HC434/17 excitation filter (Semrock). The dichroic mirror was BS452 (Semrock). Two images were acquired for every data point by alternating filter for donor (HC479/40) and acceptor (HC542/50 both from Semrock) emission with a filter wheel (Sutter Instruments). Images were acquired using an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Image acquisition was controlled using iVision software (Biovision, RRID:SCR_005057).

Data analysis was done with custom routines written in IGOR Pro (Wavemetric, RRID:SCR_000325) following the previously described protocol (Polito *et al.* 2014; Yapo *et al.* 2017). FRET changes were quantified using ratio of images from donor and acceptor channels for each data point. Corrections for non-uniform illumination, movement and channel mis-registration were done prior to ratio calculation. No corrections for bleed-through or cross-excitation were applied. The ratio value for a region-of-interest (ROI) was calculated by averaging all the individual pixels included in that ROI, weighted by their intensity. Unresponsive cells to either D1R or A2AR agonists were excluded.

Statistical analysis

All statistical comparisons were performed with two-sided tests in Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, RRID:SCR_002798). The distribution of data was determined with Shapiro-Wilk normality test. No sample size calculations were performed. To determine outliers in every experimental group we performed the Grubbs' test in Prism (RRID:SCR_002798). No outliers were identified. All the data were analyzed using either Student *t*-test with equal variances or One-way ANOVA. In all cases, significance

threshold was automatically set at $p < 0.05$ (Prism 6). The one-way ANOVA analysis, where treatment was the independent variable, was followed by Bonferroni *post hoc* test for specific comparisons only when overall ANOVA revealed a significant difference (at least $p < 0.05$) among groups. All the values and statistical analyses have been reported in details in Tables S1–S12.

Results

Distribution of D1R- and D2R-SPNs in the TS is unique

Drd2-eGFP/Drd1a-tdTomato transgenic mice were used to characterize the distribution of D1R- and D2R-expressing SPNs in the TS. The analysis of eGFP (D2R-SPNs) and red fluorescent protein (RFP) (D1R-SPNs) expression revealed that, unlike a large portion of the dorsal striatum (Gangarossa *et al.* 2013b), the distribution of D1R- and D2R-positive cells in the TS was not random (Fig. 2a). At least three distinct territories were identified: 1) a large strip adjacent to the GPe and devoid of D2R/A2AR-SPNs called hereafter the D2R/A2AR-lacking area, 2) an intermingled area in which a random distribution of D1R- and D2R-SPNs was observed, and 3) the amygdalostratial transition area (AST) characterized by a high percentage of SPNs expressing both D1R and D2R (~33%) (Fig. 2a and b). To confirm this non-random distribution, TS sections of *Drd2-eGFP* mice were used to analyze the endogenous eGFP fluorescence in combination with specific markers of D2R- and D1R-SPNs. D2R and A2AR antibodies, that stain D2R-SPNs dendrites, confirmed the existence of the D2R/A2AR-lacking area. Conversely, the strong D1R labeling confirmed that this subterritory of the TS was exclusively composed of D1R-SPNs (Fig. 2c).

The peculiar distribution of D1R- and D2R/A2AR-SPNs in the TS led us to investigate the responsiveness of SPNs located in the D2R/A2AR-lacking and the AST areas in response to the stimulation of D1R and A2AR. In the rostral part of the dorsal striatum, stimulation of both receptors is known to yield an increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and consequent activation of protein kinase A (PKA) in D1R- and D2R/A2AR-SPNs, respectively (Beaulieu and Gainetdinov 2011; Yapo *et al.* 2017). To address this issue, we performed *ex vivo* real-time PKA imaging in mouse TS slices using the genetically encoded biosensor, AKAR3 (Yapo *et al.* 2017). In the D2R/A2AR-lacking area, stimulation of D1R with a saturating dose of SKF38393 (1 μM) yielded a large, but sub-maximal, increase in PKA signals in AKAR3-expressing neurons (Fig. 3a). In contrast, the application of the A2AR agonist, CGS21680 (1 μM), failed to further increase PKA signals. At the end of the experiment, addition of Forskolin (Fsk, 12.5 μM), an activator of adenylyl cyclase, maximally increased the F535/F480 emission ratio (Fig. 3a) (Castro *et al.* 2013). On average, CGS21680 had no effect on the amplitude of the PKA response induced by SKF38393 in the D2R/A2AR-lacking area ($67 \pm 3\%$ vs $65 \pm 2\%$, of the

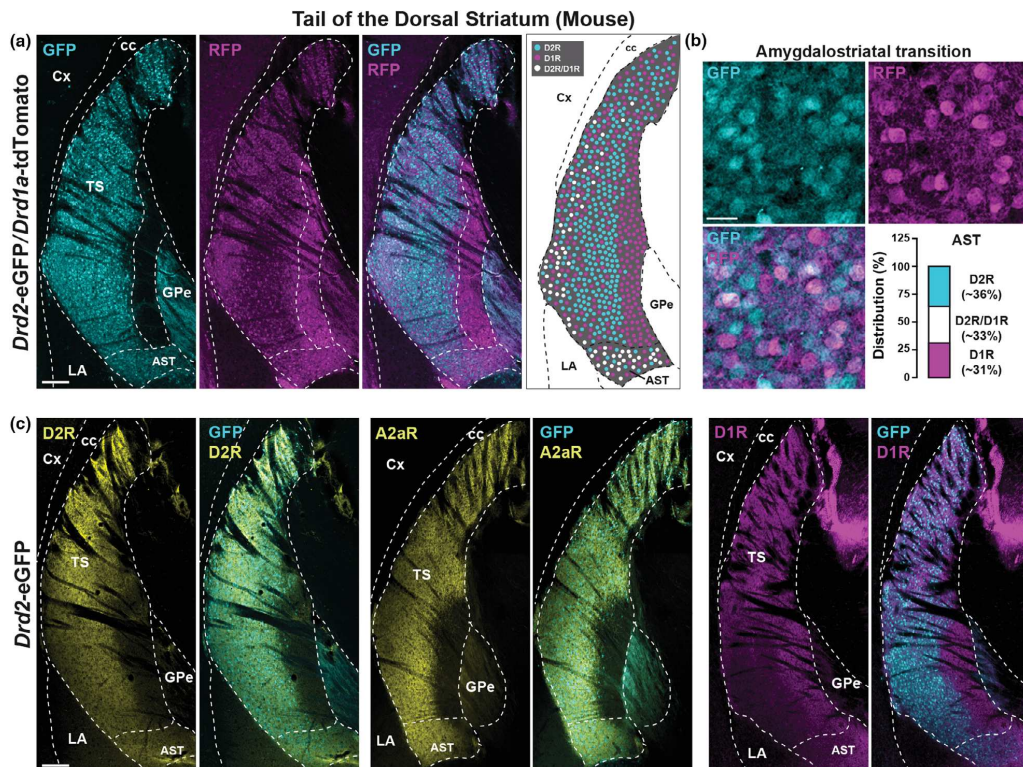


Fig. 2 Distribution of D1R- and D2R-SPNs in the tail of the striatum. (a) RFP (magenta) and GFP (cyan) immunofluorescence in the TS of *Drd2-eGFP/Drd1a-tdTomato* mice. Scale bar, 200 μ m. Schematic cartoon illustrating the distribution of GFP-, RFP- and GFP/RFP-expressing neurons. (b) High magnification of the AST of *Drd2-eGFP/Drd1a-tdTomato* mice. Scale bar, 20 μ m. Distribution expressed as a

percentage of neurons expressing GFP (D2R), RFP (D1R) or both GFP/RFP (D2R/D1R). (c) Double immunofluorescence of D2R, A2aR (yellow), D1R (magenta) and GFP (Cyan) in the TS of *Drd2-eGFP* mice. Scale bar, 200 μ m. Cx: Cortex; cc: corpus callosum; GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostriatal transition; LA: lateral amygdala; TS: tail of the striatum.

maximal Fsk response, respectively) (Fig. 3b). In the AST area, the amplitude of PKA responses produced by SKF38393 ($62 \pm 3\%$ of the maximal Fsk response) was further increased in response to A2aR activation ($94 \pm 1\%$) (Fig. 3c and d). These results show that the D2R/A2AR-lacking area expresses functional D1 receptors and lacks A2A receptors, whereas both receptors are functional in the AST region. Together, these results confirm that SPNs of the D2R/A2AR-lacking area only respond to D1R agonist, whereas the AST responds to both D1R and A2aR activation.

Distribution of D1R- and D2R-SPNs in the TS is evolutionarily conserved

We next wondered whether a similar organization of the TS might be observed in distinct species of the Muridae family. To explore this issue, we examined the presence of the D2R/

A2AR-lacking area in different wild mouse species of the genus *Mus*. This genus comprises several species subdivided into four subgenera encompassing about 7 million years of divergence (Chevret and Dobigny 2005; Veyrunes *et al.* 2006) (Fig. 4a). The lack of A2aR immunoreactivity and the strong expression of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein Mr 32 kDa (DARPP-32), a highly conserved marker of all SPNs, were used here to define a molecular fingerprint of the D2R/A2AR-lacking area (Gangarossa *et al.* 2013b). Using this combination of antibodies, we observed that the D2R/A2AR-lacking area was present in all the species examined which included three subspecies of the *Mus musculus*, four species of *Subgenus Mus* and two species of two of the three other *Subgenera* (Fig. 4a–c). A similar organization of the caudal TS was also identified in *Meriones unguiculatus* (Mongolian gerbil) (Fig. 4d) and

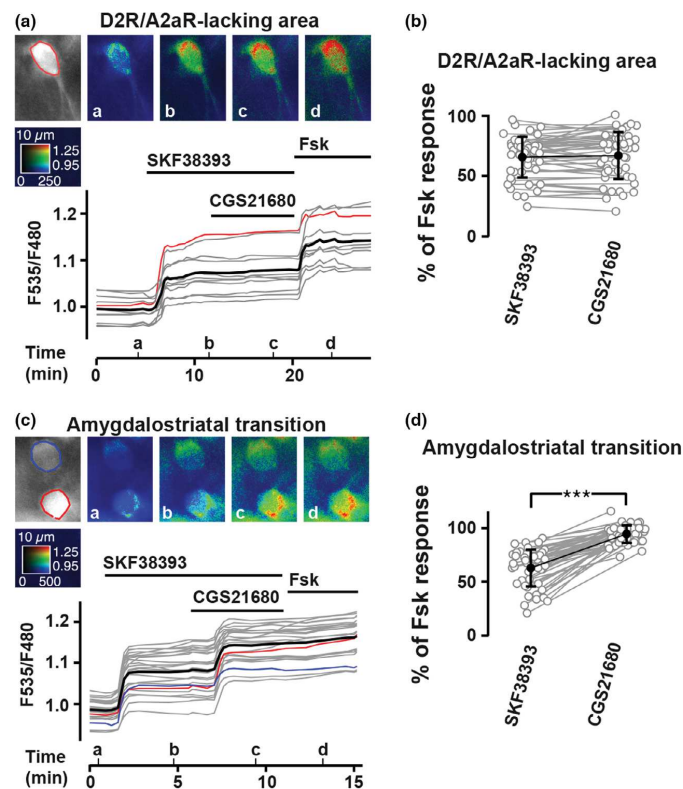


Fig. 3 PKA imaging following activation of D1R and A2aR in the tail of the striatum. Wide-field imaging of mouse striatal brain slices expressing A-kinase activity reporter 3 (AKAR3) biosensor in D2R/A2aR-lacking (a, b) and in the AST (c, d) areas. (a, c) Raw fluorescence of the acceptor is displayed in gray and acceptor/donor fluorescence is displayed in pseudo-color, coded from blue (low F535/F480 ratio, ie low PKA signal) to red (high PKA signal). Ratio images (a–d) correspond to the time points indicated in the bottom graph. Changes in ratio were measured during time and each trace indicates the F535/F480 emission ratio measured on the region of interest of corresponding color shown on the gray image. Traces in gray

correspond to regions of interest outside the selected region of the field. The thick black trace represents the average. Horizontal bars indicate the bath application of SKF38393 (1 μ M), CGS21680 (1 μ M) and forskolin (Fsk, 12.5 μ M). (b) Amplitude of the F535/F480 emission ratio triggered by SKF38393 (SKF, $n_{\text{neurons}} = 48$ from 3 mice) and CGS21680 (CGS, $n_{\text{neurons}} = 48$ from 3 mice) in the D2R/A2aR-lacking area. (d) Amplitude of the F535/F480 emission ratio triggered by SKF38393 (SKF, $n_{\text{neurons}} = 47$ from 3 mice) and CGS21680 (CGS, $n_{\text{neurons}} = 47$ from 3 mice) in the AST. Mean \pm SEM is represented by the filled circles. CGS21680 vs SKF38393 *** $p < 0.001$. AST: amygdalostriatal transition. For detailed statistics see Table S1.

Rattus norvegicus (Fig. 4e). Taken together, our data reveal that the distribution of D1R- and D2R-SPNs in the TS is evolutionarily conserved.

Regulation of ERK activation in the TS by aversive signals

Avoidance behaviors have been associated with the activation of the TS (Menegas *et al.* 2018). To determine the impact of aversive stimuli on the TS, we monitored ERK activation by quantifying the number of phosphorylated-ERK (P-ERK) immunoreactive SPNs in the three territories

of the TS: the intermingled area, the D2R/A2AR-lacking area and the AST (Fig. 5, Figure S1–S3 and Table 3).

We first analyzed the level of P-ERK in mice that underwent the resident-intruder assay. The resident and intruder mice were perfused 10 min after the unfamiliar mouse was placed inside the resident's cage. No significant differences were found in the number of P-ERK-positive neurons in the TS (Figure S2a and Table S3). We then tested whether exposure to predator odors was able to modulate P-ERK in the TS. Although mice exposed to rat bedding or

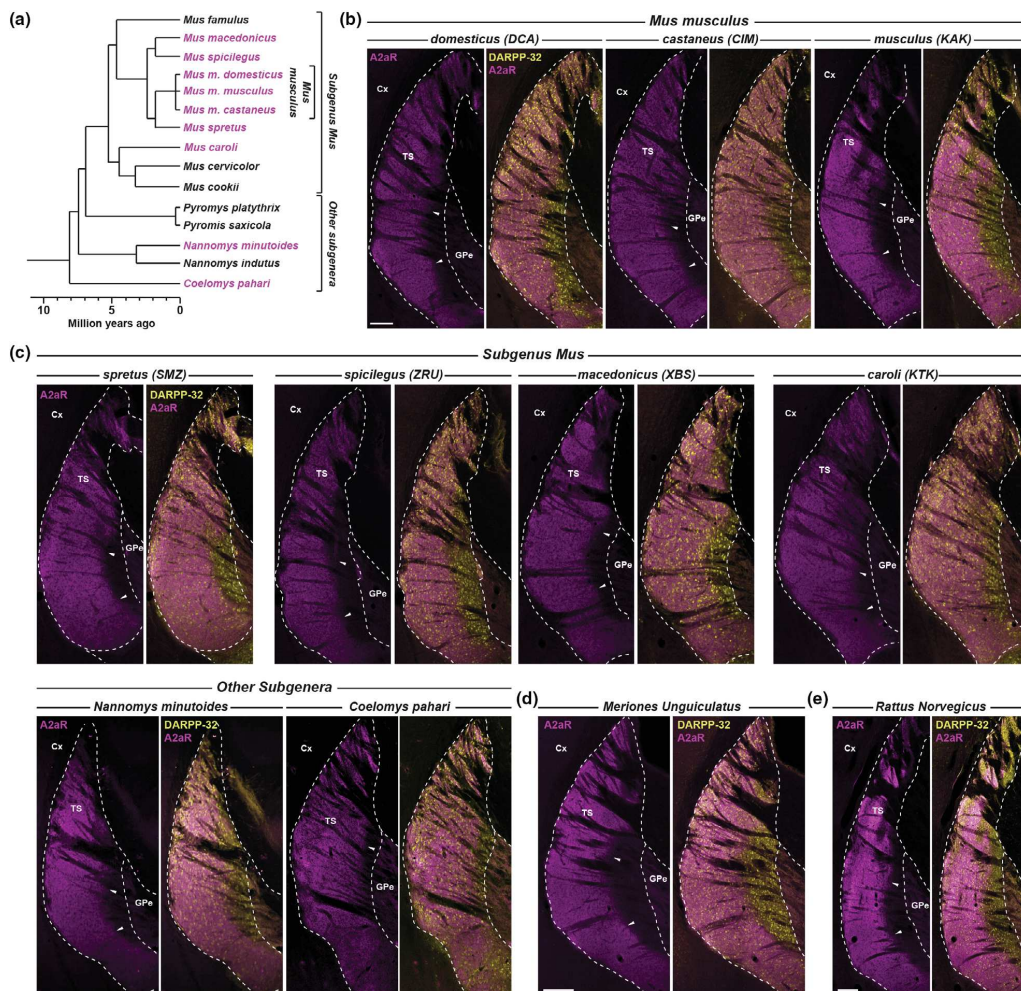


Fig. 4 D2R/A2aR-lacking area is evolutionarily conserved. (a) Simplified phylogenetic tree and divergence time estimates of the *Mus* species group, according to (Chevret and Dobigny 2005; Veyrunes et al. 2006). Species identified in magenta have been used in the present study. (b–e) Double immunofluorescence of A2aR (magenta) and DARPP-32 (yellow) in the TS of (b) three subspecies of the *Mus musculus* [*Mus m. domesticus* (DCA), the *Mus m. castaneus* (CIM) and the *Mus musculus* (KAK), (c) four species of *Subgenus Mus* [*Mus*

spretus (SMZ), *Mus spicilegus* (ZRU), *Mus macedonicus* (XBS) and *Mus caroli* (KTK)] and two species from other *Subgenera* (*Nannomys minutooides* and *Coelomys pahari*). Scale bar, 250 μ m, (d) in *Meriones unguiculatus* (Mongolian gerbil). Scale bar, 200 μ m, and (e) in *Rattus norvegicus*. Scale bar, 250 μ m. White arrowheads delineate the boundaries between the intermingled area and D2R/A2aR-lacking area. Cx: Cortex; GPe: external globus pallidus; TS: tail of the striatum.

2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor, showed strong defensive reactions, ERK activation remained unchanged in all territories of the TS when compared to control mice (Figure S2b and Table S3). Taken together, these data suggest that the TS is not recruited by aversive stimuli triggering innate avoidance.

We therefore assessed whether mice exposed to mild footshocks, either unpredictable (US) or signaled by a salient auditory stimulus (arousing but non-nociceptive) (CS-US pairing), displayed an altered P-ERK level in the caudal TS (Figure S3a and b and Table S3). No changes were observed in the TS of mice undergoing five CS-US paired or unpaired

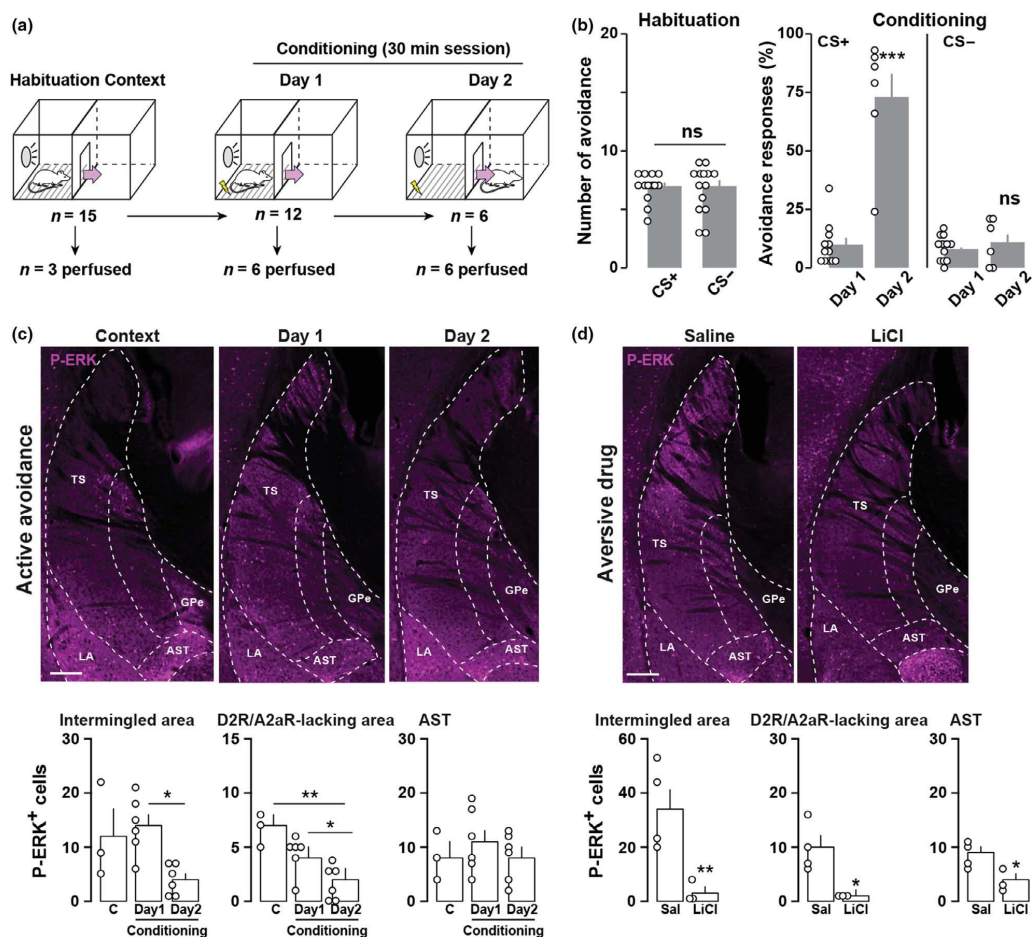


Fig. 5 Regulation of ERK phosphorylation in the TS by aversive signals. (a) Drawing indicates the three phases of the active avoidance paradigm (habituation to context, conditioning Day 1 and conditioning Day 2) and the repartition of mice. (b) Active avoidance responses during the habituation (mice were only exposed to the shuttle box and the CS) and during the first and second session of conditioning (Day 1 and Day 2). Experimental groups: mice exposed to the context ($n = 15$), conditioned Day 1 ($n = 12$) and conditioned Day 2 ($n = 6$). Data are presented as means \pm sem. **** $p < 0.001$ CS⁺ Day2 vs CS⁺ Day1. (c) P-ERK immunoreactivity (magenta) in the TS of C57Bl/6J mice exposed to active avoidance. Scale bar, 200 μ m. Quantification of P-ERK-

immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice exposed to the context ($n = 3$) or conditioned Day 1 ($n = 6$) or Day 2 ($n = 6$) days. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (d) P-ERK immunoreactivity (magenta) in the TS of C57Bl/6J mice 15 min after saline or LiCl (150 mg/kg) administration. Scale bar, 200 μ m. Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice injected with saline ($n = 4$) or LiCl ($n = 3$). Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, TS: tail of the striatum; GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostratial transition; LA: lateral amygdala. For detailed statistics see Table S2.

compared to those only exposed to the CS, the US or the context (Figure S3b and Table S3). We then monitored ERK phosphorylation in the TS of mice that underwent active avoidance paradigm. Mice that learned to avoid mild footshocks during an interval signaled by the presentation

of a CS (salient auditory stimulus) displayed a mild, but significant, reduction in the number of P-ERK-immunoreactive neurons in the TS, in particular in the intermingled and the D2R/A2AR-lacking areas (Fig. 5a-c). We finally thought to determine whether prolonged aversive states might alter

Table 3 Regulation of ERK phosphorylation in the TS by aversive signals

Models/drugs (n = number of mice)	Average number of P-ERK-positive cells			
	Total	Intermingled	D2R/A2AR-lacking	AST
3.1 Resident/intruder				
Resident (n = 3)	50 ± 5	32 ± 3	9 ± 1	8 ± 1
Intruder (n = 3)	56 ± 3	28 ± 3	14 ± 2	14 ± 2
3.2 Natural stressors				
Mouse bedding (n = 3)	71 ± 6	38 ± 6	10 ± 3	15 ± 1
Rat bedding (n = 3)	66 ± 14	43 ± 10	13 ± 3	10 ± 2
Water (n = 4)	38 ± 10	25 ± 7	5 ± 2	9 ± 2
Fox urine (TMT) (n = 3)	52 ± 3	28 ± 3	7 ± 1	17 ± 4
3.3 Cued fear conditioning				
Context (n = 3)	29 ± 9	16 ± 5	1 ± 1	12 ± 4
CS (n = 6)	33 ± 13	16 ± 9	2 ± 1	15 ± 4
US (n = 6)	53 ± 6	32 ± 5	3 ± 1	17 ± 1
CS-US paired (n = 6)	41 ± 2	23 ± 3	4 ± 1	14 ± 1
CS-US unpaired (n = 3)	57 ± 9	36 ± 7	5 ± 1	16 ± 3

For detailed statistics see Table S7.

CS, conditioned stimulus; US, unconditioned stimulus; TMT, 2,3,5-trimethyl-3-thiazoline.

the levels of P-ERK in the TS. The administration of lithium chloride (LiCl) (150 mg/kg), a compound known to cause nausea and visceral malaise (Yamamoto and Ueji 2011), blunted ERK activation in all TS subterritories (Fig. 5d).

Because the effects induced by the administration of LiCl can also be perceived as potent anorexigenic signals, we investigated whether SPNs of the TS were activated during food deprivation (fasting) and satiation (refeeding). Indeed, food deprivation triggered a significant reduction of the body weight and an increase in food intake during refeeding schedules (Figure S4). However, no major differences were observed in the number of P-ERK immunoreactive neurons between mice having *ad libitum* access to chow pellets and mice being fasted for 12 h followed or not by 1 or 6 cycles of re-feeding schedule (Table 4 and Figure S4). Similarly, ERK activation was unchanged in the TS of mice exposed to HFHS diet during 1 h/day (Table 4 and Figure S4). Together, these data suggest that SPNs of the TS are not activated by signals associated with fasting, satiety or food palatability.

Psychostimulant drugs promote ERK activation in the TS

Acute d-amphetamine administration activates ERK in striatal and accumbal DIR-SPNs (Valjent *et al.* 2005; Gerfen

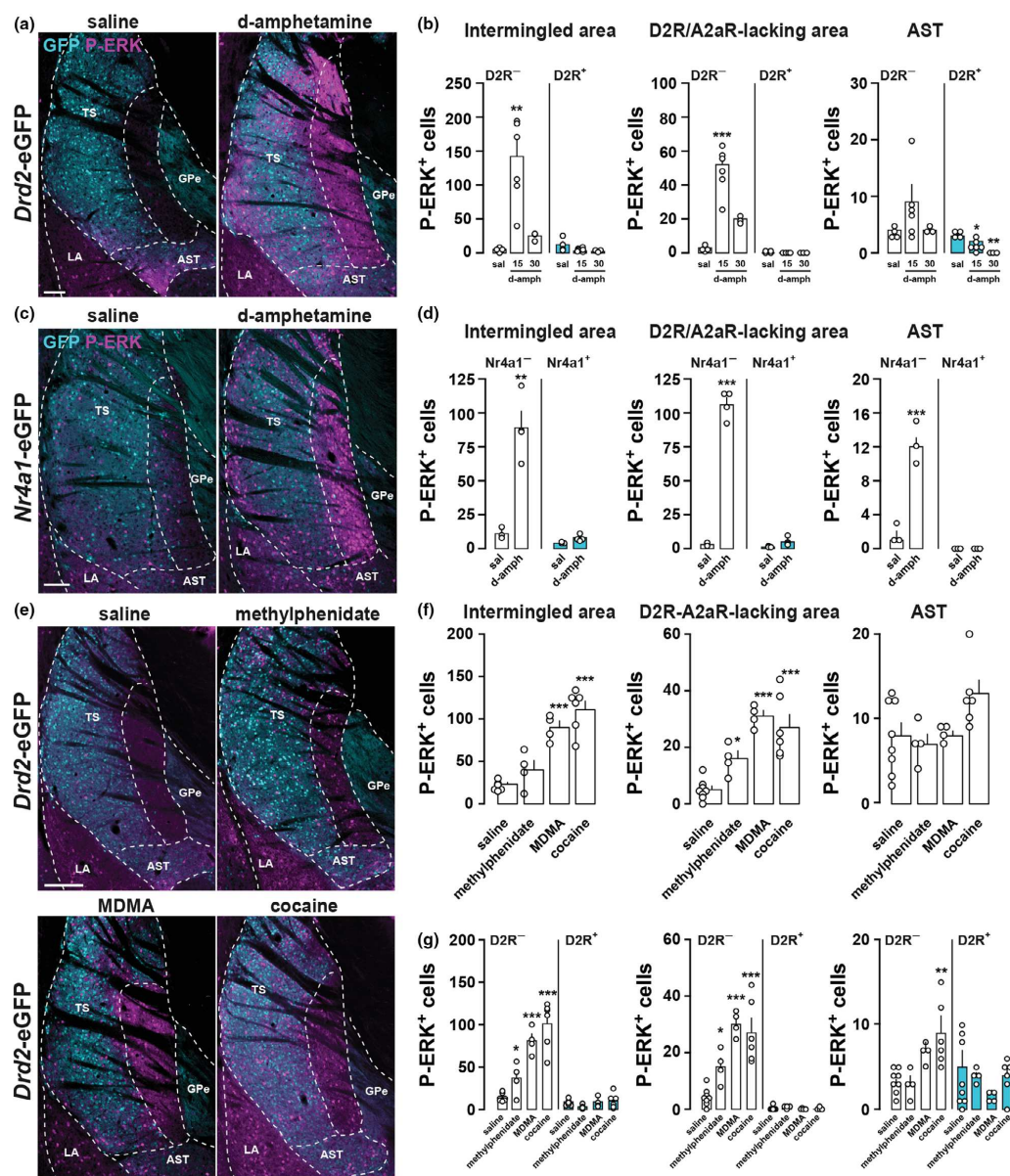
Table 4 Regulation of ERK phosphorylation in the TS by satiety and palatable signals

Models (n = number of mice)	Average number of P-ERK-positive cells			
	Total	Intermingled	D2R/A2AR-lacking	AST
4.1 Food intake				
Control (n = 4)	39 ± 5	29 ± 4	2 ± 1	8 ± 1
Fast (n = 3)	23 ± 6	15 ± 5	2 ± 1	6 ± 1
Fast/re-fed _{1cycle} (n = 4)	32 ± 2	21 ± 1	2 ± 1	9 ± 1
Fast/re-fed _{6cycles} (n = 4)	49 ± 9	32 ± 7	4 ± 1	13 ± 3
HFHS _{binge} (n = 4)	36 ± 1	22 ± 2	4 ± 1	10 ± 1

For detailed statistics see Table S8.

HFHS, high-fat high-sugar diet.

et al. 2008; Gangarossa *et al.* 2013a). We therefore analyzed whether the same treatment was also able to promote ERK phosphorylation in the TS. Immunofluorescence analysis revealed that a single administration of d-amphetamine (10 mg/kg) increased the number of P-ERK-positive neurons in the intermingled and D2R/A2AR-lacking areas of the TS (Figure S5a and b). Of note, only a mild increase was observed in the AST (Figure S5a and b). To clarify in which striatal cell-type ERK activation occurred, *Drd2*-eGFP mice were treated with d-amphetamine and the distribution of P-ERK-positive neurons in D2R-positive and D2R-negative SPNs was analyzed. In line with the observations made in the rostral part of the dorsal striatum (DS) (Valjent *et al.* 2005; Gerfen *et al.* 2008), d-amphetamine-induced ERK phosphorylation in the TS was confined in D2R-negative SPNs, which most likely correspond to DIR-SPNs (Fig. 6a and b). This increase in ERK phosphorylation was rapid and transient since it declined 30 min after the administration of d-amphetamine (Fig. 6b, Figure S5a and b). In the rostral DS, ERK activation induced by d-amphetamine is preferentially concentrated in patches (Biever *et al.* 2015). We therefore thought to determine whether P-ERK-immunoreactive neurons of the caudal TS were also distributed within patches. To do so, we used *Nr4a1*-eGFP mice, a mouse line allowing the delineation of the patch/matrix compartmentalization (Davis and Puhl 2011). The analysis of eGFP expression revealed that eGFP-positive cells were mainly located in the intermingled area whereas only few scattered neurons were detected in the D2R/A2AR-lacking area and AST (Fig. 6c). When d-amphetamine was administered to *Nr4a1*-eGFP mice, we observed that the increased P-ERK-positive cells occurred preferentially in eGFP-poor zones and was restricted to *Nr4a1*-eGFP-negative neurons suggesting that in the TS, ERK activation was not enriched in patch compartments (Fig. 6c and d).

12 | G. Gangarossa *et al.*

Finally, we tested whether other psychostimulant drugs shared the same pattern of ERK activation in the TS. As shown in Fig. 6e–g, a single injection of methylphenidate (15 mg/kg), 3,4-methyl

(MDMA) (10 mg/kg) or cocaine (15 mg/kg) increased ERK phosphorylation in the D2R/A2AR-lacking and the intermingled areas in which it was restricted to D2R-negative SPNs. Together, these data revealed that in the TS, D1R-

Fig. 6 Psychostimulants increase ERK phosphorylation in the TS. (a) P-ERK (magenta) and GFP (cyan) immunoreactivity in the TS of *Drd2-eGFP* mice 15 min after saline or d-amphetamine (10 mg/kg) administration. Scale bar, 100 μ m. (b) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons among eGFP-positive (D2R+) or eGFP-negative (D2R-) cells in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of *Drd2-eGFP* mice treated saline ($n = 4$) or d-amphetamine and perfused 15 ($n = 6$) or 30 min ($n = 3$) after injection. Data are presented as means \pm SEM. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ sal versus d-amph. (c) P-ERK (magenta) and GFP (cyan) immunoreactivity in the TS of *Nr4a1-eGFP* mice 15 min after saline ($n = 3$) or d-amphetamine (10 mg/kg, $n = 4$) administration. Scale bar, 100 μ m. (d) Same quantifications as in (b) performed in *Nr4a1-eGFP* mice. Data are presented as means \pm SEM. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ sal versus d-amph. (e) P-ERK (magenta) and GFP (cyan) immunoreactivity in the TS of *Drd2-eGFP* mice 15 min after saline ($n = 8$), methylphenidate (15 mg/kg, $n = 4$), MDMA (10 mg/kg, $n = 4$) or cocaine (15 mg/kg, $n = 6$) administration. Scale bar, 200 μ m. (f) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice treated with saline ($n = 8$), methylphenidate (15 mg/kg, $n = 4$), MDMA (10 mg/kg, $n = 4$) or cocaine (15 mg/kg, $n = 6$). Data are presented as means \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ sal versus drugs. (g) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons among eGFP-positive (D2R+) or eGFP-negative (D2R-) cells in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of *Drd2-eGFP* mice treated saline ($n = 8$), methylphenidate (15 mg/kg, $n = 4$), MDMA (10 mg/kg, $n = 4$) or cocaine (15 mg/kg, $n = 6$) administration and perfused 15 after injection. Data are presented as means \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ sal versus drugs. GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostratial transition; LA: lateral amygdala; TS: tail of the striatum; sal: saline; d-amph: d-amphetamine. See also Figure S5. For detailed statistics see Tables S3 and S12.

SPNs of the intermingled and D2R/A2AR-lacking areas are activated by psychostimulant drugs.

In addition to its stimulant properties, MDMA is also known to distort sensory and time perception, two features shared by hallucinogenic drugs (Starr *et al.* 2008; Litjens *et al.* 2014). We therefore tested whether other hallucinogen drugs were able to activate SPNs of the TS. The administration of the psychedelic compound, 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (10 mg/kg), a substituted amphetamine without stimulant effects, failed to induce ERK activation in the TS (Table 5). Interestingly, phencyclidine (3 mg/kg), a NMDA receptor blocker causing hallucinations, reduced P-ERK in the caudal TS (Table 5). This decrease was even more pronounced after the administration of dizocilpine (0.3 mg/kg), another NMDA blocker that also acts as a potent anticonvulsant (Table 5). Because convulsant drugs also trigger ERK activation (Berkeley *et al.* 2002; Gangarossa *et al.* 2011), we examined whether such pharmacological agents were able to regulate ERK phosphorylation in the TS. Indeed, acute administration of pentylenetetrazole

(60 mg/kg) or kainate (20 mg/kg) increased the number of P-ERK-positive neurons exclusively in the AST area (Table 5). Together, these results indicate that, at the level of the TS, distinct classes of pharmacological agents differentially recruit D1R- and D2R/A2aR-SPNs in distinct subsets of striatal territories.

Increased ERK activation in the TS by selective DA reuptake inhibition

Psychostimulant drugs such as d-amphetamine, methylphenidate, cocaine, and MDMA mediate their effects in part by acting on monoamines transporters (DAT, NET, and SERT). We therefore examined whether the blockade of dopamine, noradrenaline or serotonin reuptake promoted ERK activation in the TS. Administration of GBR12783 (10 mg/kg), a DAT blocker, enhanced ERK phosphorylation preferentially in SPNs of the D2R/A2AR-lacking area and to a lesser extent in the intermingled area (Fig. 7a and b). In contrast, the antidepressant drugs desipramine (20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg), which inhibit the reuptake of NE and serotonin,

Table 5 Regulation of ERK phosphorylation in the TS by hallucinogens and convulsants

Drugs ($n =$ number of mice)	Average number of P-ERK-positive cells			
	Total	Intermingled	D2R/A2aR-lacking	AST
5.1 Hallucinogens				
Control ($n = 4$)	47 \pm 5	29 \pm 5	11 \pm 1	7 \pm 1
DOI ($n = 4$)	47 \pm 8	32 \pm 5	5 \pm 1	10 \pm 3
PCP ($n = 3$)	25 \pm 6	11 \pm 1	10 \pm 4	4 \pm 1
Dizocilpine ($n = 3$)	4 \pm 1 ^{***}	0 \pm 0 ^{**}	1 \pm 1 ^{**}	3 \pm 1
5.2 Convulsants				
Control ($n = 3$)	33 \pm 5	21 \pm 2	4 \pm 2	8 \pm 1
PTZ ($n = 3$)	72 \pm 7	27 \pm 2	7 \pm 1	38 \pm 7 ^{**}
Kainate ($n = 3$)	69 \pm 15	34 \pm 15	10 \pm 4	25 \pm 2 [*]

For detailed statistics see Table S9. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ drugs versus control. DOI, 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine; PCP, phencyclidine; PTZ, Pentylenetetrazole.

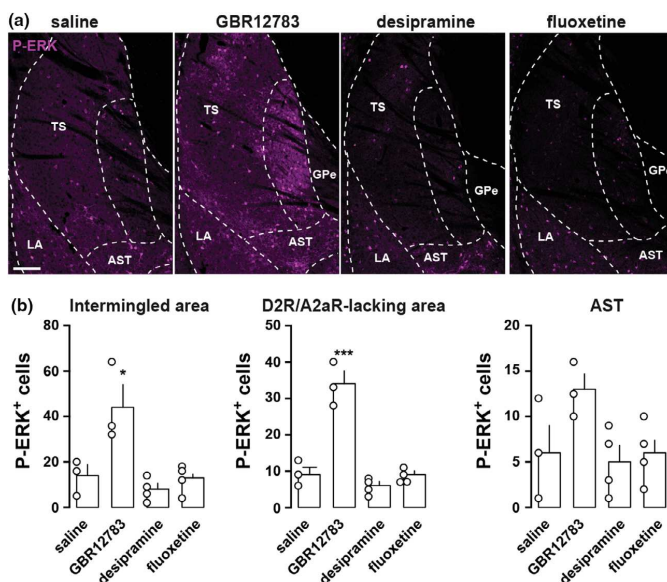


Fig. 7 Dopamine reuptake inhibitor enhances ERK activation in the TS. (a) P-ERK (magenta) immunoreactivity in the TS of C57Bl/6J mice 15 min after saline ($n = 3$), GBR12783 (10 mg/kg, $n = 3$), desipramine (20 mg/kg, $n = 4$) or fluoxetine (10 mg/kg, $n = 4$) administration. Scale bar, 100 μ m. (b) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice treated with saline ($n = 3$), GBR12783 (10 mg/kg, $n = 3$), desipramine (20 mg/kg, $n = 4$) or fluoxetine (10 mg/kg, $n = 4$). Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ sal versus drugs. GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostratial transition; LA: lateral amygdala; TS: tail of the striatum. For detailed statistics see Table S4.

respectively, failed to activate ERK (Fig. 7a and b). Together, these results show that blockade of DA reuptake is sufficient to trigger ERK activation in the TS.

D1R activation is necessary and sufficient to activate ERK in the TS

In the rostral DS and the nucleus accumbens, ERK activation induced by d-amphetamine requires D1R stimulation (Valjent *et al.* 2005). Similarly, blockade of D1R by SCH23390 prevented d-amphetamine-induced ERK phosphorylation in the TS (Fig. 8a and b). However, contrasting results have been obtained regarding the ability of D1R to promote ERK phosphorylation in the rostral DS (Gerfen *et al.* 2002; Gangarossa *et al.* 2013c). To test the impact of D1R activation, mice were administered either with SKF81297 (5 mg/kg) or SKF83822 (5 mg/kg), two agonists known to trigger D1R-dependent signaling through cAMP production (Kuroiwa *et al.* 2008). Both compounds produced a strong activation of ERK that resembled the one induced by d-amphetamine (Fig. 8c and d). In contrast, when we injected SKF83959 (5 mg/kg), a partial agonist at both D1R-mediated adenylate cyclase and β -arrestin recruitment (Jin *et al.* 2003; Lee *et al.* 2014), ERK phosphorylation was less pronounced (Fig. 8c and d). Together, these results indicate that D1R stimulation is sufficient to activate ERK in the TS.

To determine whether cAMP production was necessary and sufficient to activate ERK in the TS, we artificially increased the cAMP levels by administering papaverine, a potent inhibitor of the striatal-enriched phosphodiesterase isoform PDE10A (Nishi *et al.* 2008). Papaverine (30 mg/kg)

induced a robust ERK activation in the TS (Fig. 9a and b). However, this activation was restricted to the ventral part of the intermingled area and confined in D2R-SPNs (Fig. 9a–c). Because D1R- and D2R-SPNs also express PDE4, we also examined the impact of PDE4 inhibition. Administration of rolipram (10 mg/kg) significantly increased ERK phosphorylation in the AST area, whereas little or no significant effects were observed in the intermingled and the D2R/A2aR-lacking areas, respectively (Fig. 9d and e). In this case, increased ERK phosphorylation was detected in D2R-negative SPNs (Fig. 9e, AST). Altogether, these results show that D1R stimulation or PDEs inhibition trigger distinct patterns of ERK phosphorylation in the TS.

Discussion

Despite the renewed interest in the caudal part of the striatum (also referred to as the tail of the striatum, TS), its anatomofunctional organization remains poorly characterized. In this study, we provide evidence that D1R- and D2R-SPNs of the TS display a unique regional distribution whose anatomical features are to some extent evolutionarily conserved. In addition, our functional results reveal contrasting patterns of ERK activation in response to aversive and reward signals, and suggest that the activation of the TS is a common feature of psychostimulant drugs.

The use of BAC transgenic mice has been instrumental in improving our understanding of the anatomofunctional organization of the striatum (Bertran-Gonzalez *et al.* 2008; Matamales *et al.* 2009). Recent in-depth analyses of the

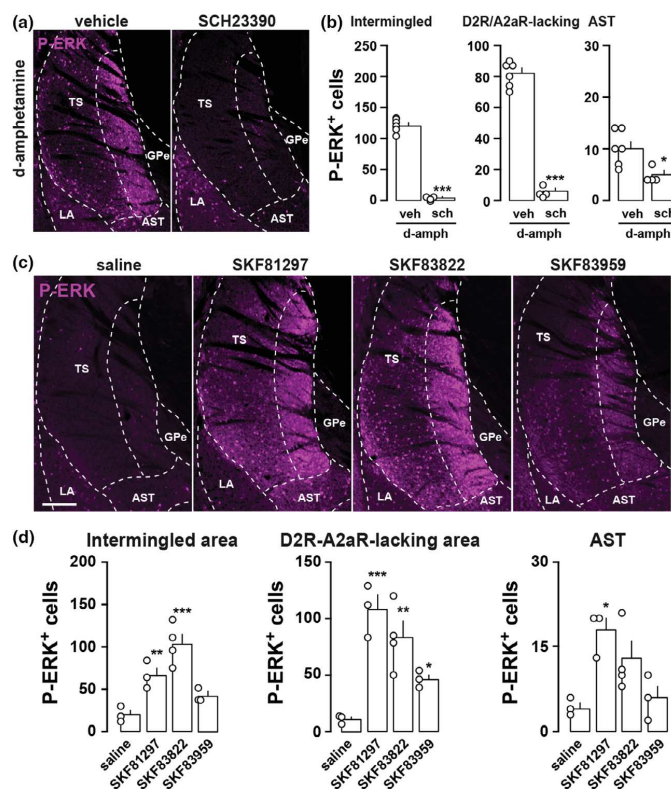


Fig. 8 D1R-dependent ERK phosphorylation in the TS. (a) P-ERK (magenta) immunofluorescence in the TS of d-amphetamine-injected mice, in the presence ($n = 4$) or not ($n = 6$) of a D1R antagonist (sch) injected 15 min before d-amphetamine. Scale bar, 200 μm . (b) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice treated d-amphetamine alone ($n = 6$) or with SCH23390 ($n = 4$). Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ veh/d-amph versus sch/d-amph. (c) P-ERK (magenta) immunofluorescence in the TS of mice injected with saline ($n = 3$), SKF81297 (5 mg/kg, $n = 3$),

SKF83822 (5 mg/kg, $n = 4$) and SKF83959 (5 mg/kg, $n = 3$). Scale bar, 200 μm . (d) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice treated with saline ($n = 3$), SKF81297 (5 mg/kg, $n = 3$), SKF83822 (5 mg/kg, $n = 4$) and SKF83959 (5 mg/kg, $n = 3$). Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ saline versus SKF. GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostratial transition; LA: lateral amygdala; TS: tail of the striatum; sch: SCH23390; veh: vehicle; sal: saline; d-amph: d-amphetamine. For detailed statistics see Table S5.

anatomical arrangement of D2R/A2aR- and D1R-SPNs have revealed that the randomness of the distribution of these two neuronal populations varied along the rostro-caudal axis (Gangarossa *et al.* 2013b; Gagnon *et al.* 2017; Ren *et al.* 2017). In fact, while D2R/A2aR- and D1R-SPNs are randomly distributed in the majority of the dorsal striatum (Gangarossa *et al.* 2013b; Ren *et al.* 2017; Wei *et al.* 2018), a segregated anatomical organization has been unveiled in the TS (Gangarossa *et al.* 2013b). We analyzed the distribution of eGFP and RFP-positive cells in the TS in combination with specific markers of D2R- and D1R-SPNs, and extending

our previous observations (Gangarossa *et al.* 2013b), we confirmed the existence of a D2R/A2aR-lacking area composed exclusively of D1R-expressing SPNs. In addition, the use of *Drd2-eGFP/Drd1a-tdTomato* mice allowed us to delineate two additional TS territories. The first one, juxtaposed to the D2R/A2aR-lacking area, corresponds to a large territory in which D1R- and D2R-SPNs are evenly intermingled. The direct visualization of D1R- and D2R-SPNs revealed that in the intermingled area, SPNs co-expressing both D1R and D2R were preferentially clustered adjacently to the corpus callosum. This contrasts with the

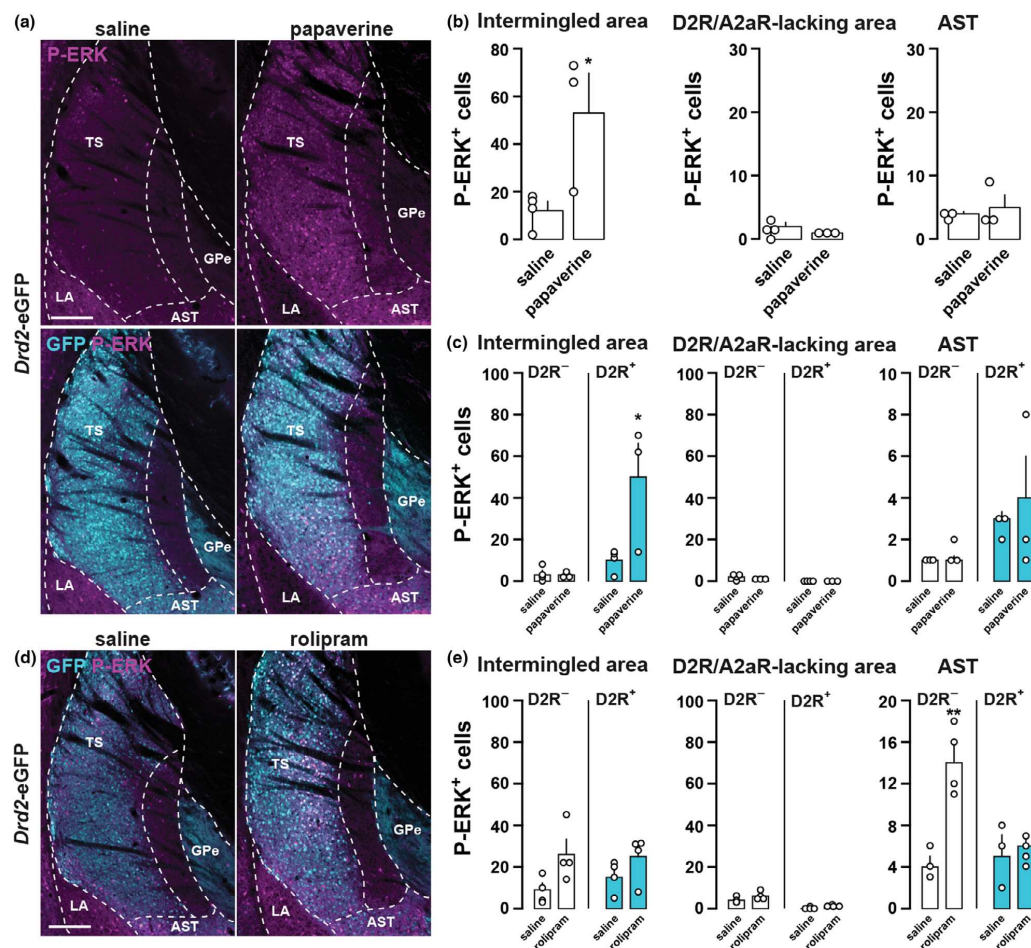


Fig. 9 Distinct pattern of ERK phosphorylation in the TS following PDE inhibition. (a) P-ERK (magenta) and GFP (cyan) immunolabeling in the TS of *Drd2-eGFP* mice 15 min after saline ($n = 4$) or papaverine (30 mg/kg, $n = 3$) administration. Scale bar, 200 μ m. (b) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of mice treated with saline ($n = 4$) or papaverine (30 mg/kg, $n = 3$). Data are presented as means \pm SEM. (c) Quantification of P-ERK-immunoreactive neurons among eGFP-

positive (D2R⁺) or eGFP-negative (D2R⁻) cells in the intermingled, the D2R/A2aR-lacking and the AST areas of *Drd2-eGFP* mice treated with saline ($n = 4$) or papaverine (30 mg/kg, $n = 3$). Data are presented as means \pm SEM. (d and e) Same analysis and quantification as in (c) except that mice were treated with saline ($n = 4$) or rolipram (10 mg/kg, $n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ sal versus drugs. GPe: external globus pallidus; AST: amygdalostratial transition; LA: lateral amygdala; TS: tail of the striatum. For detailed statistics see Table S6.

homogeneous distribution previously described in the anterior dorsal striatum (Gagnon *et al.* 2017; Ren *et al.* 2017; Wei *et al.* 2018). The second territory, embedded between the striatum and the central amygdala is characterized by a high percentage of D1R/D2R-SPNs (~33%). This region, which most likely corresponds to the amygdalostratial transition (AST) area (Jolkonen *et al.* 2001; Fudge and Haber 2002), is the striatal territory comprising the highest

density of D1R/D2R-SPNs, together with the bundle-shaped area of the caudomedial shell of the nucleus accumbens (Gangarossa *et al.* 2013a; Gagnon *et al.* 2017). Although the connectivity and function of this striatal population remain to be established, recent data indicate that D1R/D2R-SPNs display unique morphological features (Gagnon *et al.* 2017) and molecular profile (Gokce *et al.* 2016; Saunders *et al.* 2018). Future studies will be required to determine whether

TS D1R/D2R-SPNs share similar features or define another SPNs population.

Our comparative analysis demonstrates that D2R/A2aR- and D1R-SPNs distribution is anatomically conserved across the *Muridae* family (*Rodentia* order). Indeed, even though size and shape slightly differed, the D2R/A2aR-lacking area was unambiguously identified in different wild mouse strains, gerbils and rats. Interestingly, recent high-throughput projectome studies revealed that anatomical origins of cortico- and thalamo-striatal sensory inputs innervating the TS are also conserved in both mice and rats (Hintiryan *et al.* 2016; Hunnicutt *et al.*, 2016; Jiang and Kim 2018). Indeed, contrasting with the rostral striatum which is mainly innervated by cingulate, motor, and somatosensory cortices (Hunnicutt *et al.*, 2016), TS SPNs receive convergent excitatory inputs arising exclusively from the visual and auditory cortices and TS-projecting DA neurons from the lateral part the substantia nigra pars compacta (Deniau *et al.* 1996; Menegas *et al.* 2015; Hintiryan *et al.* 2016; Hunnicutt *et al.*, 2016; Jiang and Kim 2018; Poulin *et al.* 2018). Despite anatomical constancy across species, the functional role of the TS has been poorly addressed. Recently, two studies revealed that the TS is not essential to promote movement. Indeed, lesion of TS-projecting DA did not affect the time spent moving and the velocity (Menegas *et al.* 2018). Moreover, while direct activation of D1R-SPN in the dorsal striatum (rostral part) using optogenetics promotes motor activity (Kravitz *et al.* 2010), activation of TS D1R-SPNs failed to elicit movement (Guo *et al.* 2018). Instead, D1R-SPNs of the TS appear to play an important role in auditory decisions (Xiong *et al.* 2015; Guo *et al.* 2018) and contribute to reinforcement learning that promotes avoidance of threatening stimuli (Menegas *et al.* 2018). Future studies are warranted to establish whether a causal relationship may exist between the aforementioned functions and the activation of D1R-SPNs within specific TS territories.

Our functional study, assessed by monitoring ERK phosphorylation (i.e. activation), provides important clues concerning the recruitment of SPNs within the TS. While salient and aversive signals are known to activate TS-projecting DA neurons (Menegas *et al.*, 2017; Menegas *et al.* 2018), aversive stimuli triggering innate or learned avoidance responses failed to trigger ERK activation in the TS. However, our results suggest that TS SPNs activity might depend on the nature of defensive reactions (freezing vs avoidance/escape) engaged when exposed to an aversive stimulus signaled or not by a predictive cue. Thus, the level of P-ERK in the TS was unaltered in mice displaying freezing behavioral responses, while it decreased in mice that learned to actively avoid an aversive stimulus by initiating a locomotor response. In addition, we have found that the administration of LiCl, an aversive drug that causes nausea and visceral malaise, also blunted ERK activation in the TS. This decreased phosphorylation was particularly evident in the AST and the ventral edge of the intermingled area, which both

integrate visceral information (Hintiryan *et al.* 2016). Moreover, ERK phosphorylation remained unchanged following fasting, satiety, or food palatability suggesting that the TS appears to be insensitive to inner state information associated with feeding behavior.

Our survey using various pharmacological agents revealed that TS SPNs are particularly responsive to psychostimulant drugs. Thus, the administration of d-amphetamine, MDMA, cocaine, or methylphenidate increased ERK activation selectively in D1R-SPNs of the D2R/A2aR-lacking area and to a lesser extent in the ventral edge of the intermingled area. The similar pattern of ERK phosphorylation induced by these drugs in the TS contrasts with the one observed in the rostral striatum, where d-amphetamine activates ERK and intracellular signaling events preferentially in SPNs located in the striosomal compartment (Graybiel *et al.* 1990; Biever *et al.* 2015). In the TS, a more pronounced activation was observed with d-amphetamine and MDMA compared to cocaine and methylphenidate. The lack of effects of NET and SERT inhibitors (desipramine and fluoxetine, respectively) combined with the increase in ERK phosphorylation following blockade of DA reuptake (GBR12783), which triggered a pattern of ERK activation comparable to cocaine or methylphenidate, strongly suggest that the mechanisms by which extra-synaptic DA is released account for the difference observed between amphetamine and cocaine. Because the TS integrates visual and auditory information, future studies will be required to determine whether the activation of TS D1R-SPNs contribute to psychostimulant-induced arousal and alertness.

The activation of ERK in the D1R-SPNs of the TS by d-amphetamine is prevented by SCH23390 indicating that, similarly to the rostral part of the dorsal striatum and the nucleus accumbens, D1R activation is required (Valjent *et al.* 2005; Bertran-Gonzalez *et al.* 2008; Gerfen *et al.* 2008). Interestingly, systemic pharmacological stimulation of D1R, using agonists known to trigger D1R signaling through cAMP production (Liu and Graybiel 1998; Kuroiwa *et al.* 2008), was sufficient to activate ERK in the TS. Given the similarity observed between the patterns of ERK phosphorylation induced by D1R agonists and d-amphetamine, it is tempting to hypothesize that common intracellular mechanisms could account for this activation. Thus, the inhibition of ERK dephosphorylation through the cAMP/PKA/DARPP-32 has been shown to be essential to sustain D1R-mediated ERK phosphorylation in the striatum (Valjent *et al.* 2005; Gerfen *et al.* 2008). The triggering events in D1R-dependent ERK activation, meanwhile, involve synergistic intracellular events. In fact, cAMP-mediated mechanisms involving the PKA-dependent recruitment of Rasgrp2 and/or the activation of the cAMP sensor NCS-Rapgef2 have been recently unveiled (Nagai *et al.* 2016; Jiang *et al.*, 2017). Moreover, ERK activation in D1R-SPNs has also been shown to rely on the activation of Fyn which, by phosphorylating GluN2B of NMDAR, leads to an increase in calcium

influx and a subsequent activation of the Ras-GRF1/ERK cascade (Fasano *et al.* 2009; Pascoli *et al.* 2011; Jin *et al.* 2019). Such cellular events provide a mechanism through which glutamate contribute to the regulation of ERK activation induced by d-amphetamine and D1R agonists (Choe *et al.* 2002; Valjent *et al.* 2005; Pascoli *et al.* 2011). Because TS-projecting DA neurons express VGLUT2 (Poulin *et al.* 2014; Root *et al.* 2016; Poulin *et al.* 2018), future studies will be necessary to determine whether glutamate co-released by these DA neurons is essential for D1R-dependent stimulation of ERK in the TS.

Interestingly, when intracellular cAMP was increased through PDE10A inhibition, enhanced ERK phosphorylation was restricted to the ventral part of the intermingled area and confined in D2R-SPNs. This is consistent with previous studies showing that PDE10A inhibition increased PKA-dependent phosphorylation levels in D2R-SPNs of the dorso-medial striatum (Polito *et al.*, 2015). This difference was demonstrated to result from a powerful action of phosphatase-1 (PP-1), which prevents PKA substrates from remaining phosphorylated, whereas DARPP-32 efficiently inhibits PP-1 in D2R-SPNs (Nishi *et al.* 2008; Polito *et al.*, 2015). The DARPP-32/PP-1 loop also regulates ERK phosphorylation (Valjent *et al.* 2005), and we therefore hypothesize that the increased ERK phosphorylation in D2R-SPNs in response to PDE10A inhibition results from the same mechanism.

In conclusion, our study provides anatomical and molecular evidence suggesting that the TS can indeed be considered as a fourth striatal domain. Our functional analysis also indicates that the TS is a major target of psychostimulant drugs. Future investigations are now required to decipher the functional implication of TS in the action of these drugs.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This work was supported by Inserm, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and The French National Research Agency ANR-DOPAFEAR (EV), ANR-SEXREV (FV). GG is supported by Allen Foundation Inc. (2016.326) and Nutricia Research Foundation (2017-20) grants. The authors thank the animal breeding facility of Montpellier University (CECEMA). This article is also available as preprint in Biorxiv (Gangarossa *et al.* 2019, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/533299v2>). The authors declare no conflicts of interest.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Open Science Badges

This article has received a badge for *Open Materials* because it provided all relevant information to reproduce the study in the manuscript. The complete Open Science Disclosure form for this article can be found at the end of the article. More information about the Open Practices badges can be found at <https://cos.io/our-service/s/open-science-badges/>

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Distribution of total ERK in the mouse TS.

Figure S2. Regulation of ERK phosphorylation in the TS by aversive stimuli triggering innate avoidance.

Figure S3. Regulation of ERK phosphorylation in the TS following auditory Pavlovian conditioning.

Figure S4. Food-related behaviors.

Figure S5. Acute d-amphetamine administration increases P-ERK in the TS.

Table S1. Statistics of Figure 3.

Table S2. Statistics of Figure 5.

Table S3. Statistics of Figure 6.

Table S4. Statistics of Figure 7.

Table S5. Statistics of Figure 8.

Table S6. Statistics of Figure 9.

Table S7. Statistics of Table 3.

Table S8. Statistics of Table 4.

Table S9. Statistics of Table 5.

Table S10. Statistics of Suppl. Figure S3.

Table S11. Statistics of Suppl. Figure S4.

Table S12. Statistics of Suppl. Figure S5.

References

- Allen M. D. and Zhang J. (2006) Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 716–721.
- Assaf F., Fishbein M., Gafni M., Keren O. and Sarne Y. (2011) Pre- and post-conditioning treatment with an ultra-low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) protects against pentylenetetrazole (PTZ)-induced cognitive damage. *Behav. Brain Res.* **220**, 194–201.
- Balleine B. W., Delgado M. R. and Hikosaka O. (2007) The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J. Neurosci.* **27**, 8161–8165.
- Beaulieu J.-M. and Gainetdinov R. R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **63**, 182–217.
- Belin D., Jonkman S., Dickinson A., Robbins T. W. and Everitt B. J. (2009) Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behav. Brain Res.* **199**, 89–102.
- Berkeley J. L., Decker M. J. and Levey A. I. (2002) The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. *J. Neurochem.* **82**, 192–201.
- Bertran-Gonzalez J., Bosch C., Maroteaux M., Matamalas M., Hervé D., Valjent E. and Girault J.-A. (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* **28**, 5671–5685.
- Bertran-Gonzalez J., Hervé D., Girault J.-A. and Valjent E. (2010) What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* **4**.
- Biever A., Puighermanal E., Nishi A., *et al.* (2015) PKA-dependent phosphorylation of ribosomal protein S6 does not correlate with translation efficiency in striatonigral and striatopallidal medium-sized spiny neurons. *J. Neurosci.* **35**, 4113–4130.

- Biezonski D. K., Trifilieff P., Meszaros J., Javitch J. A. and Kellendonk C. (2015) Evidence for limited D1 and D2 receptor coexpression and colocalization within the dorsal striatum of the neonatal mouse. *J. Comp. Neurol.* **523**, 1175–1189.
- Blüthgen N., van Bentum M., Merz B., Kuhl D. and Hermey G. (2017) Profiling the MAPK/ERK dependent and independent activity regulated transcriptional programs in the murine hippocampus in vivo. *Sci Rep* **7**, 45101.
- Castro L. R. V., Brito M., Guiot E., Polito M., Korn C. W., Hervé D., Girault J.-A., Paupardin-Tritsch D. and Vincent P. (2013) Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J. Physiol. (Lond.)* **591**, 3197–3214.
- Chevret P. and Dobigny G. (2005) Systematics and evolution of the subfamily Gerbillinae (Mammalia, Rodentia, Muridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **35**, 674–688.
- Choe E. S., Chung K. T., Mao L. and Wang J. Q. (2002) Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* **27**, 565–575.
- Davis M. I. and Puhl H. L. (2011) Nr4a1-eGFP is a marker of striosome-matrix architecture, development and activity in the extended striatum. *PLoS ONE* **6**, e16619.
- Deniau J. M., Menetrey A. and Charpier S. (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience* **73**, 761–781.
- Doly S., Bertran-Gonzalez J., Callebert J., Bruneau A., Banas S. M., Belmer A., Boutourlinsky K., Hervé D., Launay J.-M. and Maroteaux L. (2009) Role of serotonin via 5-HT_{2B} receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS ONE* **4**, e7952.
- Fasano S., D'Antoni A., Orban P. C., et al. (2009) Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biol. Psychiatry* **66**, 758–768.
- Franklin K. and Paxinos G. K. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Elsevier.
- Fudge J. L. and Haber S. N. (2002) Defining the caudal ventral striatum in primates: cellular and histochemical features. *J. Neurosci.* **22**, 10078–10082.
- Gagnon D., Petryszyn S., Sanchez M. G., Bories C., Beaulieu J. M., De Koninck Y., Parent A. and Parent M. (2017) Striatal neurons expressing D1 and D2 receptors are morphologically distinct and differently affected by dopamine denervation in mice. *Sci Rep* **7**, 41432.
- Gangarossa G., Di Benedetto M., O'Sullivan G. J., Dunleavy M., Alcacer C., Bonito-Oliva A., Henshall D. C., Waddington J. L., Valjent E. and Fisone G. (2011) Convulsant doses of a dopamine D1 receptor agonist result in Erk-dependent increases in Zif268 and Arc/Arg3.1 expression in mouse dentate gyrus. *PLoS ONE* **6**, e19415.
- Gangarossa G., Espallergues J., de Kerchove d'Exaerde A., El Mestikawy S., Gerfen C. R., Hervé D., Girault J.-A. and Valjent E. (2013a) Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Front Neural Circuits* **7**, 22.
- Gangarossa G., Espallergues J., Mailly P., De Bundel D., de Kerchove d'Exaerde A., Hervé D., Girault J.-A., Valjent E. and Krieger P. (2013b) Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. *Front Neural Circuits* **7**, 124.
- Gangarossa G., Perroy J. and Valjent E. (2013c) Combinatorial topography and cell-type specific regulation of the ERK pathway by dopaminergic agonists in the mouse striatum. *Brain Struct Funct* **218**, 405–419.
- Gangarossa G., Castell L., Castro L., Tarot P., Veyrunes F., Vincent P., Bertaso F. and Valjent E. (2019) Contrasting patterns of ERK activation in the tail of the striatum in response to aversive and rewarding signals. *bioRxiv*, 533299.
- Gerfen C. R. and Surmeier D. J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 441–466.
- Gerfen C. R., Miyachi S., Paletzki R. and Brown P. (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.* **22**, 5042–5054.
- Gerfen C. R., Paletzki R. and Worley P. (2008) Differences between dorsal and ventral striatum in D₁ dopamine receptor coupling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 to activation of extracellular signal-regulated kinase. *J. Neurosci.* **28**, 7113–7120.
- Gokce O., Stanley G. M., Treutlein B., Neff N. F., Camp J. G., Malenka R. C., Rothwell P. E., Fuccillo M. V., Südhof T. C. and Quake S. R. (2016) Cellular Taxonomy of the Mouse Striatum as Revealed by Single-Cell RNA-Seq. *Cell Rep.* **16**, 1126–1137.
- Gong S., Zheng C., Doughty M. L., et al. (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* **425**, 917–925.
- Graybiel A. M. and Grafton S. T. (2015) The striatum: where skills and habits meet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a021691.
- Graybiel A. M., Moratalla R. and Robertson H. A. (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 6912–6916.
- Gruber A. J. and McDonald R. J. (2012) Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Front Behav Neurosci* **6**, 50.
- Guo L., Walker W. I., Ponvert N. D., Penix P. L. and Jaramillo S. (2018) Stable representation of sounds in the posterior striatum during flexible auditory decisions. *Nat Commun* **9**, 1534.
- Halberstadt A. L., van der Heijden I., Ruderman M. A., Risbrough V. B., Gingrich J. A., Geyer M. A. and Powell S. B. (2009) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors exert opposing effects on locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1958–1967.
- Hintiryan H., Foster N. N., Bowman I., et al. (2016) The mouse corticostriatal projectome. *Nat. Neurosci.* **19**, 1100–1114.
- Huerta-Ocampo I., Mena-Segovia J. and Bolam J. P. (2014) Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct* **219**, 1787–1800.
- Hunnicut B. J., Jongbloets B. C., Birdsong W. T., Gertz K. J., Zhong H. and Mao T. (2016) A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *eLife* **5**.
- Hutton S. R., Otis J. M., Kim E. M., Lamsal Y., Stuber G. D. and Snider W. D. (2017) ERK/MAPK signaling is required for pathway-specific striatal motor functions. *J. Neurosci.* **37**, 8102–8115.
- Jiang H. and Kim H. F. (2018) Anatomical inputs from the sensory and value structures to the tail of the rat striatum. *Front Neuroanat* **12**, 30.
- Jiang S. Z., Xu W., Emery A. C., Gerfen C. R., Eiden M. V. and Eiden L. E. (2017) NCS-rapgef2, the protein product of the neuronal rapgef2 gene, is a specific activator of D1 dopamine receptor-dependent ERK phosphorylation in mouse brain. *eNeuro* **4**.
- Jin L.-Q., Goswami S., Cai G., Zhen X. and Friedman E. (2003) SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D1 dopamine receptors in rat brain. *J. Neurochem.* **85**, 378–386.
- Jin D.-Z., Mao L.-M. and Wang J. Q. (2019) Amphetamine activates non-receptor tyrosine kinase Fyn and stimulates ERK phosphorylation in the rat striatum in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **843**, 45–54.
- Jolkkonen E., Pikkariainen M., Kempainen S. and Pitkanen A. (2001) Interconnectivity between the amygdaloid complex and the amygdalostriatal transition area: a PHA-L study in rat. *J. Comp. Neurol.* **431**, 39–58.

- Kravitz A. V., Freeze B. S., Parker P. R. L., Kay K., Thwin M. T., Deisseroth K. and Kreitzer A. C. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* **466**, 622–626.
- Kuroiwa M., Bateup H. S., Shuto T., Higashi H., Tanaka M. and Nishi A. (2008) Regulation of DARPP-32 phosphorylation by three distinct dopamine D1-like receptor signaling pathways in the neostriatum. *J. Neurochem.* **107**, 1014–1026.
- Lee S.-M., Kant A., Blake D., Murthy V., Boyd K., Wyrick S. J. and Mailman R. B. (2014) SKF-83959 is not a highly-biased functionally selective D1 dopamine receptor ligand with activity at phospholipase C. *Neuropharmacology* **86**, 145–154.
- Litjens R. P. W., Brunt T. M., Alderlieste G.-J. and Westerink R. H. S. (2014) Hallucinogen persisting perception disorder and the serotonergic system: a comprehensive review including new MDMA-related clinical cases. *Eur Neuropsychopharmacol* **24**, 1309–1323.
- Liu F. C. and Graybiel A. M. (1998) Region-dependent dynamics of cAMP response element-binding protein phosphorylation in the basal ganglia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 4708–4713.
- Longoni R., Spina L., Vinci S. and Acquas E. (2011) The MEK inhibitor SL327 blocks acquisition but not expression of lithium-induced conditioned place aversion: a behavioral and immunohistochemical study. *Psychopharmacology* **216**, 63–73.
- Matamalas M., Bertran-Gonzalez J., Salomon L., Degos B., Deniau J.-M., Valjent E., Hervé D. and Girault J.-A. (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS ONE* **4**, e4770.
- Menegas W., Bergan J. F., Ogawa S. K., Isogai Y., Umadevi Venkataraju K., Osten P., Uchida N. and Watabe-Uchida M. (2015) Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *Elife* **4**, e10032.
- Menegas W., Babayan B. M., Uchida N. and Watabe-Uchida M. (2017) Opposite initialization to novel cues in dopamine signaling in ventral and posterior striatum in mice. *eLife* **6**.
- Menegas W., Akiti K., Amo R., Uchida N. and Watabe-Uchida M. (2018) Dopamine neurons projecting to the posterior striatum reinforce avoidance of threatening stimuli. *Nat. Neurosci.* **21**, 1421–1430.
- Mouri A., Koseki T., Narusawa S., Niwa M., Mamiya T., Kano S.-I., Sawa A. and Nabeshima T. (2012) Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioural changes. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 767–779.
- Nagai T., Yoshimoto J., Kannon T., Kuroda K. and Kaibuchi K. (2016) Phosphorylation signals in striatal medium spiny neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 858–871.
- Nicola S. M. (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology* **191**, 521–550.
- Nishi A., Kuroiwa M., Miller D. B., et al. (2008) Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J. Neurosci.* **28**, 10460–10471.
- Pascoli V., Valjent E., Corbillé A.-G., Corvol J.-C., Tassin J.-P., Girault J.-A. and Hervé D. (2005) cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in response to d-amphetamine and methylphenidate in the prefrontal cortex in vivo: role of beta 1-adrenoceptors. *Mol. Pharmacol.* **68**, 421–429.
- Pascoli V., Besnard A., Hervé D., Pagès C., Heck N., Girault J.-A., Caboche J. and Vanhoutte P. (2011) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* **69**, 218–227.
- Polito M., Vincent P. and Guiot E. (2014) Biosensor imaging in brain slice preparations. *Methods Mol. Biol.* **1071**, 175–194.
- Polito M., Guiot E., Gangarossa G., et al. (2015) Selective effects of PDE10A inhibitors on striatopallidal neurons require phosphatase inhibition by DARPP-32. *eNeuro* **2**.
- Poulin J.-F., Zou J., Drouin-Ouellet J., Kim K.-Y. A., Cicchetti F. and Awatramani R. B. (2014) Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene expression profiling. *Cell Rep* **9**, 930–943.
- Poulin J.-F., Caronia G., Hofer C., Cui Q., Helm B., Ramakrishnan C., Chan C. S., Dombeck D. A., Deisseroth K. and Awatramani R. (2018) Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat. Neurosci.* **21**, 1260–1271.
- Ren K., Guo B., Dai C., Yao H., Sun T., Liu X., Bai Z., Wang W. and Wu S. (2017) Striatal Distribution and cytoarchitecture of dopamine receptor Subtype 1 and 2: evidence from double-labeling transgenic mice. *Front. Neural. Circuits* **11**, 57.
- Root D. H., Wang H.-L., Liu B., Barker D. J., Mól L., Szocsics P., Silva A. C., Maglóczy Z. and Morales M. (2016) Glutamate neurons are intermixed with midbrain dopamine neurons in nonhuman primates and humans. *Sci. Rep.* **6**, 30615.
- Saunders A., Macosko E. Z., Wysoker A., et al. (2018) Molecular diversity and specializations among the cells of the adult mouse brain. *Cell* **174**, 1015–1030.e16.
- Starr M. A., Page M. E. and Waterhouse B. D. (2008) MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine)-mediated distortion of somatosensory signal transmission and neurotransmitter efflux in the ventral posterior medial thalamus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 20–31.
- Valjent E., Corvol J. C., Pages C., Besson M. J., Maldonado R. and Caboche J. (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* **20**, 8701–8709.
- Valjent E., Pagès C., Hervé D., Girault J.-A. and Caboche J. (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1826–1836.
- Valjent E., Pascoli V., Svenningsson P., et al. (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 491–496.
- Valjent E., Bertran-Gonzalez J., Aubier B., Greengard P., Hervé D. and Girault J.-A. (2010) Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology* **35**, 401–415.
- Valjent E., Biever A., Gangarossa G. and Puighermanal E. (2019) Dopamine signaling in the striatum, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Adv Protein Chem Struct Biol* **116**, 375–396.
- Veyrunes F., Dobigny G., Yang F., O'Brien P. C. M., Catalan J., Robinson T. J. and Britton-Davidian J. (2006) Phylogenomics of the genus *Mus* (Rodentia: Muridae): extensive genome repatterning is not restricted to the house mouse. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 2925–2934.
- Wei X., Ma T., Cheng Y., Huang C. C. Y., Wang X., Lu J. and Wang J. (2018) Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. *Addict Biol.* **23**, 569–584.
- Xiong Q., Znamenskiy P. and Zador A. M. (2015) Selective corticostriatal plasticity during acquisition of an auditory discrimination task. *Nature* **521**, 348–351.
- Yamamoto T. and Ueji K. (2011) Brain mechanisms of flavor learning. *Front. Syst. Neurosci* **5**, 76.
- Yapo C., Nair A. G., Clement L., Castro L. R., Hellgren Kotaleski J. and Vincent P. (2017) Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J. Physiol. (Lond.)* **595**, 7451–7475.
- Yin H. H. and Knowlton B. J. (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 464–476.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamson, E.E., and Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916, 172–191.
- Abraira, V.E., Kuehn, E.D., Chirila, A.M., Springel, M.W., Toliver, A.A., Zimmerman, A.L., Orefice, L.L., Boyle, K.A., Bai, L., Song, B.J., et al. (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168, 295-310.e19.
- Almanza, A., Simón-Arceo, K., Coffeen, U., Fuentes-García, R., Contreras, B., Pellicer, F., and Mercado, F. (2015). A D2-like receptor family agonist produces analgesia in mechanonociception but not in thermonociception at the spinal cord level in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 137, 119–125.
- Andersson, L.S., Larhammar, M., Memic, F., Wootz, H., Schwochow, D., Rubin, C.-J., Patra, K., Arnason, T., Wellbring, L., Hjälml, G., et al. (2012). Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature* 488, 642–646.
- Baba, H., Goldstein, P.A., Okamoto, M., Kohno, T., Ataka, T., Yoshimura, M., and Shimoji, K. (2000). Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology* 92, 485–492.
- Bajic, D., and Proudfit, H.K. (1999). Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *Journal of Comparative Neurology* 405, 359–379.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain: *Behavioural Pharmacology* 22, 390–404.
- Bardin, L., Lavarenne, J., and Eschalier, A. (2000). Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats: *Pain* 86, 11–18.

- Barraud, Q., Obeid, I., Aubert, I., Barrière, G., Contamin, H., McGuire, S., Ravenscroft, P., Porras, G., Tison, F., Bezard, E., et al. (2010). Neuroanatomical Study of the A11 Diencephalospinal Pathway in the Non-Human Primate. *PLoS ONE* 5, e13306.
- Barriere, G., Mellen, N., and Cazalets, J.-R. (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *European Journal of Neuroscience* 19, 1325–1335.
- Basbaum, A.I., Clanton, C.H., and Fields, H.L. (1976). Opiate and stimulus-produced analgesia: Functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.
- Benabid, A.L., and Jeaugey, L. (1989). Cells of the rat lateral habenula respond to high-threshold somatosensory inputs. *Neuroscience Letters* 96, 289–294.
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Herve, D., Valjent, E., and Girault, J.-A. (2008). Opposing Patterns of Signaling Activation in Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Striatal Neurons in Response to Cocaine and Haloperidol. *Journal of Neuroscience* 28, 5671–5685.
- Bikoff, J.B., Gabitto, M.I., Rivard, A.F., Drobac, E., Machado, T.A., Miri, A., Brenner-Morton, S., Famojure, E., Diaz, C., Alvarez, F.J., et al. (2016). Spinal Inhibitory Interneuron Diversity Delineates Variant Motor Microcircuits. *Cell* 165, 207–219.
- Björklund, A., and Skagerberg, G. (1979). Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing. *Brain Research* 177, 170–175.

- Borgkvist, A., and Fisone, G. (2007). Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31, 79–88.
- Borgkvist, A., Mamlöf, T., Feltmann, K., Lindskog, M., and Schilström, B. (2011). Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 1–10.
- Bourane, S., Grossmann, K.S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M.G., Stam, F.J., Garcia-Campmany, L., Koch, S., and Goulding, M. (2015). Identification of a Spinal Circuit for Light Touch and Fine Motor Control. *Cell* 160, 503–515.
- Bréjot, T., Blanchard, S., Hocquemiller, M., Haase, G., Liu, S., Nosjean, A., Heard, J.M., and Bohl, D. (2006). Forced expression of the motor neuron determinant HB9 in neural stem cells affects neurogenesis. *Experimental Neurology* 198, 167–182.
- Brichta, L., Shin, W., Jackson-Lewis, V., Blesa, J., Yap, E.-L., Walker, Z., Zhang, J., Roussarie, J.-P., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2015). Identification of neurodegenerative factors using translational–regulatory network analysis. *Nat Neurosci* 18, 1325–1333.
- Brischoux, F. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli.
- Broman, J., Anderson, S., and Ottersen, O.P. (1993). Enrichment of Glutamate-like Immunoreactivity in Primary Afferent Terminals Throughout the Spinal Cord Dorsal Horn. *European Journal of Neuroscience* 5, 1050–1061.
- Brumovsky, P.R. (2016). Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase—an intriguing association with implications for sensation and pain: *PAIN* 157, 314–320.
- Brumovsky, P., Villar, M.J., and Hökfelt, T. (2006). Tyrosine hydroxylase is expressed in a

subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Experimental Neurology* 200, 153–165.

Budai, D., Harasawa, I., and Fields, H.L. (1998). Midbrain Periaqueductal Gray (PAG) Inhibits Nociceptive Inputs to Sacral Dorsal Horn Nociceptive Neurons Through α_2 -Adrenergic Receptors. *Journal of Neurophysiology* 80, 2244–2254.

Buot, A., and Yelnik, J. (2012). Functional anatomy of the basal ganglia: Limbic aspects. *Revue Neurologique* 168, 569–575.

Burrill, J.D., Moran, L., Goulding, M.D., and Saueressig, H. PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. 11.

Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11, 490–493.

CARLSSON, A. (1975). Receptor-mediated control of dopamine metabolism. Pre- and Postsynaptic Receptors 49–63.

Carlsson, A., Falck, B., Fuxe, K., and Hillarp, N.-Å. (1964). Cellular Localization of Monoamines in the Spinal Cord. *Acta Physiologica Scandinavica* 60, 112–119.

Chang, S., Ryu, Y., Gwak, Y.S., Kim, N.J., Kim, J.M., Lee, J.Y., Kim, S.A., Lee, B.H., Steffensen, S.C., Jang, E.Y., et al. (2017). Spinal pathways involved in somatosensory inhibition of the psychomotor actions of cocaine. *Sci Rep* 7, 5359.

Charbit, A.R., Akerman, S., Holland, P.R., and Goadsby, P.J. (2009). Neurons of the Dopaminergic/Calcitonin Gene-Related Peptide A11 Cell Group Modulate Neuronal Firing in the Trigemino-cervical Complex: An Electrophysiological and Immunohistochemical Study. *J Neurosci*

29, 12532–12541.

CHAUDHURI, K., APPIAH-KUBI, L., and TRENKWALDER, C. (2001). Restless legs syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, 143–146.

Cherng, C., Tsai, C., Tsai, Y., Ho, M., Kao, S., and Yu, L. (2007). Methamphetamine-disrupted sensory processing mediates conditioned place preference performance. *Behavioural Brain Research* 182, 103–108.

Chetrit, J., Taupignon, A., Froux, L., Morin, S., Bouali-Benazzouz, R., Naudet, F., Kadiri, N., Gross, C.E., Bioulac, B., and Benazzouz, A. (2013). Inhibiting Subthalamic D5 Receptor Constitutive Activity Alleviates Abnormal Electrical Activity and Reverses Motor Impairment in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience* 33, 14840–14849.

Clark, F.M., Yeomans, D.C., and Proudfit, H.K. (1991). The noradrenergic innervation of the spinal cord: differences between two substrains of Sprague-Dawley rats determined using retrograde tracers combined with immunocytochemistry. *Neuroscience Letters* 125, 155–158.

Clemens, S. (2004). Conversion of the Modulatory Actions of Dopamine on Spinal Reflexes from Depression to Facilitation in D3 Receptor Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience* 24, 11337–11345.

Clemens, S., Rye, D., and Hochman, S. (2006). Restless legs syndrome: Revisiting the dopamine hypothesis from the spinal cord perspective. *Neurology* 67, 125–130.

Clemens, S., Belin-Rauscent, A., Simmers, J., and Combes, D. (2012). Opposing modulatory effects of D1- and D2-like receptor activation on a spinal central pattern generator. *Journal of Neurophysiology* 107, 2250–2259.

Côté, M.-P., Murray, L.M., and Knikou, M. (2018). Spinal Control of Locomotion: Individual

- Neurons, Their Circuits and Functions. *Front. Physiol.* 9, 784.
- Crone, S.A., Zhong, G., Harris-Warrick, R., and Sharma, K. (2009). In Mice Lacking V2a Interneurons, Gait Depends on Speed of Locomotion. *J Neurosci* 29, 7098–7109.
- Dahlstroem, A., and Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL 232*:1-55.
- Dai, W.-L., Xiong, F., Yan, B., Cao, Z.-Y., Liu, W.-T., Liu, J.-H., and Yu, B.-Y. (2016). Blockade of neuronal dopamine D2 receptor attenuates morphine tolerance in mice spinal cord. *Scientific Reports* 6.
- Delmas, P., Hao, J., and Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci* 12, 139–153.
- Di Chiara, G., and 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* 85, 5274–5278.
- Diaz, J., Lévesque, D., Lammers, C.H., Griffon, N., Martres, M.-P., Schwartz, J.-C., and Sokoloff, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65, 731–745.
- Diaz-delCastillo, M., Woldbye, D.P.D., and Heegaard, A.M. (2018). Neuropeptide Y and its Involvement in Chronic Pain. *Neuroscience* 387, 162–169.
- Dickie, A.C., Bell, A.M., Iwagaki, N., Polgár, E., Gutierrez-Mecinas, M., Kelly, R., Lyon, H., Turnbull, K., West, S.J., Etlin, A., et al. (2019). Morphological and functional properties distinguish

the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn: *PAIN* 160, 442–462.

Dijken, H. van, Dijk, J., Voorn, P., and Holstege, J.C. (1996). Localization of Dopamine D2 Receptor in Rat Spinal Cord Identified with Immunocytochemistry and In Situ Hybridization. *European Journal of Neuroscience* 8, 621–628.

Dogrul, A., Ossipov, M.H., and Porreca, F. (2009). Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Research* 1280, 52–59.

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., et al. (2014). Identification of Spinal Circuits Transmitting and Gating Mechanical Pain. *Cell* 159, 1417–1432.

Eisenach, J.C., Hood, D.D., and Curry, R. (1998). Intrathecal, but not intravenous, clonidine reduces experimental thermal or capsaicin-induced pain and hyperalgesia in normal volunteers. *Anesth. Analg.* 87, 591–596.

Ekbom, K.A. Ekbom: Restless legs. *Acta Med. Scand* - Google Scholar.

Etter, G., and Krezel, W. (2014). Dopamine D2 receptor controls hilar mossy cells excitability. *Hippocampus* 24, 725–732.

Finley, J.C.W., Polak, J., and Katz, D.M. (1992). Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: Dopaminergic and peptidergic phenotypes. *Neuroscience* 51, 973–987.

Flagel, S.B., Clark, J.J., Robinson, T.E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., Akers, C.A., Clinton, S.M., Phillips, P.E.M., and Akil, H. (2011). A selective role for dopamine in stimulus–reward learning. *Nature* 469, 53–57.

Fleetwood-Walker, S.M., Hope, P.J., and MITCHELLt, R. (1988). ALNTINOCICEPTIVE

ACTIONS OF DESCENDING DOPAMINERGIC TRACTS ON CAT AND RAT DORSAL HORN SOMATOSENSORY NEURONES. 14.

Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W.T., Jegen, M., Johannssen, H., Hösli, L., Haenraets, K., Ghanem, A., et al. (2015). Targeted Ablation, Silencing, and Activation Establish Glycinergic Dorsal Horn Neurons as Key Components of a Spinal Gate for Pain and Itch. *Neuron* 85, 1289–1304.

François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., et al. (2017a). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* 93, 822-839.e6.

François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., et al. (2017b). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* 93, 822-839.e6.

Gangarossa, G., Longueville, S., Bundel, D.D., Perroy, J., Hervé, D., Girault, J.-A., and Valjent, E. (2012). Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 22, 2199–2207.

Gangarossa, G., Castell, L., Castro, L., Tarot, P., Veyrunes, F., Vincent, P., Bertaso, F., and Valjent, E. (2019). Contrasting patterns of ERK activation in the tail of the striatum in response to aversive and rewarding signals. *J. Neurochem.* jnc.14804.

Gassner, M., Ruscheweyh, R., and Sandkühler, J. (2009). Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *PAIN®* 145, 204–210.

Gladwell, S.J., and Coote, J.H. (1999). Inhibitory and indirect excitatory effects of dopamine on sympathetic preganglionic neurones in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Brain Research* 818, 397–407.

- Gokce, O., Stanley, G.M., Treutlein, B., Neff, N.F., Camp, J.G., Malenka, R.C., Rothwell, P.E., Fuccillo, M.V., Südhof, T.C., and Quake, S.R. (2016). Cellular Taxonomy of the Mouse Striatum as Revealed by Single-Cell RNA-Seq. *Cell Reports* 16, 1126–1137.
- Gordon, I.T., and Whelan, P.J. (2006). Monoaminergic Control of Cauda-Equina-Evoked Locomotion in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 96, 3122–3129.
- Gosgnach, S., Lanuza, G.M., Butt, S.J.B., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E.M., Kiehn, O., and Goulding, M. (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *440*, 6.
- Gosgnach, S., Bikoff, J.B., Dougherty, K.J., El Manira, A., Lanuza, G.M., and Zhang, Y. (2017). Delineating the Diversity of Spinal Interneurons in Locomotor Circuits. *The Journal of Neuroscience* 37, 10835–10841.
- Goswami, S.C., Mishra, S.K., Maric, D., Kaszas, K., Gonnella, G.L., Clokie, S.J., Kominsky, H.D., Gross, J.R., Keller, J.M., Mannes, A.J., et al. (2014). Molecular Signatures of Mouse TRPV1-Lineage Neurons Revealed by RNA-Seq Transcriptome Analysis. *The Journal of Pain* 15, 1338–1359.
- Grudt, T.J., and Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of Physiology* 540, 189–207.
- Gutierrez-Mecinas, M., Furuta, T., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2016). A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I–III of the mouse spinal cord. *Molecular Pain* 12, 174480691662906.
- Han, P., and Whelan, P.J. (2009). Modulation of AMPA currents by D1-like but not D2-like receptors in spinal motoneurons. *Neuroscience* 158, 1699–1707.

- Han, P., Nakanishi, S.T., Tran, M.A., and Whelan, P.J. (2007). Dopaminergic Modulation of Spinal Neuronal Excitability. *Journal of Neuroscience* 27, 13192–13204.
- Hannon, J., and Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research* 195, 198–213.
- Häring, M., Zeisel, A., Hochgerner, H., Rinwa, P., Jakobsson, J.E.T., Lönnerberg, P., La Manno, G., Sharma, N., Borgius, L., Kiehn, O., et al. (2018). Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 21, 869–880.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., and Lumb, B.M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews* 60, 214–225.
- Hening, W.A. (2002). Restless legs syndrome: A sensorimotor disorder of sleep/ wake motor regulation. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2, 186–196.
- Hening, W.A. (2004). Restless legs syndrome: the most common and least diagnosed sleep disorder. *Sleep Med.* 5, 429–430.
- Hening, W.A., Allen, R.P., Earley, C.J., Picchiatti, D.L., and Silber, M.H. (2004). An Update on the Dopaminergic Treatment of Restless Legs Syndrome and Periodic Limb Movement Disorder. *Sleep* 27, 560–583.
- Hinckley, C.A., Hartley, R., Wu, L., Todd, A., and Ziskind-Conhaim, L. (2005). Locomotor-Like Rhythms in a Genetically Distinct Cluster of Interneurons in the Mammalian Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 93, 1439–1449.
- Hökfelt, T., Phillipson, O., and Goldstein, M. (1979). Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord. *Acta Physiologica Scandinavica* 107, 393–395.

- Hua, X.Y., Boublik, J.H., Spicer, M.A., Rivier, J.E., Brown, M.R., and Yaksh, T.L. (1991). The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 243–248.
- Humphreys, J.M., and Whelan, P.J. (2012). Dopamine exerts activation-dependent modulation of spinal locomotor circuits in the neonatal mouse. *Journal of Neurophysiology* 108, 3370–3381.
- Ichikawa, H., Rabchevsky, A., and Helke, C.J. (1993). Presence and coexistence of putative neurotransmitters in carotid sinus baro- and chemoreceptor afferent neurons. *Brain Research* 611, 67–74.
- Inman, D.M., and Steward, O. (2003). Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice. *J. Comp. Neurol.* 462, 431–449.
- Intondi, A.B., Dahlgren, M.N., Eilers, M.A., and Taylor, B.K. (2008). Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *PAIN®* 137, 352–365.
- Jeong, C.Y., Choi, J.I., and Yoon, M.H. (2004). Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *European Journal of Pharmacology* 502, 205–211.
- Jhou, T.C., Good, C.H., Rowley, C.S., Xu, S. -p., Wang, H., Burnham, N.W., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., and Ikemoto, S. (2013). Cocaine Drives Aversive Conditioning via Delayed Activation of Dopamine-Responsive Habenular and Midbrain Pathways. *Journal of Neuroscience* 33, 7501–7512.
- Johansen, J.P., Fields, H.L., and Manning, B.H. (2001). The affective component of pain in rodents: Direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8077–8082.

- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Wightman, R.M., and Caron, M.G. (1998). Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* *18*, 1979–1986.
- Katz, D.M., Adler, J.E., and Black, I.B. (1986). Expression and regulation of tyrosine hydroxylase in adult sensory neurons in culture: effects of elevated potassium and nerve growth factor. *Brain Res.* *385*, 68–73.
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., and Hisano, S. (2006). Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* *498*, 581–592.
- Kayserl, V., Latrémolière, A., Hamon, M., and Bourgoin, S. (2011). N-methyl-d-aspartate receptor-mediated modulations of the anti-allodynic effects of 5-HT_{1B/1D} receptor stimulation in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European Journal of Pain* *15*, 451–458.
- Kebabian, J.W., and Calne, D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* *277*, 93–96.
- Kempadoo, K.A., Mosharov, E.V., Choi, S.J., Sulzer, D., and Kandel, E.R. (2016). Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA* *113*, 14835–14840.
- Kieffer, B.L., and Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology* *66*, 285–306.
- Kiehn, O. (2006). LOCOMOTOR CIRCUITS IN THE MAMMALIAN SPINAL CORD. *Annual Review of Neuroscience* *29*, 279–306.
- Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature*

Reviews Neuroscience 17, 224–238.

Kim, S.A., Lee, B.H., Bae, J.H., Kim, K.J., Steffensen, S.C., Ryu, Y.-H., Leem, J.W., Yang, C.H., and Kim, H.Y. (2013). Peripheral Afferent Mechanisms Underlying Acupuncture Inhibition of Cocaine Behavioral Effects in Rats. PLoS ONE 8, e81018.

Koblinger, K., Füzesi, T., Ejdrygiewicz, J., Krajacic, A., Bains, J.S., and Whelan, P.J. (2014). Characterization of A11 Neurons Projecting to the Spinal Cord of Mice. PLoS ONE 9, e109636.

Koblinger, K., Jean-Xavier, C., Sharma, S., Füzesi, T., Young, L., Eaton, S.E.A., Kwok, C.H.T., Bains, J.S., and Whelan, P.J. (2018). Optogenetic Activation of A11 Region Increases Motor Activity. Frontiers in Neural Circuits 12.

Kovács, K.J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochemistry International 33, 287–297.

de Lafuente, V., and Romo, R. Dopamine neurons code subjective sensory experience and uncertainty of perceptual decisions. 5.

Lai, H.C., Seal, R.P., and Johnson, J.E. (2016). Making sense out of spinal cord somatosensory development. Development 143, 3434–3448.

Lallemend, F., and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. Trends in Neurosciences 35, 373–381.

Lambert, A.M., Bonkowsky, J.L., and Masino, M.A. (2012). The Conserved Dopaminergic Diencephalospinal Tract Mediates Vertebrate Locomotor Development in Zebrafish Larvae. J Neurosci 32, 13488–13500.

Lanuza, G.M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T.M., and Goulding, M. Genetic Identification of Spinal Interneurons that Coordinate Left-Right Locomotor Activity Necessary for Walking

Movements. 12.

Lapirot, O., Melin, C., Modolo, A., Nicolas, C., Messaoudi, Y., Monconduit, L., Artola, A., Luccarini, P., and Dallel, R. (2011). Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152, 1821–1831.

Lapointe, N.P., and Guertin, P.A. (2008). Synergistic Effects of D_{1/5} and 5-HT_{1A/7} Receptor Agonists on Locomotor Movement Induction in Complete Spinal Cord–Transected Mice. *Journal of Neurophysiology* 100, 160–168.

Lapointe, N.P., Rouleau, P., Ung, R.-V., and Guertin, P.A. (2009). Specific role of dopamine D1 receptors in spinal network activation and rhythmic movement induction in vertebrates: Dopamine-induced rhythmogenesis. *The Journal of Physiology* 587, 1499–1511.

Levant, B. (1998). Differential distribution of D3 dopamine receptors in the brains of several mammalian species. *Brain Research* 800, 269–274.

Levant, B., and McCarson, K.E. (2001). D3 dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neuroscience Letters* 303, 9–12.

Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. *Cell* 147, 1615–1627.

Li, S., Shi, Y., and Kirouac, G.J. (2014). The hypothalamus and periaqueductal gray are the sources of dopamine fibers in the paraventricular nucleus of the thalamus in the rat. *Frontiers in Neuroanatomy* 8.

Liu, Q.-S., Qiao, J.-T., and Dafny, N. (1992). D₂ DOPAMINE RECEPTOR INVOLVEMENT IN SPINAL DOPAMINE-PRODUCED ANTINOCICEPTION. *51*, 8.

- Ljunggren, E.E., Haupt, S., Ausborn, J., Ampatzis, K., and El Manira, A. (2014). Optogenetic Activation of Excitatory Premotor Interneurons Is Sufficient to Generate Coordinated Locomotor Activity in Larval Zebrafish. *J Neurosci* 34, 134–139.
- Lundfald, L., Restrepo, C.E., Butt, S.J.B., Peng, C.-Y., Droho, S., Endo, T., Zeilhofer, H.U., Sharma, K., and Kiehn, O. (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 26, 2989–3002.
- Madriaga, M.A., McPhee, L.C., Chersa, T., Christie, K.J., and Whelan, P.J. (2004). Modulation of Locomotor Activity by Multiple 5-HT and Dopaminergic Receptor Subtypes in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 92, 1566–1576.
- Magnusson, J.E., and Fisher, K. (2000). The involvement of dopamine in nociception: the role of D1 and D2 receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Research* 855, 260–266.
- Marder, E., and Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology* 11, R986–R996.
- Marder, E., and Bucher, D. (2007). Understanding Circuit Dynamics Using the Stomatogastric Nervous System of Lobsters and Crabs. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 291–316.
- Mathis, V. (2019). From controlled to compulsive drug-taking_ The role of the habenula in addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 10.
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115.
- Matthes, H.W.D., Maldonadot, R., Simonin, F., Valverdet, O., and Slowet, S. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the

f.1·Opioid-receptor gene. *383*, 5.

McCrea, A.E., Stehouwer, D.J., and Van Hartesveldt, C. (1997). Dopamine D1 and D2 antagonists block l-DOPA-induced air-stepping in decerebrate neonatal rats. *Developmental Brain Research* *100*, 130–132.

McCrea, D.A., Pratt, C.A., and Jordan, L.M. (1980). Renshaw cell activity and recurrent effects on motoneurons during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology* *44*, 475–488.

Meneely, S., Dinkins, M.-L., Kassai, M., Lyu, S., Liu, Y., Lin, C.-T., Brewer, K., Li, Y., and Clemens, S. (2018). Differential Dopamine D1 and D3 Receptor Modulation and Expression in the Spinal Cord of Two Mouse Models of Restless Legs Syndrome. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* *12*.

Miles, G.B., and Sillar, K.T. (2011). Neuromodulation of Vertebrate Locomotor Control Networks. *Physiology* *26*, 393–411.

Mogil, J.S., Chesler, E.J., Wilson, S.G., Juraska, J.M., and Sternberg, W.F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* *24*, 375–389.

Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M.K., Burrill, J., and Goulding, M. *Evx1 Is a Postmitotic Determinant of V0 Interneuron Identity in the Spinal Cord*. 15.

Morón, J.A., Brockington, A., Wise, R.A., Rocha, B.A., and Hope, B.T. (2002). Dopamine Uptake through the Norepinephrine Transporter in Brain Regions with Low Levels of the Dopamine Transporter: Evidence from Knock-Out Mouse Lines. *The Journal of Neuroscience* *22*, 389–395.

Nagao, M., Kamo, H., Akiguchi, I., and Kimura, J. (1993). Induction of c-Fos-like protein in the lateral habenular nucleus by persistent noxious peripheral stimulation. *Neuroscience Letters* *151*,

37–40.

Noga, B.R., Shefchyk, S.J., Jamal, J., and Jordan, L.M. (1987). The role of Renshaw cells in locomotion: antagonism of their excitation from motor axon collaterals with intravenous mecamylamine. *Exp Brain Res* 66.

Okura, M., Fujiki, N., Kita, I., Honda, K., Yoshida, Y., Mignot, E., and Nishino, S. (2004). The roles of midbrain and diencephalic dopamine cell groups in the regulation of cataplexy in narcoleptic Dobermans. *Neurobiology of Disease* 16, 274–282.

Olausson, H., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Vallbo, Å. (2010). The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, 185–191.

Ondo, W.G., He, Y., Rajasekaran, S., and Le, W.-D. (2000). Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: A possible model for restless legs syndrome? *Movement Disorders* 15, 5.

Ondo, W.G., Zhao, H.R., and Le, W.D. (2007). Animal models of restless legs syndrome. *Sleep Medicine* 8, 344–348.

Pappas, S.S., Behrouz, B., Janis, K.L., Goudreau, J.L., and Lookingland, K.J. (2008). Lack of D2 receptor mediated regulation of dopamine synthesis in A11 diencephalospinal neurons in male and female mice. *Brain Research* 1214, 1–10.

Pappas, S.S., Tiernan, C.T., Behrouz, B., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., Goudreau, J.L., and Lookingland, K.J. (2010). Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *The Journal of Comparative Neurology* NA-NA.

Patriarchi, T., Cho, J.R., Merten, K., Howe, M.W., Marley, A., Xiong, W.-H., Folk, R.W., Broussard,

- G.J., Liang, R., Jang, M.J., et al. (2018). Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 360, eaat4422.
- Peirs, C., and Seal, R.P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 354, 578–584.
- Peirs, C., Williams, S.-P.G., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., et al. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87, 797–812.
- Peng, C.-Y., Yajima, H., Burns, C.E., Zon, L.I., Sisodia, S.S., Pfaff, S.L., and Sharma, K. (2007). Notch and MAML Signaling Drives Scl-Dependent Interneuron Diversity in the Spinal Cord. *Neuron* 53, 813–827.
- Pertovaara, A., Martikainen, I.K., Hagelberg, N., Mansikka, H., Nagren, K., Hietala, J., and Scheinin, H. (2004). Striatal dopamine D2/D3 receptor availability correlates with individual response characteristics to pain. *European Journal of Neuroscience* 20, 1587–1592.
- Peyron, C., Luppi, P.H., Kitahama, K., Fort, P., Hermann, D.M., and Jouvet, M. (1995). Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroreport* 6, 2527–2531.
- Pickering, A.E., Spanswick, D., and Logan, S.D. (1994). 5-Hydroxytryptamine evokes depolarizations and membrane potential oscillations in rat sympathetic preganglionic neurones. *The Journal of Physiology* 480, 109–121.
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Goulding, M., and Jessell, T.M. (2001). Control of Interneuron Fate in the Developing Spinal Cord by the Progenitor Homeodomain Protein Dbx1. *Neuron* 29, 367–384.
- Polgár, E., Durrieux, C., Hughes, D.I., and Todd, A.J. (2013a). A Quantitative Study of Inhibitory

- Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *PLoS ONE* 8, e78309.
- Polgár, E., Sardella, T.C.P., Tiong, S.Y.X., Locke, S., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2013b). Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn: *Pain* 154, 2606–2615.
- Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y.A., Cicchetti, F., and Awatramani, R.B. (2014). Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. *Cell Reports* 9, 930–943.
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., and Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci* 21, 1260–1271.
- Pratt, C.A., and Jordan, L.M. (1980). Recurrent inhibition of motoneurons in decerebrate cats during controlled treadmill locomotion. *Journal of Neurophysiology*.
- Price, J., and Mudge, A.W. (1983). A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic. *Nature* 301, 241–243.
- Puighermanal, E., Biever, A., Espallergues, J., Gangarossa, G., De Bundel, D., and Valjent, E. (2015). *drd2-cre:ribotag* mouse line unravels the possible diversity of dopamine d2 receptor-expressing cells of the dorsal mouse hippocampus. *Hippocampus* 25, 858–875.
- Qu, S., Ondo, W.G., Zhang, X., Xie, W.J., Pan, T.H., and Le, W.D. (2006). Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Experimental Brain Research* 168, 152–156.
- Qu, S., Le, W., Zhang, X., Xie, W., Zhang, A., and Ondo, W.G. (2007). Locomotion Is Increased in A11-Lesioned Mice With Iron Deprivation: A Possible Animal Model for Restless Legs Syndrome.

J Neuropathol Exp Neurol 66, 6.

Rainville, P., Duncan, G.H., Price, D.D., Carrier, B., and Bushnell, M.C. (1997). Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 277, 968–971.

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96, 415–495.

Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (2008). Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, (Elsevier), pp. 279–310.

Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D., Simeone, A., and Driever, W. (2007). Orthopedia Homeodomain Protein Is Essential for Diencephalic Dopaminergic Neuron Development. *Current Biology* 17, 873–880.

Sagar, S.M., Sharp, F.R., and CuRRAN, T. Expression of c-fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. 240, 5.

Salas, R. The role of the habenula in drug addiction. *Frontiers in Human Neuroscience* 10.

Sardella, T.C., Polgár, E., Garzo, F., Furuta, T., Kaneko, T., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2011). Dynorphin is Expressed Primarily by GABAergic Neurons That Contain Galanin in the Rat Dorsal Horn. *Molecular Pain* 7, 1744-8069-7–76.

Sasaki, M., Obata, H., Kawahara, K., Saito, S., and Goto, F. (2006). Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats: *Pain* 122, 130–136.

Sathyamurthy, A., Johnson, K.R., Matson, K.J.E., Dobrott, C.I., Li, L., Ryba, A.R., Bergman, T.B., Kelly, M.C., Kelley, M.W., and Levine, A.J. (2018). Massively Parallel Single Nucleus Transcriptional Profiling Defines Spinal Cord Neurons and Their Activity during Behavior. *Cell*

Rep 22, 2216–2225.

Saunders, A., Macosko, E.Z., Wysocker, A., Goldman, M., Krienen, F.M., de Rivera, H., Bien, E., Baum, M., Bortolin, L., Wang, S., et al. (2018). Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* 174, 1015-1030.e16.

Schotland, J., Shupliakov, O., Wikström, M., Brodin, L., Srinivasan, M., You, Z., Herrera-Marschitz, M., Zhang, W., Hökfelt, T., and Grillner, S. (1995). Control of lamprey locomotor neurons by colocalized monoamine transmitters. *Nature* 374, 266–268.

Seagrove, L.C., Suzuki, R., and Dickenson, A.H. (2004). Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors: *Pain* 108, 76–87.

Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651–655.

Sharples, S.A., Koblinger, K., Humphreys, J.M., and Whelan, P.J. (2014a). Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Frontiers in Neural Circuits* 8.

Sharples, S.A., Koblinger, K., Humphreys, J.M., and Whelan, P.J. (2014b). Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Frontiers in Neural Circuits* 8.

Sharples, S.A., Humphreys, J.M., Jensen, A.M., Dhoopar, S., Delaloye, N., Clemens, S., and Whelan, P.J. (2015). Dopaminergic modulation of locomotor network activity in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 113, 2500–2510.

Shelton, L., Becerra, L., and Borsook, D. (2012). Unmasking the mysteries of the habenula in pain and analgesia. *Progress in Neurobiology* 96, 208–219.

- Skagerberg, G., Björklund, A., Lindvall, O., and Schmidt, R.H. (1982). Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Research Bulletin* 9, 237–244.
- Smith, J.C., Feldman, J.L., and Schmidt, B.J. (1988). Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. *The FASEB Journal* 2, 2283–2288.
- Solway, B., Bose, S.C., Corder, G., Donahue, R.R., and Taylor, B.K. (2011). Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7224–7229.
- Sommer, C. (2004). Serotonin in Pain and Analgesia: Actions in the Periphery. *MN* 30, 117–126.
- Sonohata, M., Furue, H., Katafuchi, T., Yasaka, T., Doi, A., Kumamoto, E., and Yoshimura, M. (2004). Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol* 555, 515–526.
- Spano, P.F., Govoni, S., and Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 19, 155–165.
- Spike, R.C., Puskar, Z., Andrew, D., and Todd, A.J. (2003). A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 18, 2433–2448.
- St John Smith, E., Blass, G.R., Lewin, G.R., and Park, T.J. (2010). Absence of Histamine-Induced Itch in the African Naked Mole-Rat and “Rescue” by Substance P. *Mol Pain* 6, 1744-8069-6–29.
- Stam, F.J., Hendricks, T.J., Zhang, J., Geiman, E.J., Francius, C., Labosky, P.A., Clotman, F., and Goulding, M. (2012). Renshaw cell interneuron specialization is controlled by a temporally restricted transcription factor program. *Development* 139, 179–190.
- Stuber, G.D., Hnasko, T.S., Britt, J.P., Edwards, R.H., and Bonci, A. (2010). Dopaminergic

- Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *Journal of Neuroscience* 30, 8229–8233.
- Takada, M., Li, Z.K., and Hattori, T. (1988). Single thalamic dopaminergic neurons project to both the neocortex and spinal cord. *Brain Research* 455, 346–352.
- Takeuchi, T., Duszkievicz, A.J., Sonneborn, A., Spooner, P.A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C.C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R.W., et al. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537, 357–362.
- Talpalar, A.E., Bouvier, J., Borgius, L., Fortin, G., Pierani, A., and Kiehn, O. (2013). Dual-mode operation of neuronal networks involved in left–right alternation. *Nature* 500, 85–88.
- Tamae, A., Nakatsuka, T., Koga, K., Kato, G., Furue, H., Katafuchi, T., and Yoshimura, M. (2005). Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors: Dopamine hyperpolarizes spinal dorsal horn neurones. *The Journal of Physiology* 568, 243–253.
- Tandrup, T. (1995). Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root. *The Journal of Comparative Neurology* 357, 341–347.
- Taniguchi, W., Nakatsuka, T., Miyazaki, N., Yamada, H., Takeda, D., Fujita, T., Kumamoto, E., and Yoshida, M. (2011). In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord: *Pain* 152, 95–105.
- Taylor, S.R., Badurek, S., Dileone, R.J., Nashmi, R., Minichiello, L., and Picciotto, M.R. (2014). GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area: Mouse VTA projections. *Journal of Comparative Neurology* 522, 3308–3334.

Thibault, K., Lin, W.K., Rancillac, A., Fan, M., Snollaerts, T., Sordoillet, V., Hamon, M., Smith, G.M., Lenkei, Z., and Pezet, S. (2014). BDNF-Dependent Plasticity Induced by Peripheral Inflammation in the Primary Sensory and the Cingulate Cortex Triggers Cold Allodynia and Reveals a Major Role for Endogenous BDNF As a Tuner of the Affective Aspect of Pain. *J Neurosci* 34, 14739–14751.

Todd, A.J. (2017). Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Molecular Pain* 13, 174480691769300.

Todd, A.J., and Sullivan, A.C. (1990). Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 296, 496–505.

Todd, A.J., Hughes, D.I., Polgár, E., Nagy, G.G., Mackie, M., Ottersen, O.P., and Maxwell, D.J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn: VGLUTS in spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 17, 13–27.

Ueda, M., Oyama, T., Kuraishi, Y., Akaike, A., and Satoh, M. (1995). Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. *Neurosci. Lett.* 188, 137–139.

Vega, J.A., Amenta, F., Hernandez, L.C., and del Valle, M.E. (1991). Presence of catecholamine-related enzymes in a subpopulation of primary sensory neurons in dorsal root ganglia of the rat. *Cell. Mol. Biol.* 37, 519–530.

Venugopalan, V.V., Ghali, Z., Sénécal, J., Reader, T.A., and Descarries, L. (2006). Catecholaminergic activation of G-protein coupling in rat spinal cord: Further evidence for the existence of dopamine and noradrenaline receptors in spinal grey and white matter. *Brain Research*

1070, 90–100.

Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Tomasi, D., and Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15037–15042.

Wang, J.Q., and McGINTY, J.F. (1999). Glutamate-dopamine interactions mediate the effects of psychostimulant drugs. *Addiction Biology* 4, 141–150.

Wang, B., Luo, F., Xia, Y.-Q., and Han, J.-S. (2000). Peripheral electric stimulation inhibits morphine-induced place preference in rats: *NeuroReport* 11, 1017–1020.

Wang, D., Tawfik, V.L., Corder, G., Low, S.A., François, A., Basbaum, A.I., and Scherrer, G. (2018). Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron* 98, 90-108.e5.

Wilson, J.M. (2005). Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. *Journal of Neuroscience* 25, 5710–5719.

Xie, G.-X., Jones, K., Peroutka, S.J., and Palmer, P.P. (1998). Detection of mRNAs and alternatively spliced transcripts of dopamine receptors in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia. *Brain Research* 785, 129–135.

Yang, C.H., Yoon, S.S., Hansen, D.M., Wilcox, J.D., Park, J.J., and Steffensen, S.C. (2011). ACUPUNCTURE INHIBITS GABA NEURON ACTIVITY IN THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AND REDUCES ETHANOL SELF- ADMINISTRATION. 18.

Yasaka, T., Kato, G., Furue, H., Rashid, M.H., Sonohata, M., Tamae, A., Murata, Y., Masuko, S., and Yoshimura, M. (2007). Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn *in vitro*: Morphology and synaptic inputs of SG neurones. *The Journal of Physiology* 581, 603–618.

Yasaka, T., Tiong, S.Y.X., Hughes, D.I., Riddell, J.S., and Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475–488.

Yoshimura, M., and Jessell, T.M. (1989). Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*.

Zagoraïou, L., Akay, T., Martin, J.F., Brownstone, R.M., Jessell, T.M., and Miles, G.B. (2009). A Cluster of Cholinergic Premotor Interneurons Modulates Mouse Locomotor Activity. *Neuron* 64, 645–662.

Zhang, Y., Narayan, S., Geiman, E., Lanuza, G.M., Velasquez, T., Shanks, B., Akay, T., Dyck, J., Pearson, K., Gosgnach, S., et al. (2008). V3 Spinal Neurons Establish a Robust and Balanced Locomotor Rhythm during Walking. *Neuron* 60, 84–96.

Zhao, H., Zhu, W., Pan, T., Xie, W., Zhang, A., Ondo, W.G., and Le, W. (2007). Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1065–1076.

Zhu, H., Clemens, S., Sawchuk, M., and Hochman, S. (2007a). Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D1–D5) in the mouse lumbar spinal cord: A real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* 149, 885–897.

Zhu, H., Clemens, S., Sawchuk, M., and Hochman, S. (2007b). Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D1–D5) in the mouse lumbar spinal cord: A real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* 149, 885–897.

