



Rôle des hétéromères formés par les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne

Andry Andrianarivelo

► To cite this version:

Andry Andrianarivelo. Rôle des hétéromères formés par les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne. Neurosciences. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS014 . tel-03148455

HAL Id: tel-03148455

<https://theses.hal.science/tel-03148455v1>

Submitted on 22 Feb 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE
SORBONNE UNIVERSITE

Spécialité : Neurosciences
École doctorale : Cerveau Cognition et Comportement

Présenté par
Andry ANDRIANARIVELO

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Rôle des hétéromères formés par les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne

Thèse soutenue le 30 Juin 2020 devant le jury composé de :

Pr Stéphane CHARPIER
Pr Camilla BELLONE
Dr Emmanuel VALJENT
Dr Laurent GROC
Dr Martine CADOR
Dr Jocelyne CABOCHE
Dr Peter VANHOUTTE

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée
Directeur de Thèse

THESE DE DOCTORAT DE
SORBONNE UNIVERSITE

Spécialité : Neurosciences
École doctorale : Cerveau Cognition et Comportement

Présenté par
Andry ANDRIANARIVELO

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Rôle des hétéromères formés par les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne

Thèse soutenue le 30 Juin 2020 devant le jury composé de :

Pr Stéphane CHARPIER
Pr Camilla BELLONE
Dr Emmanuel VALJENT
Dr Laurent GROC
Dr Martine CADOR
Dr Jocelyne CABOCHE
Dr Peter VANHOUTTE

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée
Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier infiniment Camilla Bellone et Emmanuel Valjent d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour le temps que vous consacrez à évaluer mon manuscrit et mon travail. Je remercie sincèrement Martine Cador et Laurent Groc pour avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse, et le temps qu'ils m'ont accordé. Je remercie Stéphane Charpier d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, c'est un grand plaisir et honneur d'avoir un de mes premiers enseignants de neurosciences et une des personnes qui m'a inspiré pour devenir neuroscientifique comme président de mon jury.

Je tiens ensuite à remercier Peter Vanhoutte et Jocelyne Caboche pour m'avoir chaleureusement accueilli dans leur équipe en M2 et permis de réaliser ce projet qui m'a passionné à chaque instant. Peter, je te remercie de tout cœur pour absolument tout ! De m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce formidable projet, de m'avoir guidé pendant ces quatre années, d'être toujours là quand on en a besoin, d'être à l'écoute. Je tiens à te remercier pour m'avoir toujours laissé la liberté d'essayer, de me tromper, de recommencer, d'être à l'écoute de mes problèmes, de mes idées et de mes projets que tu as toujours pris en compte et valorisé. Merci pour le temps que tu m'as accordé, les relectures, les corrections, les entraînements pour les oraux et ton exigence, j'ai tellement appris grâce à cela. Merci de nous avoir permis de voyager et de participer à tous ces congrès fabuleux. Merci infiniment, d'avoir gardé ton calme, cherché des solutions, et nous aider à avancer quand les choses n'allaient pas comme prévu. Je salue également ton talent pour trouver les bonnes collaborations, de t'entourer des bonnes personnes et de m'avoir inclus dans ton cercle. Enfin merci pour ta confiance, pour ta bonté, je n'aurais pas rêvé meilleur mentor pour débiter mon aventure dans la recherche scientifique. Je te souhaite le meilleur pour la suite, j'espère un jour avoir l'occasion de travailler à nouveau avec toi.

Jocelyne, je te remercie de m'avoir si bien accueilli, merci pour nous avoir transmis ton expérience dans le design et la réalisation des expériences ainsi que tes critiques très constructives. Merci de m'avoir introduit à des chercheurs influents que je n'aurais pas imaginé rencontrer en rêve, d'avoir étendu mes perspectives et d'être aussi bienveillante.

Estefani, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, que ce soit dans les discussions, les expériences mais surtout ton amitié avec Seb et ta gentillesse ! Nous avons vécu tellement d'aventures, des fous rires dans la salle d'injection, les festins chez les copains et tout ce qu'on a mangé et bu en congrès, merci pour tout ça ! Tu as été une partenaire de thèse extraordinaire et j'espère que nos routes se croiseront à nouveau dans le futur.

Nicolas, le roi des épines, le chef de la Team Spine. Un de mes profs favori en amphi, tu es un enseignant formidable qui m'a appris une bonne partie de tout ce que je sais en imagerie et en analyse d'images. Tu m'as transmis ta passion pour l'imagerie et j'ai vraiment apprécié chacune de nos discussions scientifiques, tu es passionné, bienveillant, pour moi, tu es l'homme le plus gentil du monde et je ne rigole même pas ! Je te remercie pour tout ça.

Merci à Marie-Charlotte, merci d'être ce grand lac calme et apaisant, merci pour ton aide précieuse dans les dernières expériences, pour les nombreux aller-retours à plateforme d'imagerie de l'ICM, d'avoir relu la thèse, d'être toujours enthousiaste et posée. Tu es la relève ! Je compte sur toi !

Sandrine, la reine du cholestérol et des injections. Merci pour ton dynamisme et ta bonne humeur, de t'intéresser à tout le monde, pour ton bonjour plein d'enthousiasme. Toujours la première au

labo ! Merci pour nos discussions très tôt le matin, bien que je n'en boive pas, l'odeur de ton café a toujours suffit pour me réveiller.

Merci à Vincent et Marine pour votre humour, pour avoir mis l'ambiance dans l'équipe, pour vos petits conseils pour les expériences, pour m'avoir appris pleins de techniques. Merci Marine pour ton amitié, et ton soutien.

Merci à Eni, tu es l'une de mes meilleures amies, tu as toujours été là pour moi. Tu es la reine du comportement et merci de m'avoir transmis ton savoir. Merci pour ta cuisine, merci d'être ma confidente, de me soutenir dans tout ce que je fais, pour ta bienveillance et ta gentillesse, tu es l'une de mes meilleures rencontres durant cette thèse. Merci à Radhia pour ta gentillesse, ta bonne humeur, merci pour les techniques que tu m'as apprises, t'es la plus forte et un jour tu seras au sommet, je te remercie également d'être une aussi bonne amie !

Merci aux stagiaires qui m'ont beaucoup aidé dans ce travail, Vinh le génie absolu, Amélie-Rose l'artiste et Clarisse ma rouquine préférée, c'était un plaisir, je suis fier de vous, continuez comme ça ! Merci à Coline, Lisa, Mélanie et les anciens du laboratoire qui ont croisé ma route pendant cette thèse. Merci pour nos nombreux échanges, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Pierre Trifilieff et Jacques Barik, avec Peter vous formez la dreamteam ! Merci pour vos précieux conseils, pour votre aide dans les expériences, votre convivialité, votre humanité, merci d'avoir toujours été disponibles, Peter et vous êtes mes modèles. Merci à Véronique pour ton aide, pour ce super appartement d'où j'écris ces lignes, pour ta gentillesse et bienveillance. Merci à tous nos collaborateurs dont Alexis Bemelmans, pour son aide dans le design et la production des virus et ses conseils. Naguib Mechawar pour avoir fourni les échantillons humains, Jonathan Javitch et Ying Zhu pour leurs conseils dans la mise au point de la PLA sur les tissus humain. Paula Poushina et Sebastian pour les expériences d'électrophysiologie et leur gentillesse. Anna Petitbon et Roman Walle pour les expériences d'auto-administration à la nourriture, les test d'AMPc. Merci à Annick Prigent et Nicolas Raymond de la plateforme d'histologie de l'ICM.

Merci à toutes les personnes de l'unité Neurosciences Paris Seine que j'ai eu la chance de côtoyer et qui m'ont aidé au cours de ces années. Merci à Jean François Gilles et France Lam de la plateforme d'imagerie, à Isabelle Dusart, Stéphanie Daumas, Sandrine Picault, Sylvia Soares et Fabrice Machulka des animaleries et de la plateforme de phénotypage pour leur aide. Merci à toute l'équipe de Philippe Faure et François Tronche pour nos discussions et les bons moments passés ensemble, à Arnaud Jean et Hélène Pouzet pour m'avoir encadré pour mon stage de M1 et pour m'avoir introduit à Peter. Merci à Alain Trembleau et au personnel de l'école doctorale ED3C, c'était un plaisir et un privilège d'avoir siégé au sein du conseil de l'ED3C. Merci aux copains, Maxime, Dorian, Robin, Willy, Lieng, Pierre, Arthur, Sarah, Fiona et j'en oublie....

Enfin, merci à mes parents, qui ont beaucoup sacrifié pour que je puisse vivre mon rêve, qui me soutiennent dans tout ce que fais. Merci à mes sœurs pour leur bonne humeur, leur joie de vivre et leurs encouragements.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	3
ABREVIATIONS	4
RESUME	5
ABSTRACT	6
I. L'ADDICTION : DETOURNEMENT DE L'APPRENTISSAGE MOTIVE PAR LA RECOMPENSE	7
A. Les apprentissages motivés par la récompense	7
B. Le circuit de la récompense	8
C. La dopamine et son rôle dans les apprentissages par la récompense	10
D. L'addiction détourne le circuit de la récompense	13
1. L'addiction	13
2. Les drogues d'abus	15
3. La cocaïne	16
a) Historique	16
b) Epidémiologie	19
c) Effets comportementaux et pharmacocinétique	19
d) Mécanisme d'action	21
4. Les modèles animaux	23
a) La sensibilisation comportementale	24
b) La préférence de place conditionné	24
c) L'auto-administration	25
II. NEURO-CIRCUITERIE, SUBSTRATS NEURONAUX ET MOLECULAIRES DE L'ADDICTION : UN FOCUS SUR LE STRIATUM	27
A. Les ganglions de la base	27
1. Les structures cibles des ganglions de la base	28
2. Afférences des ganglions de la base : focus sur le striatum	29
3. Les voies directe et indirecte des ganglions de la base	31
B. Le striatum	33
C. Les neurones épineux moyens du striatum et leurs rôles dans les réponses aux drogues	35
1. Les neurones épineux moyens (MSN)	35
2. Autres types neuronaux du striatum	36
a) Les interneurones	36
3. Rôles des D1R-MSN et D2R-MSN dans les réponses aux psychostimulants	37
4. Les récepteurs de la dopamine et leur implication dans les réponses à la cocaïne.	42
a) Les récepteurs de la dopamine de type D1	42
b) Les récepteurs de la dopamine de type D2	43
5. Les récepteurs du glutamate	46
a) NMDAR	47
b) AMPAR	51
c) mGluR	52
d) Récepteurs du Kainate	52
III. INTERACTIONS ENTRE LES SYSTEMES DOPAMINERGIQUES ET GLUTAMATERGIQUES DANS LE STRIATUM ET EFFETS DE LA COCAÏNE	52
A. Régulation de la libération de neurotransmetteurs	53
B. Interactions entre DAR et NMDAR par le biais de voies de signalisation intracellulaires	54
C. Les hétéromères DAR-NMDAR	56
1. D1R-GluN1	56
2. D2R-GluN2B	60

II.	OBJECTIFS	63
III.	RESULTATS	64
A.	Article	64
1.	ABSTRACT	65
2.	INTRODUCTION	65
3.	RESULTS	67
4.	DISCUSSION	73
5.	ACKNOWLEDGEMENTS	77
6.	REFERENCES	78
7.	FIGURES	83
8.	ONLINE METHODS	99
IV.	CONCLUSION GENERALE, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
A.	Modulation des hétéromères DAR/NMDAR par la cocaïne et mécanismes sous-jacents.	111
1.	Modulation des hétéromères DAR/NMDAR dans le paradigme de sensibilisation locomotrice	111
a)	Types cellulaires exprimant les hétéromères DAR/NMDAR	112
b)	Localisation subcellulaire des hétéromères DAR/NMDAR	113
c)	Cinétique de formation des hétéromères DAR/NMDAR	114
d)	Modulation des hétéromères DAR/NMDAR et conditionnement opérant	115
e)	Modulation des hétéromères DAR/NMDAR par d'autres drogues d'abus	117
2.	Mécanismes potentiellement impliqués dans la formation des hétéromères DAR/NMDAR en réponse à la cocaïne.	118
a)	Niveaux d'expression et adressage des récepteurs partenaires	118
b)	Modulation des niveaux d'expression de la protéine PSD-95 par la cocaïne.	120
c)	Implication de la stimulation des récepteurs de la DA et du glutamate dans la formation des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B en réponses à la cocaïne	121
d)	Modification post-traductionnelles des récepteurs de la DAR et NMDAR et hétéromérisation	122
B.	Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans les adaptations à long-terme induites par la cocaïne	123
1.	Validation d'une approche permettant d'étudier les fonctions des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B <i>in vivo</i>	123
2.	Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans les altérations synaptiques induites par la cocaïne au sein du striatum.	125
3.	Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans la sensibilisation locomotrice et la préférence de place conditionnée à la cocaïne	128
4.	Les hétéromères DAR/NMDAR ne sont pas impliqués dans la préférence de place pour la nourriture	130
C.	Modulation des hétéromères D2R/GluN2B chez les individus dépendants à la cocaïne.	132
V.	REFERENCES	134
VI.	ANNEXES	169

Table des figures

FIGURE 1 : CONDITIONNEMENT PAVLOVIEN.	8
FIGURE 2: EXPERIENCES D'OLDS ET MILNER.	9
FIGURE 3 : SCHEMA ILLUSTRATIF DU CIRCUIT DE LA RECOMPENSE CHEZ LA SOURIS.	10
TABEAU 1: LES 11 CRITERES DIAGNOSTICS DE L'ADDICTION	14
TABEAU 2 : LES DROGUES ADDICTIVES LES PLUS COMMUNES ET LEURS MECANISMES D'ACTION.	15
FIGURE 5 : MECANISMES D'ACTION DES DROGUES ADDICTIVES LES PLUS COMMUNES SUR LE SNC.	15
FIGURE 6 : LA COCAÏNE EST EXTRAITE DE LA FEUILLE DE COCA.	16
FIGURE 7 : LA COCAÏNE ETAIT UN INGREDIENT DE NOMBREUX PRODUITS DE CONSOMMATION A LA FIN DU XIXE SIECLE.	17
FIGURE 8 : LA COCAÏNE ETAIT UTILISEE COMME OUTIL DE DISCRIMINATION RACIALE AUX USA	18
FIGURE 9: STATISTIQUES SUR LA PRODUCTION MONDIALE ET LA CONSOMMATION EN FRANCE DE COCAÏNE.	19
TABEAU 3 : EFFETS DIFFERENTIELS DE LA COCAÏNE SELON LE MODE D'ADMINISTRATION CHEZ L'HOMME.	20
TABEAU 4 : VALEUR DE K_i D'INHIBITEURS DE TRANSPORTEURS DES MONOAMINES.	21
FIGURE 10: LES DIFFERENTES PHASES DE L'ADDICTION (A LA COCAÏNE).	20
FIGURE 11 : DIFFERENCES ENTRE LES SIGNAUX DA PHASIQUES EN REPONSE A LA NOURRITURE ET A LA COCAÏNE	22
FIGURE 12 : SCHEMA ILLUSTRANT LE PROTOCOLE DE PREFERENCE DE PLACE CONDITIONNE.	25
FIGURE 13 : SCHEMA ILLUSTRANT UNE BOITE D'AUTO-ADMINISTRATION (BOITE DE SKINNER).	26
FIGURE 14 : VOIES DE SORTIE DES GANGLIONS DE LA BASE	28
FIGURE 15 : ORGANISATION ANATOMIQUE DU STRIATUM DU RAT ET DE SES AFFERENCES.	29
FIGURE 16 : DIAGRAMME MONTRANT LES CIRCUITS « CLASSIQUE » DES GANGLIONS DE LA BASE	31
FIGURE 17 : MODELES RECENT DES GANGLIONS DE LA BASE	32
FIGURE 18 : SCHEMA ILLUSTRANT L'ORGANISATION DU STRIATUM, CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS.	34
FIGURE 19: CONVERGENCE DES AFFERENCES GLUTAMATERGIQUES ET DOPAMINERGIQUES SUR LES MSN.	35
FIGURE 20 : ILLUSTRATION DE TECHNIQUES CELLULES-SPECIFIQUES DE MANIPULATION DE L'ACTIVITE DES NEURONES.	37
TABEAU 5 : MANIPULATIONS CELLULES-SPECIFIQUES ET CONSÉQUENCES COMPORTEMENTALES	40
FIGURE 21 : ILLUSTRATION DES SITES D'EXPRESSION DES RECEPTEURS DE LA DOPAMINE DANS LE STRIATUM.	42
FIGURE 22 : IMPLICATIONS DU GLUTAMATE (GLU) ET DE LA DOPAMINE (DA) DANS LES REPONSES A LA COCAÏNE.	47
FIGURE 23 : STRUCTURE D'UNE SOUS UNITE NMDAR.	48
FIGURE 24 : SCHEMA ILLUSTRANT LES HUIT TRANSCRITS DU GENE GRIN1 PRODUITS PAR EPISSAGE ALTERNATIF.	49
TABEAU 6 : MANIPULATIONS CELLULES-SPECIFIQUES DE L'EXPRESSION DES SOUS UNITES NMDAR	51
FIGURE 25 : LES EVENEMENTS MOLECULAIRES QUI SOUS-TENDENT L'ACTIVATION D'ERK INDUITE PAR LA COCAÏNE.	55
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'HETEROMERISATION D1R-GLUN1.	57
FIGURE 27 : STRATEGIE D'ETUDE DES HETEROMERES D1R-GLUN1.	58
FIGURE 28 : LA PSD-95 PERTURBE L'INTERACTION ENTRE D1R ET GLUN1.	59
FIGURE 29 : ROLE DES HETEROMERES D1R-GLUN1 DANS LA PLASTICITE SYNAPTIQUE.	60
FIGURE 30 : FORMATION, REGULATION ET FONCTIONS DES HETEROMERES D2R-NMDAR EN REPONSE A LA COCAÏNE.	61
FIGURE 31 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE « PROXIMITY LIGATION ASSAY » (PLA).	111
FIGURE 32 : LA SENSIBILISATION LOCOMOTRICE EST ASSOCIEE A UNE AUGMENTATION DES DAR/NMDAR DANS LE STRIATUM.	112
FIGURE 33 : SCHEMA HYPOTHETIQUE ILLUSTRANT LES TYPES CELLULAIRES QUI POURRAIENT EXPRIMER LES DAR/NMDAR DANS LE STRIATUM.	113
FIGURE 34 : SCHEMA ILLUSTRANT LES POSSIBLES LOCALISATIONS SUBCELLULAIRES DES DAR/NMDAR DANS LE STRIATUM.	114
FIGURE 35 : MODULATION DES HETEROMERES D1R/GLUN1 DURANT LE SEVRAGE ET UNE REEXPOSITION A LA COCAÏNE	115
FIGURE 36 : L'AUTO-ADMINISTRATION DE LA COCAÏNE EST ASSOCIE A UNE AUGMENTATION DES HETEROMERES DAR/NMDAR.	116
FIGURE 37: LES HETEROMERES D1R/GLUN1 NE SONT PAS MODULE PAR L'AUTO-ADMINISTRATION DE NOURRITURE	117
FIGURE 38 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DEMONTRANT LES PROCESSUS CELLULAIRES DU DEVELOPPEMENT ET DE LA MATURATION DES SYNAPSES SILENCIEUSES GENEREES PAR L'EXPOSITION REPETEE A LA COCAÏNE.	119
FIGURE 39 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DE FORMATION DES HETEROMERES D1R/GLUN1.	120
FIGURE 40 : LA COCAÏNE, EN DIMINUANT L'EXPRESSION DE LA PSD-95, FAVORISE LA FORMATION DES HETEROMERES DAR/NMDAR.	121
FIGURE 41 : LES SEQUENCES IMPLIQUEES DANS L'INTERACTION D1R/GLUN1.	122
FIGURE 42 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES CONSTRUCTIONS VIRALES UTILISEES DANS L'ETUDE.	124
FIGURE 43 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DU ROLE DES HETEROMERES D1R/GLUN1 DANS L'INSERTION DES AMPAR PERMEABLES AU Ca^{2+} .	127

Abréviations

AMPA : Acide Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Méthyl-4-Isoxazolepropionique	LTD : Dépression à Long Terme
AMPC : Adénosine Monophosphate Cyclique	LTP : Potentialisation à Long Terme
BLA : Amygdale Baso-Latérale	MGlur : Récepteurs Métabotropiques Du Glutamate
Camk : Kinase Dépendante de la Calmoduline	MAPK : « Mitogen-Activated Protein Kinase »
CIN : Interneurones cholinergiques	MNK-1 : Kinase Interagissant avec les MAPK-1
Co-IP: Co-Immunoprécipitation	MSN : Neurones Epineux de Taille Moyenne
CPP : Préférence de Place Conditionnée	NAc : Noyau Accumbens
D1-MSN : MSN exprimant le récepteur D1	NET : Transporteur de la noradrénaline
D1R : Récepteur D1 De La Dopamine	SERT : Transporteur de la sérotonine
D1R/GluN1 : Hétéromères formés entre le d1r et la sous-unité GluN1 Des NMDAR	NMDAR : Récepteur de l'Acide N-Méthyl-D-Aspartique
D1R/NMDAR : Hétéromères formés entre les récepteurs D1 de la dopamine et du glutamate	PDE : Phosphodiesterase
D2-MSN : MSN Exprimant le Récepteur D2	PFC : Cortex Préfrontal
D2R : Récepteur D2 de la Dopamine	PKA : Protéine Kinase A
D2S : Forme courte récepteur D2 de la Dopamine	PPTA : Préprotakinin
D2L : Forme longue récepteur D2 de la Dopamine	PSD : Densité Post-Synaptique
D2R/GluN2b : hétéromères formés entre le D2R et la sous-unité GluN2B des NMDAR	PSD-95 : Protéine de la Densité Post-Synaptique-95
D2R/NMDAR : hétéromères formés entre les récepteurs D2 de la dopamine et du glutamate	RPE : Erreur de prédiction de la récompense
DA : Dopamine	RFP : Protéine Fluorescente Rouge
DAR/NMDAR : Hétéromères Formés Entre Les Récepteurs de la Dopamine et du Glutamate	SERT : Transporteur de la Sérotonine
DARPP-32 : phosphoprotéine régulée par la dopamine et L'AMPC	Snc : Substance Noire Compacte
DAT : Transporteur de la Dopamine	SNC : Système Nerveux Central
DLS : Striatum Dorsolatéral	Snr : Substance Noire Réticulée
DMS : Striatum Dorsomédian	TH : Tyrosine Hydroxylase
DSM-V: Manuel Diagnostique et Statistique des Désordres Mentaux	VGLUT : Transporteur Vésiculaire du Glutamate
ERK: Extracellular Signal-Regulating Kinase	VM : Mésencéphale Ventral
GABA: Acide γ-Aminobutyrique	VMAT2 : Transporteur Vésiculaire des Monoamines 2
GFP : Protéine Fluorescente Verte	VP : Pallidum Ventral
Glu : Glutamate	VTA : Aire Tegmentale Ventrale
Gpe : Globus Pallidus Externe	
Gpi : Globus Pallidus Interne	
HPC: Hippocampe	
IEG: Gènes immédiats précoces	

Résumé

Les substances addictives détournent les apprentissages par la récompense en augmentant la dopamine (DA) dans le système mésolimbique, en particulier dans le striatum, où elle module durablement la transmission glutamatergique excitatrice et contribue à la mise en place d'altérations comportementales persistantes.

L'intégration des signaux dopaminergique et glutamatergique au sein du striatum est réalisée par les neurones moyen épineux du striatum (MSN), qui forment deux populations majoritairement distinctes : les MSN de la « voie directe » exprimant les récepteurs D1 de la DA (D1R-MSN) et ceux de la « voie indirecte » qui expriment les récepteurs D2 de la DA (D2R-MSN). Une hypothèse qui prévaut à l'heure actuelle est que la libération de DA induite par les drogues active les D1R-MSN, ce qui promeut le renforcement, alors qu'elle inhibe les D2R-MSN, diminuant ainsi leurs fonctions « anti-renforcement ». Les travaux du laboratoire ont montré que l'interaction physique (i.e. hétéromérisation) entre le D1R et le récepteur NMDA (NMDAR) du glutamate était nécessaire à la facilitation de la transmission glutamatergique par la DA dans les D1R-MSN. À l'inverse, d'autres travaux ont montré que l'interaction D2R / NMDAR sous-tend l'effet inhibiteur de DA sur la signalisation NMDAR dans les D2R-MSN. Toutefois, la modulation et la fonction de ces hétéromères *in vivo* dans les réponses induites par la cocaïne sont encore inconnues.

À l'aide du test de « proximity ligation assay », nous avons montré que la sensibilisation locomotrice induite par des expositions répétées à la cocaïne est associée à la formation d'hétéromères D1R/NMDAR dans le Noyau Accumbens (NAc) et le Striatum Dorsal, tandis que l'hétéromérisation D2R/GluN2B est majoritairement observée au sein du NAc.

Pour identifier les rôles des hétéromères DAR / NMDAR dans les différentes phases des adaptations moléculaires, morphologiques et comportementales induites par la cocaïne *in vivo*, nous avons conçu une approche virale pour perturber les hétéromères DAR / NMDAR de manière contrôlée dans le temps grâce à un promoteur dépendant de la doxycycline. Nous avons constaté que la perturbation de l'interaction D1R / NMDAR dans le NAc bloque la mise en place des altérations synaptiques induites par la cocaïne dans les D1R-MSN ainsi que le développement de la sensibilisation locomotrice et de la préférence de lieu conditionné par la cocaïne (CPP). À l'inverse, le blocage de l'interaction D2R / NMDAR interfère avec le maintien de la sensibilisation psychomotrice et de la CPP à la cocaïne. L'observation d'un rôle préférentiel des hétéromères D2R/GluN2B dans le maintien des réponses comportementales à la cocaïne et leur absence d'effet dans le cas d'une récompense naturelle suggèrent que ce sous-type d'hétéromère pourrait être une cible thérapeutique à envisager. J'ai donc mis au point la détection des complexes D2R / NMDAR à partir des tissus striataux humains post-mortem issus d'individus avec un historique de dépendance aux psychostimulants ou des sujets sains. Ceci m'a permis de montrer, qu'en dépit d'une forte baisse de l'expression du D2R, la proportion de D2R formant des hétéromères avec les NMDAR est trois fois supérieure chez les sujets dépendants par rapport aux sujets sains. Ce travail renforce donc les évidences en faveur d'un rôle central des interactions entre les systèmes dopaminergique et glutamatergiques dans les réponses aux drogues et identifie les hétéromères DAR / NMDAR comme des cibles moléculaires avec un potentiel thérapeutique non seulement dans la dépendance aux drogues mais également pour les nombreux troubles psychiatriques associés à un déséquilibre entre les transmissions dopaminergiques et glutamatergiques.

Abstract

Addictive substances hijack reward-dependent learning by increasing dopamine (DA) in the mesolimbic system, in particular in the striatum, where it modulates durably excitatory glutamatergic transmission and contributes to the establishment of persistent behavioral alterations.

The integration of dopaminergic and glutamatergic signals within the striatum is achieved by the medium-size spiny neurons of the striatum (MSN), which form two mostly segregated populations: the MSN of the "direct pathway" expressing DA D1 receptors (D1R-MSN) and those of the "indirect pathway" which express the DA D2 receptors (D2R-MSN). A prevailing hypothesis is that the surge of DA evoked by drugs of abuse facilitates D1R-MSN activation through the stimulation of D1R, which promotes reinforcement, whereas the D2R-mediated inhibition of D2R-MSN prevent their so-called anti-reward action. Our laboratory has previously shown that the physical interaction (i.e. heteromerization) between D1R and the NMDA glutamate receptor (NMDAR) was necessary for the facilitation of glutamatergic transmission by DA in D1R-MSN. Conversely, others have shown that the D2R/NMDAR interaction underlies the inhibitory effect of DA on NMDAR signaling in D2R-MSN. However, the modulation and function of these heteromers *in vivo* in responses to cocaine are still unknown. Using the "proximity ligation assay" technique, we found that locomotor sensitization induced by repeated exposure to cocaine is associated with the formation of D1R/NMDAR heteromers in the Nucleus Accumbens (NAc) and the Dorsal Striatum, while the D2R/GluN2B heteromerization is mainly observed within the NAc.

To identify the roles of the DAR/NMDAR heteromers in the different phases of the molecular, morphological and behavioral adaptations induced by cocaine *in vivo*, we designed a viral-based approach to disrupt the DAR/NMDAR heteromers in a controlled manner over time owing to a doxycycline-dependent promoter. We found that the disruption of the D1R/NMDAR interaction in the NAc blocks cocaine-evoked long-term synaptic plasticity in D1R-MSN and the development of both psychomotor sensitization and conditioned place preference (CPP). By contrast, blocking the D2R/NMDAR interaction interferes with the maintenance of cocaine psychomotor sensitization and CPP. The observation of a preferential involvement of the D2R/GluN2B heteromers in the maintenance of behavioral responses to cocaine and their lack of effect in natural reward suggests that this subtype of heteromers could be a promising therapeutic target. Based on this hypothesis, we developed the detection of D2R/NMDAR complexes from human post-mortem striatal tissues prepared from individuals with a history of psychostimulants dependence or healthy subjects. This allowed us to show that, despite a sharp decrease in D2R expression, the proportion of D2R forming heteromers with NMDAR is three-fold higher in addict subjects compared to healthy controls. This work therefore reinforces the evidence of the central role of interactions between the dopaminergic and glutamatergic systems in drug responses and identifies the DAR/NMDAR heteromers as molecular targets with therapeutic potential not only in addiction but also for the numerous psychiatric disorders associated with an imbalance between dopaminergic and glutamatergic transmissions.

I. L'addiction : détournement de l'apprentissage motivé par la récompense

A. Les apprentissages motivés par la récompense

Nos comportements sont motivés par des récompenses de différentes natures parmi lesquelles nous devons constamment choisir. Le système nerveux central (SNC) doit intégrer les informations concernant les différentes récompenses et les comparer pour choisir les options avec la valeur subjective la plus élevée. Ces récompenses, ainsi que les stimuli environnementaux et internes qui y sont associés, influencent l'activité des réseaux neuronaux du circuit de la récompense pour réguler l'apprentissage et adapter les comportements dirigés vers un but. Cette plasticité des neurones du système de la récompense joue un rôle central dans les apprentissages motivés par la récompense et elle est altérée dans l'addiction.

Depuis plus d'un siècle, les chercheurs étudient le comportement animal pour comprendre les bases des actions orientées vers un but. Sur la base de l'observation du comportement animal, Thorndike a formulé la loi de l'effet qu'on peut résumer ainsi : « Lorsqu'une réponse est suivie d'une récompense, la connexion entre la réponse et la situation (de récompense) sera renforcée ; et si la réponse est punie, ou non récompensée, la connexion sera affaiblie » (Thorndike, 1911). Selon ce principe, toute action qui amène à une récompense a plus de chance d'être répétée dans le futur. Mais qu'est-ce qu'une récompense et quels rôles jouent-elles ? On peut définir la récompense grâce à ses trois grandes fonctions : le plaisir, l'apprentissage et la motivation (« liking », « learning », « wanting ») (Berridge et al., 2009; Schultz, 2006).

Le plaisir : les récompenses ont des propriétés hédoniques, c'est-à-dire qu'elles induisent des émotions positives. Cette propriété de la récompense est centrale car c'est la sensation de plaisir associée à la récompense qui motive et permet de mieux apprendre. Ceci prend tout son sens du point de vue évolutif, car le plaisir associé à des actions telles que manger, boire ou se reproduire aurait été sélectionné par l'évolution pour renforcer l'apprentissage et la répétition de ces comportements indispensables à la survie de l'individu et de l'espèce (Rolls, 1999).

L'apprentissage : selon Pavlov, la récompense est un objet produisant un changement comportemental assimilé à de l'apprentissage. Certains stimuli, dits primaires, agissent comme des récompenses de façon innée, dès la naissance. C'est par exemple le cas du lait maternel. D'autres stimuli, dits secondaires, peuvent acquérir leur valeur de récompense au travers d'un apprentissage associatif, comme le montre les expériences de Pavlov. En effet, lorsqu'un son de cloche précède la présentation d'une saucisse de manière régulière, les chiens salivent au son de la cloche et pas seulement lorsqu'ils sentent la saucisse (Pavlov, 1927). Une valeur a donc été conférée au son de cloche, un stimulus initialement neutre qui, par association, est devenu prédictif de l'arrivée imminente de la récompense (Figure 1). Dans cette forme d'apprentissage appelée conditionnement « pavlovien » ou « classique », la récompense est considérée comme un « stimulus inconditionnel » (US) et le stimulus prédictif (le son de la cloche) est considéré comme un « stimulus conditionnel » (CS).

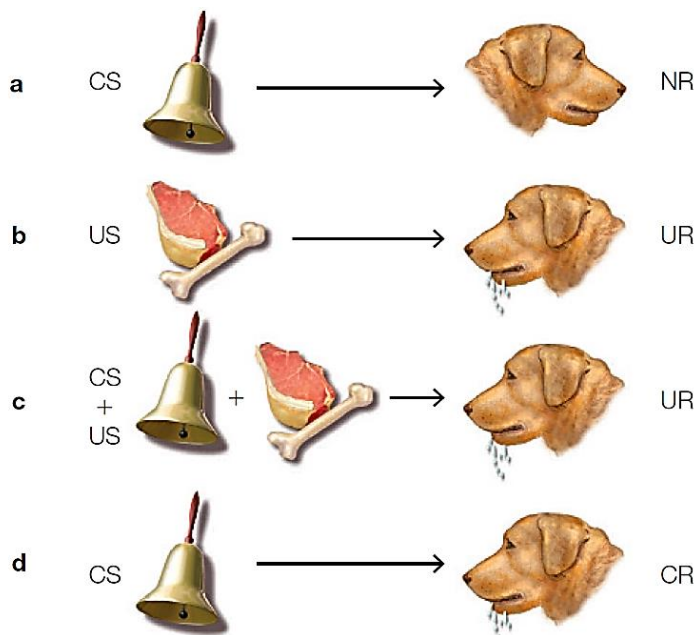


Figure 1 : Conditionnement Pavlovien.

(a) Quand un stimulus ne provoquant pas de réaction chez l'animal comme le son d'une cloche lui est présenté (CS), il n'y a pas de réponse (NR). (b) À l'inverse, la présentation d'un stimulus qui a un sens pour l'animal (US) génère une réponse non conditionnée (UR). (c) Quand le son est apparié de manière répétée à la nourriture, l'animal apprend l'association. (d) Plus tard, le son de la cloche seul, devenu un stimulus conditionné (CS), peut induire la réponse, qui est maintenant une réponse conditionnée (CR). D'après Gazzaniga 2018, « *cognitive neuroscience* » 5^{ème} édition.

La motivation : cette fonction de la récompense renvoie à sa définition la plus communément admise, c'est-à-dire : « Bien matériel ou moral donné ou reçu pour une bonne action, un service rendu, des mérites particuliers. Avantage que l'on tire d'une conduite méritoire » (Le petit Robert). Cette définition ramène à la notion de conditionnement opérant ou instrumental basée sur la réalisation d'une action pour obtenir une récompense, comme théorisée par Thorndike dans sa loi de l'effet et introduit par Skinner en 1937 (Skinner, 1937). Une action est renforcée lorsque l'ajout d'un stimulus appétitif (ex. nourriture) contingent de cette action permet l'augmentation de la probabilité d'émission de ce comportement (renforcement positif). Une action peut également être renforcée lorsque le retrait d'un stimulus aversif (ex. choc électrique) contingent à cette action conduit à l'augmentation de la probabilité d'émission de ce comportement (renforcement négatif). Enfin, lorsque l'ajout d'un stimulus aversif ou le retrait d'un stimulus appétitif, contingents à la réponse, conduisent à une réduction de la probabilité d'émission de cette réponse ; on parle de punition positive ou de punition négative, respectivement (Staddon and Cerutti, 2003, p. 2). Dans ce contexte, une récompense est considérée comme un but qui motive l'individu à reproduire un comportement donné pour bénéficier à nouveau de cette récompense. Pour résumer avec les mots de Schultz « rewards make you come back for more » (Schultz, 2006).

Dans la réalité, apprentissage, motivation et plaisir interagissent en permanence, et s'influencent réciproquement (Berridge et al., 2009). Sans plaisir, souvent il n'y a pas de motivation, et sans motivation, il n'y a ni apprentissage, ni renforcement. Ces trois composantes sont indispensables pour l'apprentissage par la récompense.

B. Le circuit de la récompense

La notion de circuit de la récompense, également appelé « système de la récompense » ou « système mésocorticolimbique », a été introduite en 1954 par les expériences légendaires de James Olds et Peter Milner qui travaillaient à l'époque dans le laboratoire de Donald Hebb à l'université de McGill (Olds and Milner, 1954). Olds et Milner étudiaient à l'époque le système réticulaire activateur ascendant, une région du mésencéphale qui jouerait un rôle dans l'état d'éveil et d'excitation. Pour tester leur hypothèse, ils implantèrent une électrode de stimulation dans cette région pour essayer d'induire un état d'excitation chez des rats circulant librement dans leur cage. L'expérience est un échec, mais Olds et Milner remarquent qu'un rat retourne systématiquement puis reste à l'endroit où il a reçu la stimulation. Avec cette observation Olds fabrique une boîte de Skinner permettant au rat de s'auto-stimuler en appuyant sur un levier. Le rat apprend très rapidement

à actionner le levier pour recevoir la stimulation. Certains rats comme le rat n°34 s'auto-stimulait de manière compulsive (jusqu'à 7 500 fois par jour). En vérifiant l'emplacement de l'électrode, Olds et Milner se sont rendu compte qu'elle était mal placée, elle était située dans l'aire septale (Figure 2). Les sites de stimulations produisant ces mêmes effets ont été appelés les « centres du plaisir » (Olds and Milner, 1954; Olds, 1958).

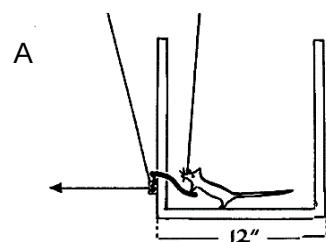


Fig. 1. Diagram of apparatus by means of which a rat delivers electric shocks to its own brain. When the rat steps on the pedal, the electric circuit is closed and current is transmitted to its brain by means of implanted electrodes.



FIG. 3. Photomicrograph showing the electrode track in a cresyl-violet-stained brain section. The section is 1 mm. in front of the anterior commissure. The electrode protruded through the lateral ventricle and its stimulating tip was in the septal area.

Figure 2: Expériences d'Olds et Milner.

(A) Schéma du dispositif expérimental d'après Olds 1958 (B) Photographie montrant le trajet de l'électrode de stimulation. D'après Olds et Milner 1954

Ces expériences furent étendues et les résultats ont apporté la preuve qu'il existait, dans le cerveau, des régions spécialisées dans le traitement de la récompense, on parla alors de BSR pour « Brain stimulation reward » pour décrire ces expériences. Ces régions comprennent le faisceau médian du télencéphale, le pallidum ventral, le thalamus ventral, le striatum ventral ou noyau accumbens (NAc) et le cortex préfrontal médian, ayant tous en commun de recevoir des projections de l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Olds, 1958; Olds and Fobes, 1981; McBride et al., 1999). Cette expérience a été reproduite chez de nombreuses espèces avec les mêmes résultats (Olds and Fobes, 1981). Elle a même été testée de manière très immorale chez l'homme dans une expérience rapportée dans un article en 1972 et intitulé « stimulation septale pour l'évocation d'un comportement hétérosexuel chez un individu homosexuel mâle », où un sujet homosexuel de 24 ans, le patient B19, a été implanté avec des électrodes dans le septum. Selon l'article, le sujet B19 devait s'auto-stimuler tout en visionnant un film montrant un rapport sexuel entre un homme et une femme, et B19 se stimula jusqu'à se plonger dans un état d'euphorie quasi-permanente et dû être déconnecté contre son gré (Moan and Heath, 1972). Heureusement, cette thérapie fut rapidement abandonnée. Enfin, des expériences ont montré que les animaux préféraient la stimulation de ces régions aux récompenses naturelles (Olds, 1958; Shizgal, 1997). Parallèlement, des expériences ont révélé que certaines régions du mésencéphale ventral, dont la VTA et la substance noire compacte (SNc), abritent les corps cellulaires des neurones produisant la dopamine (DA), projetant sur les aires répondant à la BSR (Falck and Hillarp, 1959). De plus, il a été établi que l'auto-stimulation chez le rat est accrue lorsque les électrodes sont implantées dans des régions riches en corps cellulaires dopaminergiques (Corbett and Wise, 1980). Il est important de mentionner également que l'auto-administration d'agonistes dopaminergiques dans les sites BSR produit des effets motivationnels aussi forts que l'auto-stimulation de la BSR, et que l'utilisation d'antagonistes dopaminergiques produit l'effet opposé, suggérant un rôle de la signalisation dopaminergique dans ce comportement d'auto-stimulation (Shizgal, 1997; McBride et al., 1999). D'autre part, la BSR induit une libération massive de DA dans les sites de stimulation surtout dans le striatum et le cortex préfrontal de manière similaire à celle induite par les drogues d'abus (Phillips et al., 1989; Wise, 1996). Ces études démontrent l'existence et définissent les contours du circuit de la récompense, un ensemble de régions sous-corticales et corticales innervées par les neurones dopaminergiques du mésencéphale, et dont la stimulation induit une sensation de plaisir et une augmentation de la

motivation. Ces régions comprennent l'amygdale, l'hippocampe et le système dopaminergique mésocorticolimbique issu de la VTA et la SNc projetant vers le cortex et le striatum (Figure 3).

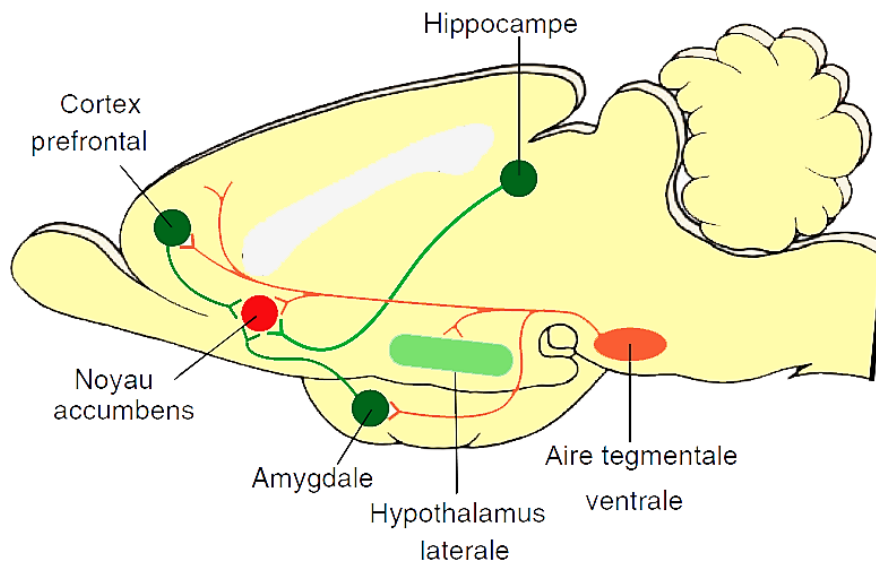


Figure 3 : Schéma illustratif du circuit de la récompense chez la souris.

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) projettent vers l'hypothalamus latérale, l'amygdale, le noyau accumbens et le cortex préfrontal. Les projections glutamatergiques --> et dopaminergiques --> convergent au sein du noyau accumbens. Modifié de Siegel et Sapru 2011 « *Essential Neuroscience* » 2nd édition

C. La dopamine et son rôle dans les apprentissages par la récompense

La DA fait partie de la famille des catécholamines, des composés jouant le rôle de neuromodulateurs, parmi lesquels on compte également l'adrénaline et la noradrénaline... Les catécholamines véhiculent des informations modulatrices dont la valence et l'intensité varient selon la zone cérébrale ciblée et le type de récepteur activé. La DA a été détectée pour la première fois en 1951 par Goodall (Goodall, 1951) dans le cœur et les surrénales de chèvres et quelques années plus tard dans le cerveau (Carlsson and Waldeck, 1958; Montagu, 1957), principalement dans les ganglions de la base au niveau du striatum (Bertler and Rosengren, 1959, p. 195). Peu après il a été montré que la concentration de DA est anormalement basse chez les sujets Parkinsoniens (Carlsson, 1959; Ehringer and Hornykiewicz, 1960) ce qui suggérait son rôle dans la motricité.

La DA est synthétisée dans les neurones dopaminergiques à partir de la tyrosine, qui est d'abord transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH). La L-DOPA est ensuite prise en charge par la dopamine décarboxylase pour donner la dopamine (Blaschko, 1959). Une fois synthétisée, la DA est accumulée dans des vésicules grâce au transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. Une fois stockée dans les vésicules VMAT2, elle est libérée de manière volumique au niveau des varicosités axonales à proximité de la densité post-synaptique (Descarries et al., 1996). La quantité de DA extracellulaire est régulée par les transporteurs dopaminergiques (DAT) situés sur l'élément présynaptique des neurones dopaminergiques qui sont capables de recapter la DA du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire afin qu'elle soit recyclée (Giros et al., 1991; Nirenberg et al., 1996).

Pendant longtemps, la DA a été désignée comme le neurotransmetteur du plaisir, associé à la valeur hédonique d'un stimulus. De nombreuses études ont depuis infirmé cette hypothèse. En effet, la

lésion des neurones dopaminergiques ou l'invalidation génétique de la TH permettant la synthèse de la DA chez la souris, n'empêche pas les animaux de montrer une préférence hédonique pour une solution de sucrose (Berridge and Robinson, 1998). Selon les auteurs, la DA serait nécessaire pour signaler la valeur motivationnelle de certains stimuli (dont des récompenses, des punitions, la nouveauté et d'autres stimuli non attendus), pour motiver des comportements, pour prédire une récompense et pour faciliter la consolidation de la mémoire d'événements saillants (Berridge and Robinson, 1998; Schultz et al., 1998).

L'enregistrement unitaire des neurones dopaminergiques pendant des tâches comportementales a conduit à l'émergence d'hypothèses influentes sur le rôle de la libération de la DA. Il est important de préciser que les neurones dopaminergiques de la VTA sont trouvés dans trois états électrophysiologiques différents : 1) Un état hyperpolarisé, dit inactif ; 2) Une activité tonique avec un profil de décharge lent et 3) Une activité phasique irrégulière avec des décharges en bouffée (Goto et al., 2007). Au cours des années 90, Schultz et ses collaborateurs ont mesuré l'activité des neurones dopaminergiques (Figure 4) chez le singe réalisant un apprentissage opérant motivé par la récompense (association récompense-stimulus). Ils ont montré une augmentation de l'activité électrophysiologique phasique des neurones dopaminergiques, principalement de la voie mésolimbique, temporellement associée à l'obtention d'une récompense inattendue, puis au stimulus prédisant la récompense après l'apprentissage associatif ; et une diminution de cette activité électrophysiologique lorsque l'animal n'obtient pas la récompense prédite par le stimulus conditionné (Schultz et al., 1993; Mirenowicz and Schultz, 1996; Schultz et al., 1998).

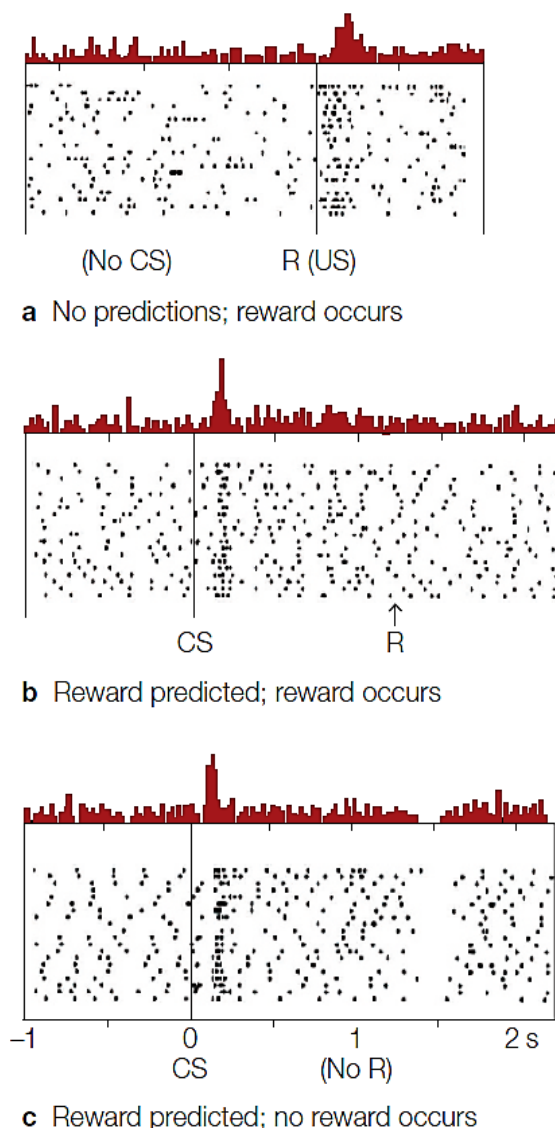


Figure 4 : Activité de neurones dopaminergiques dans un paradigme d'apprentissage associatif opérant.

(a) Avant l'apprentissage, une goutte de jus de fruit (R) est délivrée en l'absence de prédiction (No CS=pas de stimulus conditionné). Le neurone dopaminergique est activé au moment de l'obtention de cette récompense inattendue. (b) Après apprentissage (tâche de conditionnement opérant nécessitant une réponse motrice simple au stimulus conditionné pour obtenir une récompense), le stimulus conditionné (CS) prédit la récompense (R), déclenche le comportement et la récompense est obtenue. Le neurone dopaminergique est activé par le stimulus prédictif de la récompense mais pas par la récompense. (c) Après l'apprentissage, le stimulus CS prédit la récompense, mais elle n'est pas obtenue du fait d'une mauvaise réponse comportementale de l'animal ou parce que l'expérimentateur ne la délivre pas. L'activité du neurone dopaminergique est alors déprimée exactement au moment où la récompense aurait dû être obtenue. L'activité neuronale coïncide avec la délivrance de la boisson (haut) ou avec l'apparition du stimulus visuel (milieu et bas). Les trois diagrammes montrent l'activité des mêmes neurones lors des différentes phases de l'expérience. D'après Gazzaniga 2018, « cognitive neuroscience » 5ème édition.

De plus, des profils d'activation anticipée des neurones dopaminergiques ont été observés dans un modèle d'auto-stimulation des neurones dopaminergique (Garris et al., 1999). Lors de ces expériences, il a été montré que la libération de DA est nécessaire à un bon apprentissage de la tâche, mais que l'auto-stimulation n'était pas seule responsable de la libération de DA puisque les taux de DA augmentent également avant que l'animal n'appuie sur le levier.

Ces travaux ont conduit Schultz à proposer que l'activité des neurones dopaminergiques code pour l'erreur de prédiction de récompense (RPE) qui correspond à la différence entre la récompense reçue et la récompense escomptée (Schultz, 2006). L'erreur de prédiction constitue un point central des théories modernes du conditionnement (Rescorla and Wagner, 1972). (Figure 4).

Cette théorie est applicable à une large variété d'apprentissages par essai-erreur (Sutton and Barto, 1981; Smith et al., 2006) dans lesquels le comportement est adapté aussi longtemps que le résultat est différent de celui espéré. Des stimuli aversifs, intenses ou simplement nouveaux sont également capables d'entraîner une stimulation phasique des neurones dopaminergiques (Horvitz, 2000). La libération de DA est donc en général induite par des stimuli saillants, non prédits.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'apprentissage motivé par la récompense dans les conditionnements opérants nécessite que trois conditions soient remplies : 1) la récompense doit donner du plaisir (« liking »), ce qui correspond à la valeur hédonique de la récompense, 2) il faut un apprentissage (« learning ») pour associer le stimulus à la récompense pour l'obtenir 3) il faut être motivé (« wanting ») pour effectuer la tâche conduisant à l'obtention de la récompense. Le rôle de la DA a été imputé successivement à l'encodage de ces trois composants (Berridge, 2007). Dans certaines conditions, l'utilisation de souris déficientes en DA (Tyrosine hydroxylase knock-out) ou d'animaux lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a permis de montrer que la DA ne jouait pas de rôle direct pour apprécier (liking) et pour apprendre (learning) une récompense, mais était nécessaire pour motiver (wanting) le comportement dirigé par ce but (Robinson et al., 2005). Les souris invalidées pour le transporteur de la DA (DAT knock-out), ont une concentration élevée de DA dans la fente synaptique, mais n'apprennent pas plus rapidement. Par contre, ces souris transgéniques ont une plus forte motivation pour obtenir la récompense (Cagniard et al., 2006; Peciña et al., 2003; Yin et al., 2006). La DA jouerait donc un rôle clé dans la motivation (Steinberg et al., 2013).

Ces dernières années, l'arrivée de l'optogénétique a permis de mieux comprendre le rôle de la RPE encodée par les neurones DA dans les apprentissages. La channel rhodopsine (ChR2) peut être exprimé spécifiquement dans les neurones DA. Grâce à cet outil, il a été montré que les animaux développent une préférence pour un compartiment associé à une activation phasique, mais pas tonique des neurones DA de la VTA. De plus, les souris s'auto-stimulent de manière compulsive les neurones DA de la VTA ou de la SNc (Tsai et al., 2009; Ilango et al., 2014; Steinberg et al., 2014). De manière intéressante, une étude a montré que lorsqu'une récompense naturelle X (nourriture) est prédite de manière constante par un stimulus A, l'apprentissage d'un nouveau stimulus B pour prédire X est bloquée. En revanche, lorsqu'on associe la présentation de la récompense X avec une stimulation optogénétique des neurones DA, la RPE artificiellement induite grâce à l'optogénétique permet l'association du stimulus B à la récompense X. Cet effet n'est possible que lorsque la stimulation des neurones DA est concomitante à la présentation de la récompense. Ce qui signifie qu'une RPE positive permet l'apprentissage d'un nouvel indice prédictif d'une récompense naturelle (Steinberg et al., 2013).

La DA est impliquée dans des processus moteurs, d'attention et d'éveil. Les manipulations du système dopaminergique interfèrent avec ces propriétés. L'analyse des propriétés renforçantes et motivationnelles de la DA dans les tests de conditionnement doit donc être réalisée avec précaution.

Cependant, il semble que les antagonistes dopaminergiques, dans des conditions n'affectant pas les fonctions d'éveil, interfèrent avec la motivation pour obtenir la récompense plutôt que la satisfaction qu'elle apporte. Ainsi, lors d'une faible diminution de la fonction dopaminergique, les animaux aiment (« liking ») toujours obtenir une récompense, mais ne veulent (« wanting ») plus réaliser la tâche pour l'obtenir (Berridge and Robinson, 1998; Berridge, 2007). L'utilisation d'antagonistes dopaminergiques spécifiques dans différents paradigmes opérants à la nourriture ou lors de l'auto-stimulation a permis de proposer que la stimulation des récepteurs de la DA joue un rôle prépondérant dans ces apprentissages motivés par la récompense (Beninger and Miller, 1998). Toutefois, il se pourrait que la diminution de la motivation soit une conséquence de la dévaluation de la récompense induite par les antagonistes dopaminergiques (Wise, 2005). La DA jouerait un rôle pour assigner une valeur motivationnelle à une récompense, qui serait ensuite transférée au stimulus prédisant cette récompense (« incentive salience »).

D. L'addiction détourne le circuit de la récompense

1. L'addiction

Le mot addiction provient du terme latin *ad-dicere* qui signifie « dire à », au sens d'offrir une personne comme esclave. L'esclave n'avait pas de nom propre et était *dictus ad*, « dit à » son maître. En ce sens, le sujet dépendant d'une substance serait celui qui est à la drogue, le joueur au jeu, le sportif au sport.... À l'époque romaine, un « addictum » était un esclave par dette ; un individu condamné à renoncer à sa liberté et à s'acquitter de sa dette, en payant de sa personne (Fernandez and Sztulman, 1997). Cette signification a été conservée au moyen-âge, époque pendant laquelle un débiteur ne pouvant rembourser sa dette pouvait être condamné par instance d'un tribunal à payer son créancier par son travail. Actuellement, le mot anglo-saxon « addiction » désigne la situation des toxicomanes qui s'adonnent à la drogue. Le terme d'addiction est ainsi très fortement lié à la relation contraignante de dépendance entre l'individu et sa drogue. Ce mot commence à être utilisé en France à partir des années 90 comme synonyme de dépendance, l'objectif étant d'utiliser un mot neutre, pour couvrir tous les aspects de la dépendance, qu'il s'agisse de dépendance avec ou sans substances (Feldmann, 2011). Nous utiliserons de manière interchangeable les termes « dépendance » et « addiction » malgré les débats existants sur l'emploi et la signification de ces termes (Fainsinger et al., 2006; Ahmed, 2010).

L'addiction à une substance est un état pathologique défini sur la base du diagnostic des symptômes et déficits observés chez le consommateur humain (augmentation incontrôlable de la prise de drogue, forte dépression du système de récompense, tendance à la rechute en présence de la drogue ou du contexte associé, et ce même après une longue période d'abstinence), des critères décrits dans les manuels de diagnostic et de classifications internationales (DSM-V, *Diagnostic and Statistical Manual*, ou CIM-10, Classification internationale des maladies) qui font à peu près consensus (tableau 1).

Critère de dépendance de la CIM-10	Critère de dépendance du DSM-V
1. Besoin impérieux et irrésistible de consommer la substance (craving) 2. Perte de contrôle sur la quantité et le temps dédié à la prise de substance ou au jeu 3. Beaucoup de temps consacré à la recherche de substances ou au jeu 4. Augmentation de la tolérance au produit addictif	1. Désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psychoactive ; 2. Difficultés à contrôler l'utilisation de la substance 3. Syndrome de sevrage physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation d'une substance psychoactive.

5. Présence d'un syndrome de sevrage, c'est-à-dire de l'ensemble des symptômes provoqués par l'arrêt brutal de la consommation ou du jeu 6. Incapacité de remplir des obligations importantes 7. Usage même lorsqu'il y a un risque physique 8. Problèmes personnels ou sociaux 9. Désir ou efforts persistants pour diminuer les doses ou l'activité 10. Activités réduites au profit de la consommation ou du jeu 11. Poursuite de la consommation malgré les dégâts physiques ou psychologiques	4. Tolérance aux effets de la substance psychoactive 5. Abandon progressif d'autres sources de plaisir et d'intérêts au profit de l'utilisation de la substance psychoactive, et augmentation du temps passé à se procurer la substance, la consommer, ou récupérer de ses effets ; 6. Poursuite de la consommation de la substance malgré la survenue de conséquences manifestement nocives.
--	---

Tableau 1: Les 11 Critères diagnostics de l'addiction

Selon le DSM-V de l'American Psychiatric Association, et du CIM-10 de l'organisation mondiale de la santé. (APA, 2013) (OMS, 2017)

Cliniquement, l'addiction à une substance est caractérisée par une perte de contrôle sur la prise de cette substance associée à un désir irrépessible d'en consommer et de le faire de façon compulsive. Cet état pathologique apparaît chez certains individus vulnérables qui ont d'abord consommé de façon occasionnelle et contrôlée, souvent dans un contexte festif (consommation récréative) dans le but de se procurer des sensations plaisantes (euphorie, bien-être, potentialisation des émotions et des sensations sexuelles) ou de s'évader d'une situation socio-économique difficile (Fischman and Johanson, 1996). Cette consommation devient progressivement régulière, excessive et nuisible pour l'individu (intoxication)(Gawin, 1991). Ainsi, l'addiction est définie comme une pathologie neurobiologique caractérisée par une utilisation compulsive de la drogue malgré les conséquences négatives (OMS, 2004 ; NIDA, 2009). Ces comportements compulsifs sont accompagnés de symptômes de sevrage psychologiques et/ou physiques plus ou moins marqués selon les drogues.

Le taux de réussite pour la réhabilitation des toxicomanes, même après une cure de désintoxication et des programmes de réinsertion, reste extrêmement faible (O'Brien and McLellan, 1996). Les patients désintoxiqués rapportent le désir irrésistible (craving) de prendre de la drogue dès qu'ils se retrouvent confrontés à des éléments associés à la prise de drogue (cues) (Leshner, 1997). Ce témoignage de patients soutient la définition de l'addiction en tant que pathologie cérébrale en partie caractérisée par une association solide entre les stimuli sensoriels associés à la prise de drogue et les effets agréables qui accompagnent la prise de drogue. Actuellement, un but important de la recherche en neurobiologie sur l'addiction est de comprendre les mécanismes à l'origine des effets hédoniques immédiats, les mécanismes neuro-adaptatifs à l'origine de la transition entre une consommation occasionnelle et compulsive, et les mécanismes conduisant aux rechutes chroniques à l'aide des modèles animaux.

2. Les drogues d'abus

On peut classer les substances addictives selon plusieurs critères : leur statut légal, leur nature chimique, leurs effets et modes d'action sur le système nerveux central (Tableau 2) (Figure 5) ainsi que leur mode d'administration. Toutefois, et en dépit de leurs modes d'action distincts, un point commun que partagent toutes les drogues d'abus est d'augmenter la concentration extracellulaire de DA dans les structures du circuit de récompense, en particulier le striatum (Di Chiara and Imperato, 1988). Cette augmentation de DA va détourner le fonctionnement normal des circuits neuronaux de la récompense et entraîner à la fois des modifications aiguës du comportement, mais également des adaptations moléculaires, transcriptionnelles, épigénétiques, synaptiques et morphologiques qui sous-tendent une forme de mémoire pathologique en lien avec les altérations comportementales à long terme observées dans l'addiction (Hyman et al., 2006 ; Lüscher and Malenka, 2011 ; Robison and Nestler, 2011).

Class of Drug	Name	Main Molecular Target	Pharmacology	Effect on Dopamine Neurons	RR
Class I: Drugs that activate G protein-coupled receptors	Opioids	MOR ($G_{i/o}$)	Agonist	Disinhibition	4
	Cannabinoids	CB1R ($G_{i/o}$)	Agonist	Disinhibition	2
	GHB	GABA _B R ($G_{i/o}$)	Weak agonist	Disinhibition	NA
	LSD, mescaline, psilocybin	5-HT _{2A} R (G_q)	Partial agonist	–	1
Class II: Drugs that bind to ionotropic receptors and ion channels	Nicotine	nAChR ($\alpha 4\beta 2$)	Agonist	Excitation, disinhibition, modulates release	4
	Alcohol	GABA _A R, 5-HT ₃ R, nAChR, NMDAR, Kir3 channels	–	Excitation	3
	Benzodiazepines	GABA _A R	Positive modulator	Disinhibition	3
	PCP, ketamine	NMDAR	Antagonist	Disinhibition ^a	1
Class III: Drugs that bind to transporters of biogenic amines	Cocaine	DAT, SERT, and NET	Inhibitor	Blocks DA uptake	5
	Amphetamines	DAT, NET and SERT, VMAT	Reverses transport	Blocks DA uptake, synaptic depletion, excitation	5
	Ecstasy	SERT > DAT, NET	Reverses transport	Blocks DA uptake, synaptic depletion	NA

Drugs fall into one of three categories that target either G protein-coupled receptors, ionotropic receptors/ion channels, or biogenic amine transporters. Note that drugs with RR = 1 [46] are readily abused but will not induce addiction.

^aNot yet supported by experimental evidence.

5-HT₃R, serotonin receptor; GABA_AR, γ -aminobutyric acid receptor; Kir3 channels, G protein inwardly rectifying potassium channels; LSD, d-lysergic acid diethylamide; NET, norepinephrine transporter; NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor; RR, relative risk of addiction [46]; VMAT, vesicular monoamine transporter
doi:10.1371/journal.pmed.0030437.t001

Tableau 2 : Les drogues addictives les plus communes et leurs mécanismes d'action.
D'après Lüscher et Ungless 2006.

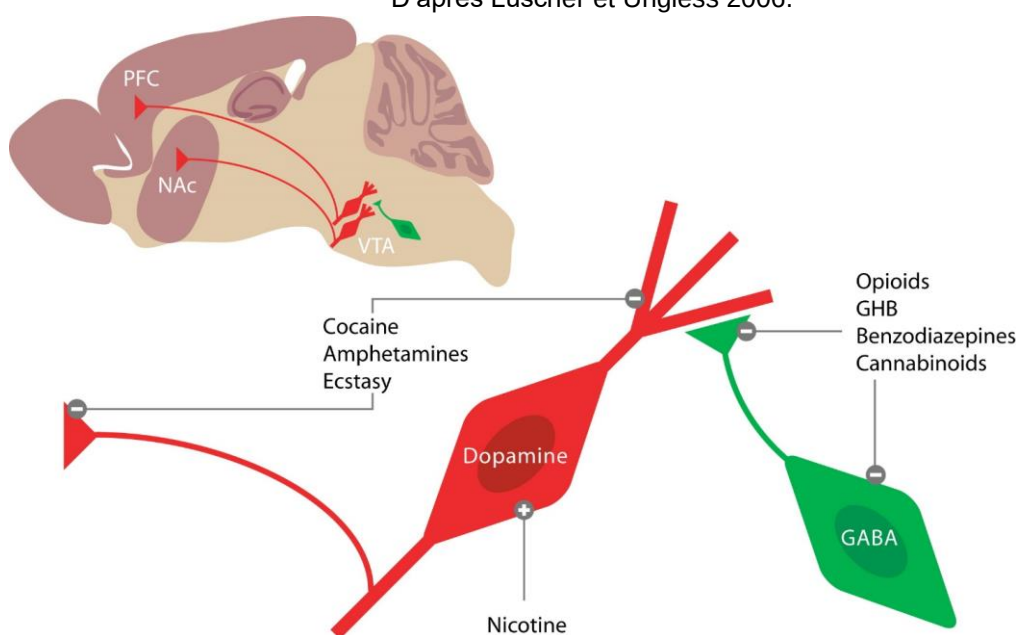


Figure 5 : Mécanismes d'action des drogues addictives les plus communes sur le SNC.
D'après Lüscher et Ungless 2006.

Nous n'aborderons pas ces aspects, ni les mécanismes moléculaires pour chacune de ces substances. Pour des raisons de concision, nous nous focaliserons sur les spécificités de la substance addictive que j'ai utilisée lors de mes travaux de thèse : la cocaïne, substance pour laquelle la prévalence de la consommation est grandissante ces dernières années et pour laquelle aucun traitement pharmacologique efficace n'est disponible.

3. La cocaïne

a) Historique

La cocaïne (benzoylecgonine) est une substance appartenant à la classe des psychostimulants qui comprends également, les amphétamines, la nicotine, la caféine... La cocaïne est un alcaloïde extrait des feuilles de cocaïer (*Erythroxylum Coca*), un arbuste originaire d'Amérique du Sud. Le cocaïer (Figure 6) est l'une des plus anciennes plantes domestiquées et profondément ancrée dans la culture andine qui la considérait comme sacrée. La feuille de coca est consommée par mastication depuis plus de 3 000 ans en Amérique latine pour ses propriétés stimulantes et médicinales (Haddad, 1979; Karch, 2005).

La coca et les effets de sa consommation furent décrits pour la première fois en 1569 par un médecin espagnol, Nicholas Monardes, puis par De Jussieu en 1750. La coca ne fût exportée en occident qu'au milieu du XIX^e siècle. En 1859, Albert Niemann, un doctorant en chimie dans le laboratoire du fameux Friedrich Wöhler, a isolé la cocaïne pure qui représente 0.25 % de la feuille de coca (Niemann, 1860). En 1862, son collègue Wilhelm Lossen identifia la formule chimique de la cocaïne hydrochloride (Figure 6).

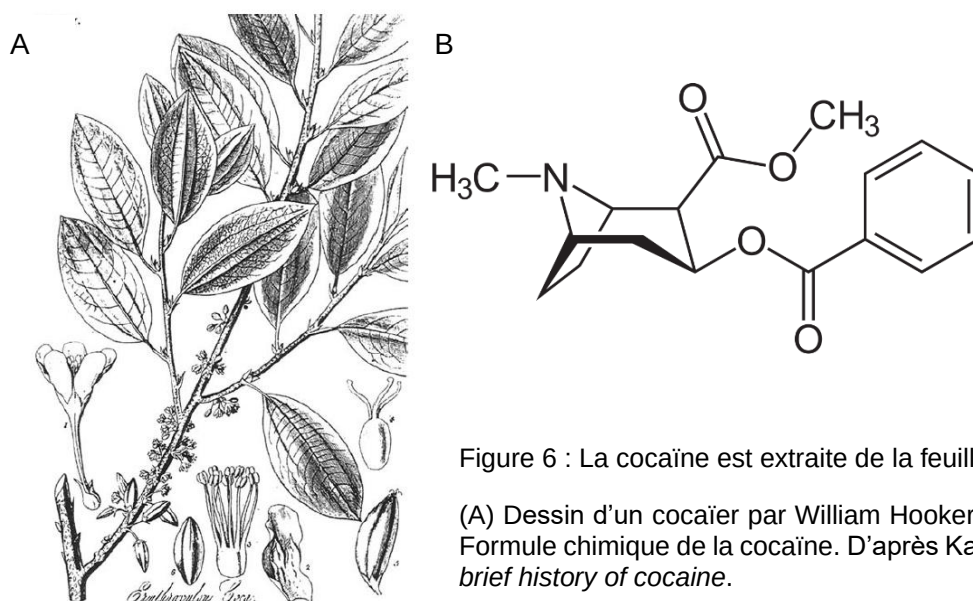


Figure 6 : La cocaïne est extraite de la feuille de coca.

(A) Dessin d'un cocaïer par William Hooker (1835). (B) Formule chimique de la cocaïne. D'après Karch 2005, *A brief history of cocaine*.

Ces découvertes permirent, à la compagnie Merck pharmaceutical, qui commercialisait déjà la morphine, de produire la cocaïne d'abord en petite quantité (moins de 350 g par an). En 1883, Karl Koller, un ophtalmologiste, démontra l'effet anesthésique de la cocaïne. Merck commença alors à augmenter massivement sa production (de 350 g en 1883 à 1.4 t en 1884 et 72 t en 1886) et démarra une campagne marketing agressive pour commercialiser la cocaïne, comme un anti-douleur au départ... La même année, Theodor Aschenbrandt, un médecin allemand, a expérimenté la cocaïne sur des soldats au cours de manœuvres militaires. Il fût alors très enthousiaste sur la capacité de la cocaïne à stimuler l'organisme, à contrer la fatigue, la faim et la douleur, avec un effet moins nocif que les alcools ou le café (Karch, 2005).

Ces observations furent en partie à l'origine de la fascination de l'occident pour cette drogue. De nombreuses entreprises se lancèrent dans sa production, dont le fabricant américain Parke-Davis qui a vendu diverses formes de cocaïne, notamment de la poudre, des cigarettes, et même un kit de cocaïne pour injection, avec l'aiguille en prime. Un nouveau mode de consommation consistant à inhaler la poudre de cocaïne fit son apparition à la même époque (Goldstein et al., 2009; Karch, 2005, p. 2). De manière intéressante, Sigmund Freud, sur la base des travaux d'Aschenbrandt fut l'un des premiers à explorer avec enthousiasme les effets cliniques de la cocaïne prise en automédication. Freud a été l'auteur de nombreuses publications sur les effets de la cocaïne qui se résument dans son affirmation que la cocaïne n'agit pas sur l'appareil moteur, « mais qu'elle améliore les dispositions centrales au travail ». Il fut, parmi des milliers de praticiens, l'un des premiers à vanter les mérites de la cocaïne et à en prescrire massivement en la considérant alors comme une drogue miracle. Sous ses recommandations, la cocaïne fut utilisée dans le traitement de l'addiction à la morphine qui était un fléau à cette époque (Coblence, 2002 ; Karch, 2005). La cocaïne fut aussi incorporée dans de nombreux médicaments en vente libre, des cosmétiques, des aliments et des boissons parmi lesquels on peut compter le Vin Mariani composé de vin de Bordeaux et de cocaïne, le coca-cola... (Figure 7).

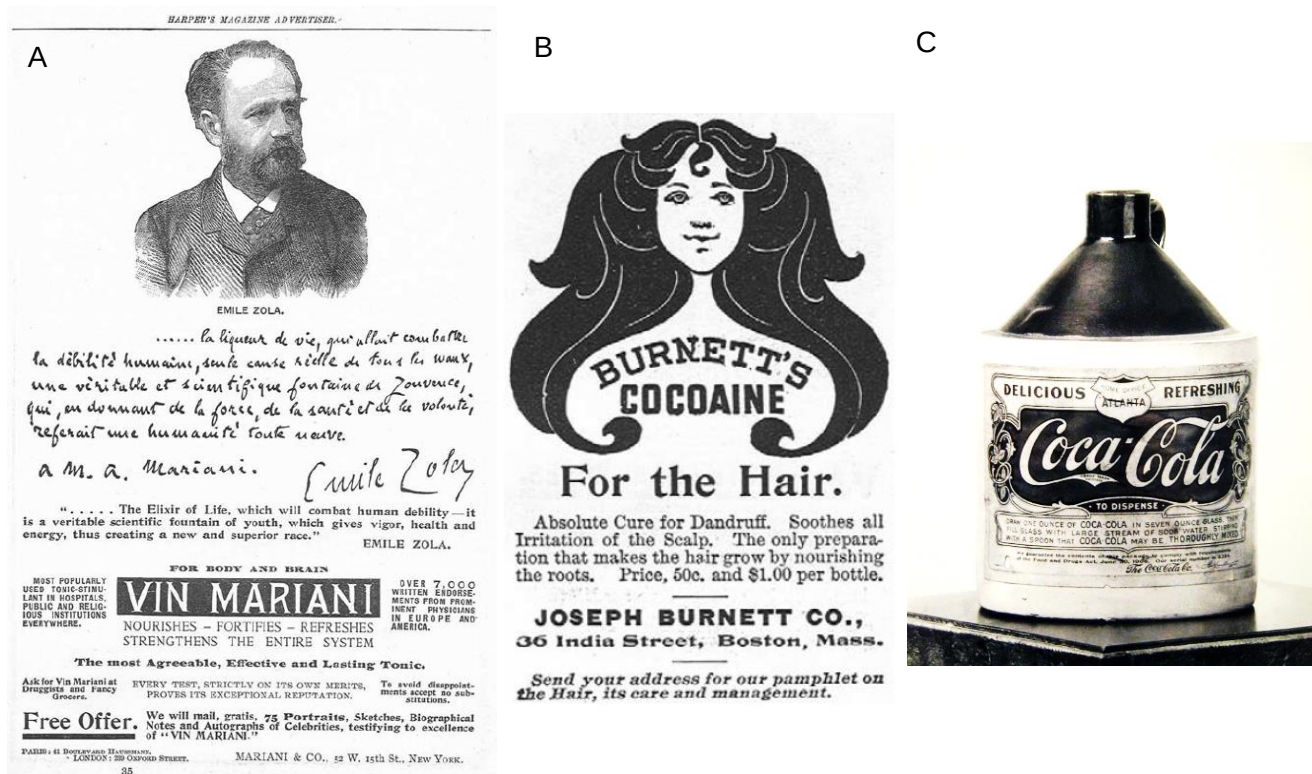


Figure 7 : La cocaïne était un ingrédient de nombreux produits de consommation à la fin du XIXe siècle. (A) Affiche publicitaire du Vin Mariani, un vin de bordeaux à forte teneur en cocaïne et soutenu par Emile Zola. (B) Affiche publicitaire d'une crème pour les cheveux à base de cocaïne. (C) Bouteille de coca-cola comprenant des feuilles de coca comme ingrédient. D'après Karch 2005, *A brief history of cocaine*.

À la fin du XIXe siècle, la cocaïne était utilisée partout en Europe et aux Etats-Unis, disponible en vente libre dans les pharmacies, prescrite par tous les praticiens pour de nombreuses pathologies et utilisée comme anesthésique local en chirurgie (Goldstein et al., 2009; Karch, 2005). Dès 1885, de nombreux rapports présentaient déjà les effets négatifs de l'utilisation de la cocaïne. En effet, en plus de l'augmentation des cas d'addiction, la cocaïne provoquait chez de nombreuses personnes des insomnies, des TOC, des épisodes psychotiques, de la paranoïa sévère, des syndromes parkinsoniens, des complications cardiaques et des convulsions pouvant plonger les patients dans le coma ou provoquer leur décès.

b) Épidémiologie

De nos jours, on constate une forte tendance à la hausse de la production de cocaïne avec un record de 1976 tonnes, dont 1275 tonnes saisies par les autorités en 2017. Le trafic illicite a lui aussi explosé avec 143 pays ayant rapporté des saisies de cocaïne de trafiquants, saisies qui ont doublé entre 2013 et 2017. Le nombre de consommateurs a également augmenté, on estime à 18.1 millions le nombre d'utilisateurs dans le monde. En France, la tendance est particulièrement inquiétante, car la cocaïne est la drogue dont l'usage augmente le plus actuellement (Figure 9).

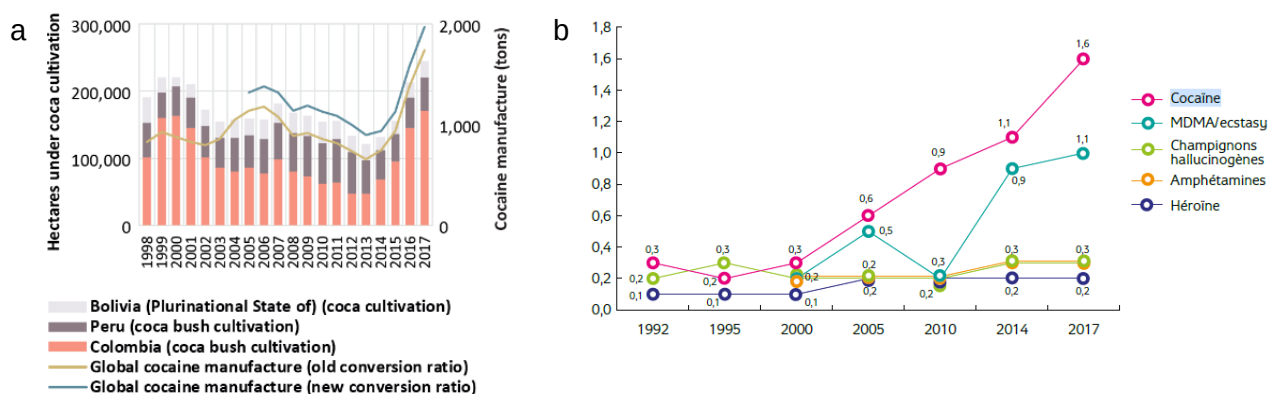


Figure 9: Statistiques sur la production mondiale et la consommation en France de cocaïne.
 (a) Culture de cocaïer et production mondiale de cocaïne entre 1998 et 2017 (United Nations, 2019)
 (b) Évolution de l'usage dans l'année des principales drogues illicites autres que le cannabis entre 1992 et 2017, parmi les 18-64 ans (en %) (rapport OEDT, 2019)

Le nombre de consommateurs a en effet doublé entre 2007 et 2017, surtout dans la tranche d'âge des 18-25 ans (Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, 2019). Il y a également une augmentation du nombre de morts par overdose et du nombre de personnes recherchant un traitement pour l'addiction à la cocaïne (United Nations, 2019).

Les drogues illégales, dont la cocaïne, représentent un coût économique considérable. Par exemple, pour la seule année 2010 en France, le coût total des soins remboursés pour les pathologies engendrées par les drogues illégales est de 1,45 milliards d'euros pour 271 560 malades avec un coût moyen par patient de 1190 euros. De manière incompréhensible, face à ce problème, on observe une baisse du budget de l'état consacré à la prévention et à la recherche alors que les coûts liés à la prise en charge de patients dépendants est moindre comparé au coût lié à leurs incarcérations pour possession de drogues illicites (Kopp, 2015). Il est donc important d'étudier les mécanismes qui sous-tendent l'addiction à la cocaïne afin d'augmenter les chances de développer des traitements efficaces.

c) Effets comportementaux et pharmacocinétique

La cocaïne produit un effet stimulant : les utilisateurs rapportent une augmentation de l'énergie, de la concentration, de la confiance en soi, de la sociabilité, un sentiment de bien-être et d'euphorie (Fischman and Schuster, 1982). De manière intéressante, les rapports ne trouvent pas d'augmentation des performances cognitives complexes suite à la prise de cocaïne, mais seulement une forte résistance à la fatigue. Une diminution de l'appétit et une augmentation de la libido ont également été observées (Fischman and Schuster, 1982). Chez les rongeurs, une injection aigue de cocaïne a un effet hyperlocomoteur et produit des stéréotypies, dont les intensités sont positivement corrélées à la dose et au mode d'administration (Woods, 1977 ; Thomsen and Caine, 2011). Les effets de la cocaïne dépendent du mode d'administration, en intraveineuse ou fumé, les effets sont plus rapides et plus intenses, mais beaucoup plus court en comparaison à une prise orale ou sniffée (Tableau 3).

Administration		Initial onset of action	Duration of 'high'	Average acute dose	Peak plasma levels	Purity	Bioavailability (% absorbed)
Route	Mode						
Oral	Coca leaf chewing	5–10 mins	45–90 min	20–50 mg	150 ng/ml	0.5–1%	—
Oral	Cocaine HCl	10–30 mins	—	100–200 mg	150–200 ng/ml	20–80%	20–30%
Intranasal	Cocaine HCl	2–3 mins	30–45 min	5 × 30 mg	150 ng/ml	20–80%	20–30%
Intravenous	Cocaine HCl	30–45 s	10–20 min	25–50 mg	300–400 ng/ml	7–100 × 58%	100%
				>200 mg	1000–1500 ng/ml		
Smoking	Coca paste	8–10 s	5–10 min	60–250 mg	300–800 ng/ml	40–85%	6–32%
	Freebase			250–1000 mg	800–900 ng/ml	90–100%	
	'Crack' cocaine			—	—	50–95%	

Tableau 3 : Effets différentiels de la cocaïne selon le mode d'administration chez l'homme.
D'après Koob et Le Moal 2006

Avec les prises répétées, chez l'humain, la dose requise pour produire l'effet euphorisant augmente et la durée de ces effets diminuent (Fischman and Schuster, 1982). À l'euphorie succède rapidement la dysphorie, incluant des signes d'anxiétés et d'agitation, et même d'attaques de panique. C'est à partir de ce stade que certains utilisateurs vulnérables perdent le contrôle sur leur prise et vont augmenter leur consommation (Koob and Le Moal, 2006). À partir de ce stade, l'effet euphorisant de la cocaïne est minime et souvent accompagné de mouvements stéréotypés. Une altération de la fluidité de la parole est également rapportée. À des doses plus élevées, des signes de paranoïa et des hallucinations sont observés. Les utilisateurs réguliers peuvent également présenter des symptômes psychotiques (Withers et al., 1995).

L'abstinence à la suite de prises répétées de cocaïne chez l'humain, est associée à des symptômes de dysphorie, d'anhédonie, de dépression, d'anxiété, d'anergie, d'insomnie et de préoccupation permanente pour la drogue qui précipitent la rechute (Figure 10) (Gawin and Ellinwood, 1988 ;

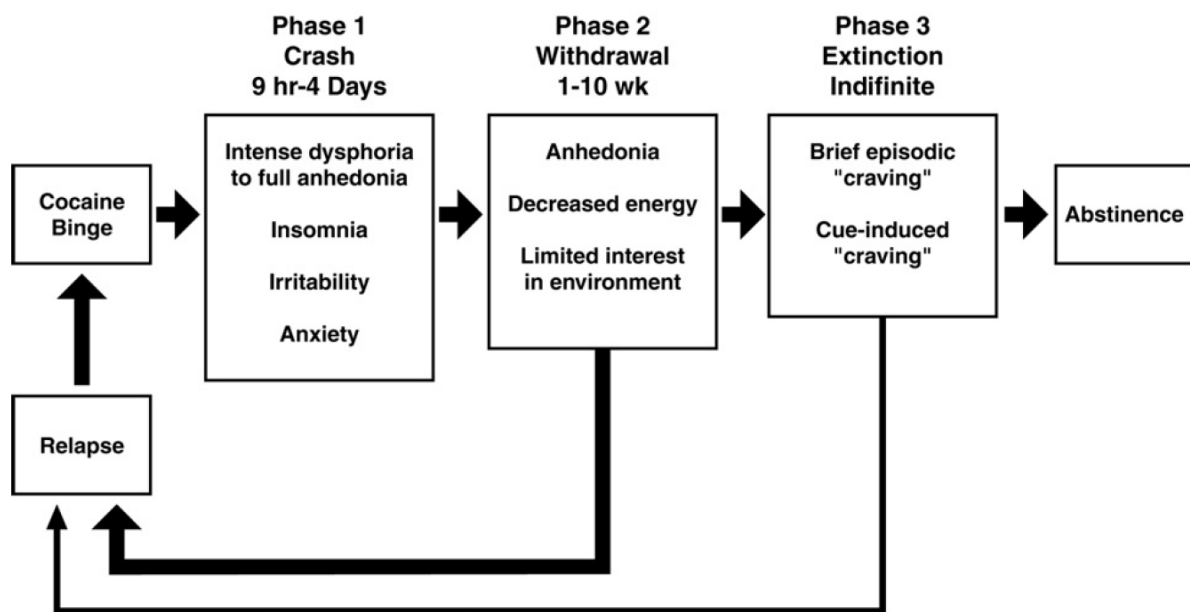


Figure 10: Les différentes phases de l'addiction (à la cocaïne).
D'après Koob et Le Moal 2006

Weddington et al., 1990 ; Miller et al., 1993). Chez les rongeurs, l'abstinence suite à l'exposition chronique de cocaïne induit également une augmentation du niveau d'anxiété et des symptômes de type dépressifs (Stoker and Markou, 2011).

d) Mécanisme d'action

La cocaïne a pour cible primaire les transporteurs membranaires des monoamines : le transporteur membranaire de la dopamine ou DAT, de la noradrénaline ou NET et de la sérotonine ou SERT (Tableau 4). Cependant, l'effet renforçant de la cocaïne dépend de son action sur le DAT (Ritz et

K_i (nM)	hDAT	hSERT	hNET
Psychostimulants			
Cocaïne	260	180	91
S(+) D-amphétamine	180	54,000	66
R(−) L-amphétamine	760	266,000	35
DAT > (SERT, NET)			
Methylphenidate	24	44,000	234
GBR12935	27	940	310
Bupropion	630	15,600	2,300
SERT > (NET, DAT)			
Paroxetine	490	0.1	40
Citalopram	28,100	1.2	4,070
Fluoxetine	1,600	12	280
NET > (SERT, DAT)			
Mazindol	8.1	39	0.5
Desipramine	9,250	17.6	1.2
Reboxetine	>10,000	720	11

Tableau 4 : Valeur de K_i d'inhibiteurs de transporteurs des monoamines.

al., 1987; Chen et al., 2006).

La cocaïne, en se liant au DAT, bloque la recapture de la DA après sa libération et augmente sa concentration extracellulaire (Yeh and De Souza, 1991). Une injection de cocaïne (ou de n'importe quelle drogue addictive chez l'humain) provoque une forte augmentation des taux extracellulaires de DA dans le noyau accumbens (NAc), le cortex préfrontal (PFC) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Di Chiara and Imperato, 1988 ; Kalivas and Duffy, 1993). La concentration en DA augmente rapidement, en quelques minutes, pour ensuite retomber progressivement 1 heure environ après l'injection (Di Chiara and Imperato, 1988).

De manière intéressante, les études de microdialyses *in vivo* chez l'animal ont montré que des injections répétées de cocaïne augmentent la DA dans le NAc (Parsons et al., 1991). Durant le début de la période d'abstinence, le niveau de dopamine reste élevé, avant de décroître progressivement jusqu'à des concentrations en dessous du niveau basal dans les 10 jours post-cocaïne. Cette observation, reproduite de nombreuses fois, est à la base de l'hypothèse selon laquelle la baisse de la concentration de DA serait à l'origine de la dysphorie et des symptômes négatifs observés pendant l'abstinence (Parsons et al., 1991; Robertson et al., 1991; Rossetti et al., 1992; Weiss et al., 1992; Imperato et al., 1992).

En plus de son action sur le transporteur de la dopamine, la cocaïne interagit directement avec les récepteurs sigma-1 ($\sigma 1R$) et sigma-2 ($\sigma 2R$), agissant comme un agoniste (Matsumoto et al., 2002; Sharkey et al., 1988). Les structures de ces récepteurs n'ont aucun analogue chez les mammifères, de même, leurs ligands endogènes et leurs fonctions physiologiques sont encore mal connus (Aguinaga et al., 2019). Le $\sigma 1R$ a été détecté par immunohistochimie dans le SNC de rats, au niveau de la majorité des structures du circuit de la récompense dont, le striatum, l'amygdale, le septum, et les couches superficielles du cortex préfrontal (Alonso et al., 2000). Une étude a montré que le $\sigma 1R$

serait localisé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, l'activation des $\sigma 1R$ par la cocaïne permettrait la libération des stocks intracellulaires de Ca^{2+} via son interaction avec les ankyrin et les récepteurs inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Hayashi and Su, 2001). Le $\sigma 1R$ modulerait l'activité de nombreux canaux ioniques et récepteurs membranaires dont les NMDAR (Kourrich et al., 2012).

Les antagonistes σR inhibent l'augmentation de l'activité locomotrice, ainsi que les convulsions en réponse à une exposition aiguë à la cocaïne (Lever et al., 2014; Matsumoto et al., 2002). Les $\sigma 1R$ sont nécessaires pour l'acquisition et l'expression de la CPP à la cocaïne (Romieu et al., 2002). De plus le $\sigma 1R$ forme des hétéromères avec le D1R (Navarro et al., 2010) et le D2R (Navarro et al., 2013) qui joueraient un rôle dans l'activation et l'inhibition de la voie AMPc-dépendante, respectivement, en réponse à la cocaïne, in vitro, et dans le striatum de souris. Au vu de ces évidences, ces récepteurs jouent un rôle clé dans les réponses à la cocaïne et mériteraient de plus amples investigations.

Nous avons vu précédemment que la DA signale la RPE, c'est-à-dire la différence entre la récompense attendue et la récompense reçue (Schultz and Dickinson, 2000), et que cette RPE est nécessaire pour l'apprentissage de nouveaux indices associés à une récompense naturelle (Steinberg et al., 2013).

D'autre part, lorsqu'un animal est entraîné à appuyer sur un levier pour recevoir une récompense naturelle, comme une boisson sucrée ou de la nourriture, au début de l'apprentissage, la libération de DA dans le NAc a lieu au moment de la présentation de la récompense. Mais lorsque l'apprentissage progresse et que l'animal apprend à prédire la disponibilité de la récompense, la libération de DA dans le NAc a lieu lors de la présentation de l'indice qui prédit la récompense et induit la réponse comportementale (Roitman et al., 2004) (Figure 11).. Quand les animaux sont

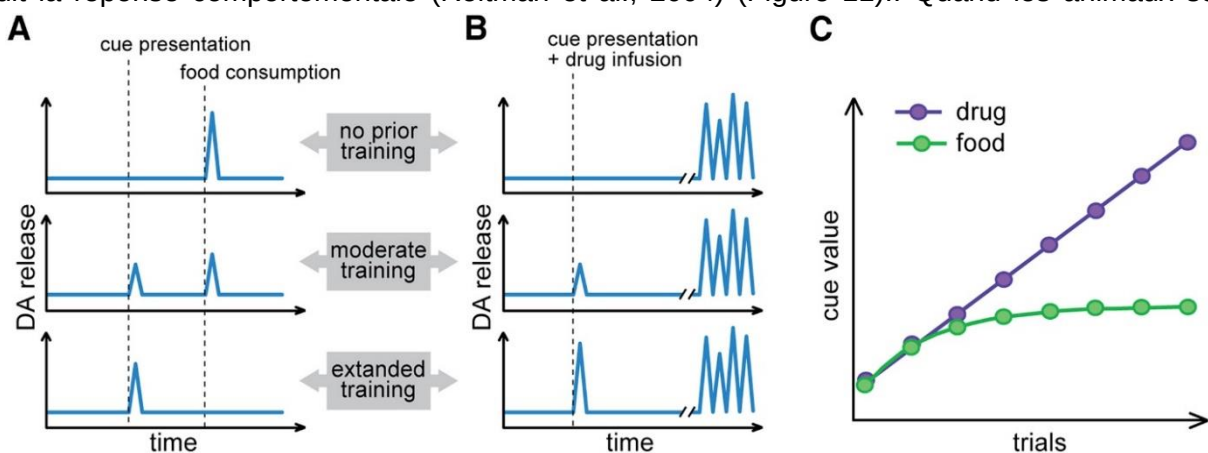


Figure 11 : Différences entre les signaux DA phasiques en réponse à la nourriture et à la cocaïne dans le NAc et les conséquences potentielles pour l'apprentissage

(A) Avant l'apprentissage, la réception d'une récompense alimentaire inattendue entraîne une libération phasique de DA. Au fur et à mesure de l'apprentissage, la libération de DA est transférée de la récompense au signal. (B) Lorsque la cocaïne est la récompense, chaque injection de la drogue produit, avec un certain retard, une libération massive de DA en conséquence des actions pharmacologiques de la drogue. Comme pour la récompense naturelle, les réponses phasiques apparaissent à la présentation des indices. Mais contrairement aux signaux de DA induits par une récompense naturelle, les signaux de DA induits par les drogues addictives ne sont pas modulés par les attentes et persistent tout au long de l'apprentissage. (C) Conséquences proposées de ces signaux DA sur l'apprentissage. Les signaux DA évoqués par les aliments modulés par les attentes en matière de récompense favorisent l'apprentissage jusqu'à ce que la prédiction corresponde au résultat réel, résultant en une valeur de repère stable après quelques essais. En revanche, les signaux DA persistants évoqués par la cocaïne continuent d'augmenter la valeur des indices de cocaïne à chaque essai. La valeur des indices liés à la cocaïne dépasse donc celle des indices associés à la nourriture et peut biaiser la prise de décision vers la cocaïne. D'après Keiflin et Janak 2015

entraînés à recevoir de la cocaïne, la DA augmente dans le NAc en réponse à l'indice associé à la drogue (Phillips et al., 2003). La différence entre les deux types de récompense réside dans la libération de DA au moment de la réception de la récompense. En effet, la nourriture induit une libération de DA au moment de récompense qui décroît avec l'apprentissage quand la récompense devient prédictible, alors que la cocaïne induit artificiellement une augmentation massive de la libération de DA qui n'est pas corrélée avec une action spécifique (Heien et al., 2005; Stuber et al., 2005). Cette libération massive de DA persiste même quand l'apprentissage de la tâche est complété et que la cocaïne est à chaque fois prédite par un indice (Figure 11) (Stuber et al., 2005). Même si la fréquence de la libération phasique de DA est diminuée lors d'une exposition chronique à la cocaïne, la DA est toujours libérée massivement en réponse à la cocaïne, que la drogue soit administrée par l'expérimentateur ou non (Willuhn et al., 2014). La cocaïne mime en quelque sorte une RPE positive à chaque consommation via une libération massive de DA. Avec une prise répétée de cocaïne, cette libération massive de DA va renforcer les indices et les comportements associés à sa consommation jusqu'à un niveau pathologique où les choix décisionnels de l'individu seront biaisés vers la drogue (Di Chiara, 1999; Redish, 2004; Keiflin and Janak, 2015)(Figure 11).

Les études de neuroimagerie fonctionnelle chez les usagers de cocaïne, notamment la tomographie par émission de positons (PET) couplée à l'utilisation de radioligands ont permis de montrer qu'il y avait une corrélation entre le taux d'occupation du DAT par la cocaïne et ses effets subjectifs. Le pic de la sensation d'euphorie (« high ») est en effet atteint quand en moyenne 47% des sites DAT sont occupés par la cocaïne. (Volkow et al., 1997a). Cette technique a également confirmé l'augmentation de la concentration de DA dans le striatum chez les sujets humains. D'autre part, une diminution de la biodisponibilité des récepteurs D2 de la DA a également été retrouvée chez les sujets dépendants à la cocaïne (Volkow et al., 1997b, 2009). Les études d'imageries chez l'homme ont également montré un certain nombre d'anomalies dans les structures cérébrales du circuit de la récompense dont : une diminution de volume du PFC (Franklin et al., 2002) et de l'amygdale (Makris et al., 2004), une diminution de la matière grise dans le cortex orbito-frontal médian (Tanabe et al., 2009) ainsi qu'une diminution de la transmission dopaminergique, du métabolisme cellulaire et du flux sanguin dans le cortex cingulaire et orbito-frontal au cours du sevrage (Rogers and Robbins, 2001; Goldstein and Volkow, 2011). Il a été suggéré que ces altérations au niveau cortical seraient en lien avec l'incapacité des sujets dépendants à contrôler leurs comportements compulsifs de consommation de drogues (Goldstein and Volkow, 2011). Ces études ne permettent cependant pas d'établir un lien causal entre ces altérations et l'exposition à la drogue d'où le recours à des modèles animaux, qui sont importants pour étudier les mécanismes qui sous-tendent les addictions, et ainsi de potentiellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

4. Les modèles animaux

Pour étudier les mécanismes neurobiologiques responsables de l'addiction, les chercheurs ont eu recours aux modèles animaux. Un recours justifiable par plusieurs raisons. Pour des raisons éthiques, il est difficile d'envisager l'utilisation de techniques exploratoires invasives chez l'homme. D'autre part, les modèles mathématiques ou *in silico* de l'addiction ne sont pas encore assez sophistiqués pour en étudier tous les aspects de cette pathologie. Enfin, l'addiction est un trouble complexe du comportement dont l'ensemble des aspects ne peut pas être modélisé de manière satisfaisante à l'aide de lignées cellulaires. L'objectif de la recherche sur les modèles animaux est donc de reproduire certains aspects de l'addiction chez des animaux sains en laboratoire (Ahmed, 2012).

a) La sensibilisation comportementale

La sensibilisation comportementale se caractérise par l'augmentation progressive de la réponse comportementale induite par des administrations répétées d'une même dose de drogue, un phénomène qui persiste même après une longue période de sevrage (Paulson and Robinson, 1991; Kalivas and Duffy, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000). La sensibilisation comportementale peut être décomposée en deux phases : le développement, phase durant laquelle la drogue est administrée de manière répétée et où se mettent en place les modifications cellulaires et moléculaires initiales ; et l'expression (ou maintien) de la sensibilisation comportementale, conséquence de la mise en place d'altérations durables des fonctions neuronales. Cette phase d'expression se manifeste par le maintien de la sensibilisation comportementale lors d'une réexposition à la substance après une période de sevrage (Anderson and Pierce, 2005).

Durant la phase de développement de la sensibilisation comportementale, lorsque l'on mesure l'activité locomotrice de l'animal, celle-ci augmente progressivement suite à l'administration répétée d'une même dose de la drogue. La spécificité de ce paradigme demeure dans le fait que, même après une période de sevrage longue, l'expression de la sensibilisation comportementale est toujours observée lorsque la drogue est de nouveau administrée à l'animal. En effet, la sensibilisation comportementale peut durer des semaines, voire des mois après l'arrêt de l'administration de la drogue (Paulson et al., 1991).

Selon la théorie de « l'incentive sensitization », la sensibilisation aux drogues est un processus dont les conséquences se répercutent sur les effets psychomoteurs, mais également sur les effets renforçants ou motivationnels, ainsi que sur des processus neurochimiques. La sensibilisation comportementale correspondrait donc en quelque sorte à l'expression motrice d'une adaptation pathologique du niveau de la valeur motivationnelle attribuée à la drogue et à son contexte par le système de récompense (Robinson and Berridge, 1993, 2001, 2008). Il a été montré que la sensibilisation comportementale aux drogues est accompagnée d'une potentialisation de la libération de la dopamine dans le noyau accumbens (NAc) et une hypersensibilité du système dopaminergique (Robinson and Berridge, 2000). La sensibilisation locomotrice n'est pas un modèle d'addiction en lui-même, mais il permet d'étudier les adaptations moléculaires et cellulaires induites par l'exposition répétée à une substance, et qui contrôlent le développement et/ou l'expression de cette réponse comportementale (Vanderschuren and Kalivas, 2000).

b) La préférence de place conditionnée

Le test de préférence de place conditionnée (CPP) est un test de conditionnement Pavlovien utilisé pour évaluer chez l'animal le caractère récompensant et plaisant d'une substance, d'un stimulus ou d'une interaction avec un autre sujet. En effet, on apprend à l'animal à associer une récompense (ici l'administration d'une substance addictive qui représente le stimulus inconditionné) avec un contexte (stimulus conditionné). Après le conditionnement, une augmentation du temps passé dans le contexte préalablement associé à la substance est considérée comme la conséquence des effets plaisants de cette drogue pour l'animal (Bardo and Bevins, 2000).

On peut décomposer la CPP en trois phases (Figure 12) :

Durant la phase initiale de ce test, appelée pré-conditionnement (pré-test), l'animal peut explorer librement deux environnements initialement neutres qui diffèrent par des indices visuels et/ou tactiles comme la couleur des parois, la texture des sols.

Durant la phase de conditionnement, l'animal est d'abord confiné dans un des compartiments suite à l'administration d'une substance, puis confiné dans l'autre compartiment où il reçoit le véhicule (substance neutre). Cette phase de conditionnement est répétée plusieurs fois.

La préférence de l'animal est ensuite évaluée durant la phase de post-conditionnement (test), où l'animal peut à nouveau explorer les deux environnements (Figure 12). Sont alors mesurés les temps

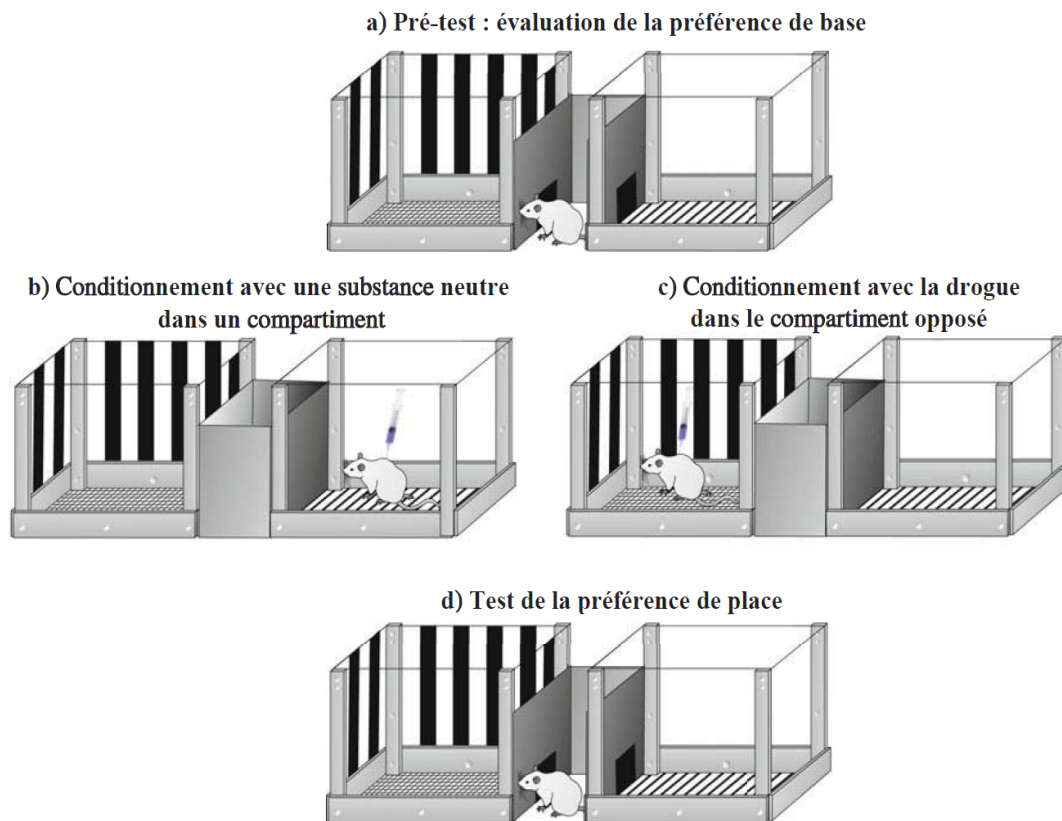


Figure 12 : Schéma illustrant le protocole de préférence de place conditionné.
D'après Olive et Kalivas 2015.

passés dans chaque compartiment. Le temps passé dans le compartiment associé à la drogue durant le test par rapport au pré-test, est utilisé comme indicateur de la préférence. Il existe une corrélation entre le nombre de sessions de conditionnement ainsi que la dose d'une substance renforçante, et le temps passé dans le contexte associé à la drogue, bien qu'une seule session soit suffisante pour induire une CPP (Tzschentke, 1998). La CPP peut être maintenue longtemps après la dernière session de conditionnement. On peut donc étudier les processus mnésiques de sa rétention. Elle peut également être éteinte en réexposant l'animal au contexte sans l'exposer à la drogue, on parle alors de la phase d'extinction de la CPP. Enfin, après l'extinction, la CPP peut être induite par un stress ou par une réexposition à la drogue et étudier les mécanismes qui conduisent à cette « rechute » (Liu et al., 2008). La CPP n'est pas non plus un modèle d'addiction à proprement parlé, principalement, car c'est l'expérimentateur qui administre la drogue. Toutefois, la CPP permet d'étudier les propriétés motivationnelles positives ou aversives d'une substance sans avoir recours à des actes chirurgicaux sur l'animal.

c) L'auto-administration

L'auto-administration (intraveineuse ou intracrâniale) est un test de conditionnement opérant qui est basé sur les propriétés motivationnelles de la drogue comme renforcement positif. Les drogues que les animaux s'auto-administrent correspondent à celles qui ont un potentiel addictif élevé chez l'humain et l'auto-administration intraveineuse de drogue est considérée comme un modèle animal prédictif du potentiel addictif d'une substance (Collins et al., 1984). Dans ce test opérant, c'est l'animal qui déclenche de façon volontaire l'administration de la drogue en réalisant une tâche

comportementale (appuyer sur un levier ou mettre son museau dans un trou), contrairement aux autres tests utilisés (sensibilisation locomotrice ou CPP) dans lesquels c'est l'expérimentateur qui administre la drogue. La technique d'auto-administration par voie intraveineuse a été conçue par l'Américain James Weeks en 1962, bien que le concept de conditionnement opérant fût élaboré par B.F Skinner en 1938. D'ailleurs, les boîtes opérantes continuent de porter son nom (Figure 13).

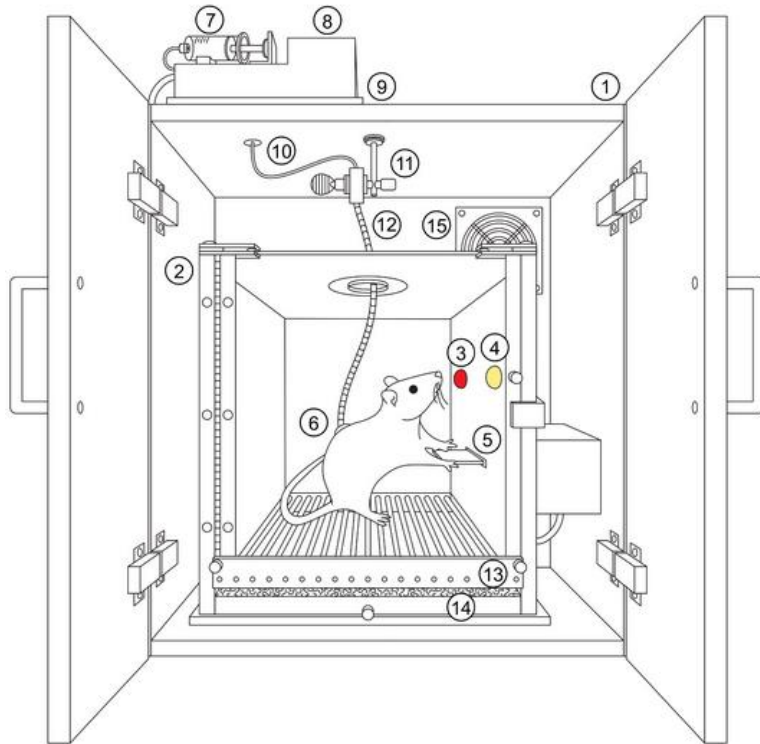


Figure 13 : Schéma illustrant une boîte d'auto-administration (boîte de Skinner).

(1) Chambre insonorisée, (2) Chambre opérante, (3,4) repères lumineux contrebalancés, (5) Levier rétractable, (6) cathéter, (7) seringue contenant la drogue, (8) Pompe à perfusion à vitesse fixe, (9) Coussin en mousse insonorisant, (10) fil de perfusion, (11) Pivot liquide, (12) Ressort de protection, (13) Plancher en acier inoxydable, (14) Poubelle en acier inoxydable avec litière, (15) Ventilateur. D'après Lenon et al 2019.

James Weeks a implanté des rates avec un cathéter intraveineux puis les a placées dans une cage de conditionnement avec leur cathéter connecté à une seringue de morphine placée sur un pousse-seringue mécanique. Les rates ont alors rapidement appris à s'auto-administrer la morphine en appuyant sur un levier, et à réguler leurs prises en fonction de la dose (Weeks, 1962).

Cette expérience a depuis été reprise par de nombreux laboratoires. Grâce à ce modèle, les chercheurs découvrirent que la majorité des animaux testés (chiens, chats, singes, rats), initialement naïfs, s'auto-administraient la plupart des drogues d'abus : morphine, cocaïne, amphétamine, nicotine.

Pour certaines drogues (comme pour la cocaïne), les animaux de laboratoire vont s'administrer le produit jusqu'à en mourir, en ignorant les autres récompenses naturelles comme la boisson et la nourriture (Aigner and Balster, 1978; Bozarth and Wise, 1985).

Il a été montré que ce test comportemental permet de modéliser les différentes phases du processus conduisant à l'addiction : l'initiation ou l'acquisition, l'abstinence et la reprise du comportement d'auto-administration après son extinction. Le besoin d'augmenter les doses (escalade) qui accompagne la transition entre l'usage occasionnel de drogues et l'addiction est reproduit chez l'animal grâce au modèle de l'accès prolongé à la drogue (Ahmed and Koob, 1998; Deroche-Gamonet et al., 2004). En effet, avec un accès étendu, l'auto-administration de cocaïne augmente progressivement au fil des jours, tandis qu'avec un accès plus limité aux drogues, elle reste remarquablement stable, même après plusieurs mois de tests (Ahmed and Koob, 1999). L'extrême motivation pour obtenir de la drogue peut être mise en évidence en augmentant le nombre d'appuis nécessaires à l'obtention d'une dose de drogue. La mesure du point de rupture dans un protocole

de ratio progressif est un indicateur fiable de la motivation pour s'auto-administrer une drogue (Hodos, 1961; Richardson and Roberts, 1996).

La consommation compulsive et le risque de rechute sont évalués par la difficulté à limiter ou à arrêter le comportement conditionné (appui sur le levier ou mettre son museau dans un trou) pour obtenir la drogue pendant les périodes où la drogue n'est plus disponible. Ce comportement est exacerbé chez les animaux ayant eu un accès prolongé à la drogue (Ahmed et al., 2000). La persistance de la consommation de drogues, malgré ses conséquences négatives, peut être étudiée grâce au modèle de résistance à la punition, dans lequel l'animal continue à s'auto-administrer la drogue malgré le fait que son comportement d'auto-administration soit puni par un choc électrique douloureux (Ahmed, 2011). Enfin, la rechute, caractérisée par la reprise du comportement d'auto-administration après une longue période de sevrage, peut-être modélisée par réexposition à la drogue elle-même, ou à un indice (son ou lumière) préalablement associé à la possibilité pour l'animal de s'auto-administrer la drogue (Epstein and Preston, 2003; Shaham et al., 2003; Steketee and Kalivas, 2011).

De manière intéressante, dans le test d'auto-administration à la cocaïne, la grande majorité des animaux s'abstiennent de s'auto-administrer de la cocaïne lorsqu'on leur propose un choix alternatif, par exemple du sucre. En effet, entre 10 et 20 % seulement des individus continuent à s'auto-administrer de la cocaïne malgré la possibilité de faire un choix différent (Cantin et al., 2010). Une fraction relativement proche de celle rapportée par les études épidémiologiques de l'addiction à la cocaïne chez l'humain (~20 %) (Deroche-Gamonet et al., 2004; Belin et al., 2008). L'auto-administration reste à l'heure actuelle le meilleur modèle pour reproduire les nombreuses facettes de l'addiction aux drogues chez l'homme et permet de tester et prédire l'efficacité de nouvelles approches pharmaceutiques.

II. Neuro-circuiterie, substrats neuronaux et moléculaires de l'addiction : un focus sur le striatum

A. Les ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB) forment un ensemble de structures sous-corticales interconnectées qui jouent un rôle crucial dans le contrôle des activités motrices et des comportements motivés par la récompense. Cet ensemble de structures est intimement lié au système dopaminergique mésencéphalique. De ce fait, les GB contrôlent non seulement l'aspect moteur du mouvement, mais sont également en charge d'intégrer les facteurs motivationnels, émotionnels et contextuels. Les GB reçoivent constamment un aperçu des plans moteurs envisageables dans une situation donnée afin d'évaluer essentiellement le potentiel de gain de récompense d'une action par rapport à des actions alternatives tout en prenant en compte le contexte de l'action, les interprétations de l'environnement sensoriel, les états internes de l'animal (Bhutani et al., 2013; Nonomura et al., 2018). Les GB jouent donc un rôle clé dans la planification et la sélection d'un ensemble de programmes moteurs et dans l'inhibition des plans concurrents afin d'exécuter les actions qui présentent un rapport coût/bénéfice favorable (Mink, 1996). Les GB sont également impliqués dans la mémorisation de ces programmes moteurs, l'automatisme motrice et l'apprentissage par renforcement (Shipp, 2017; Steiner and Tseng, 2017; Chakravarthy and Moustafa, 2018).

Pour mieux illustrer le rôle des GB dans un vaste répertoire de comportements, il est important de savoir que des mammifères (chiens, chats, lapins, rats) ayant subi une ablation du cortex cérébral sont toujours capables de se mouvoir, de réagir aux stimuli visuels et auditifs, d'avoir des

comportements orientés vers un but comme chercher de la nourriture, des comportements de fuites face à un danger, de manger et boire, de se toiletter, de se reproduire et d'afficher l'ensemble des comportements maternels. Des animaux décortiqués sont même capables d'apprentissage dans des conditionnements classiques de type Pavlovien (Bjursten et al., 1976). Ces expériences illustrent bien le répertoire important de comportements préservés en l'absence du cortex et qui dépendent de structures sous-jacentes dont les GB.

Les comportements ci-dessus sont essentiels pour la survie d'un animal. Il y a donc un clair avantage évolutif à maintenir un système tel que les GB. Les composants anatomiques des GB sont effectivement fortement conservés chez les vertébrés (Grillner and Robertson, 2016; Stephenson-Jones et al., 2011). On distingue notamment le striatum (le putamen-caudé chez les primates), le globus pallidus externe (GPe) et interne (GPi), le pallidum ventral (VP), le noyau sous-thalamique (STN) et la substance noire réticulée (SNr) et compacte (SNc). L'organisation des structures des GB est également conservée de la lamproie à l'homme avec le striatum et le STN servant de structure d'entrée et la SNr, le GPi et le VP comme noyaux de sortie (Kawaguchi et al., 1990). Les neurones du striatum, de la SNr et du GP sont principalement GABAergiques et exercent une inhibition tonique sur leurs structures cibles (Grillner and Robertson, 2015), alors que dans le VP, on retrouve des neurones de projections de type cholinergiques, glutamatergiques et gabaergiques exerçant des effets plus variés sur leurs structures cibles (Prasad et al., 2020).

1. Les structures cibles des ganglions de la base

Parmi ces régions cibles des GB (Figure 14) on compte les noyaux ventral antérieur et ventral latéral du thalamus dorsal qui reçoivent les projections du GPi avant de projeter directement les aires motrices et exécutives corticales telles que l'aire motrice supplémentaire (SMA) et le cortex moteur, mais aussi vers les aires sensorielles associatives (Middleton and Strick, 1996) ; les neurones de la SNr projettent directement sur les régions locomotrices mésencéphaliques dont le noyau pédonculopontin qui est également impliqué dans les états d'éveil ; le colliculus supérieur qui contrôle les saccades visuelles et l'orientation de la tête ; les neurones du thalamus médiodorsal qui projettent sur les régions oculomotrices du cortex pré-moteur, la substance grise périaqueduculaire qui contrôle les comportements de défense ; (Grillner and Robertson, 2015; Steiner and Tseng, 2017) (Figure 14), le VP et la partie rostromédiane du GPi projettent également vers le thalamus médiodorsal, vers l'hypothalamus latérale (LH) et les neurones du mésencéphale ventral (VM), notamment, ceux du noyau pédonculopontin et la VTA (Tripathi et al., 2013). Les GB projettent également sur l'habenula via le VP, une structure importante dans le contrôle des systèmes neuromodulateurs et dans l'aversion (Grillner and Robertson, 2016). Il est important de noter que la

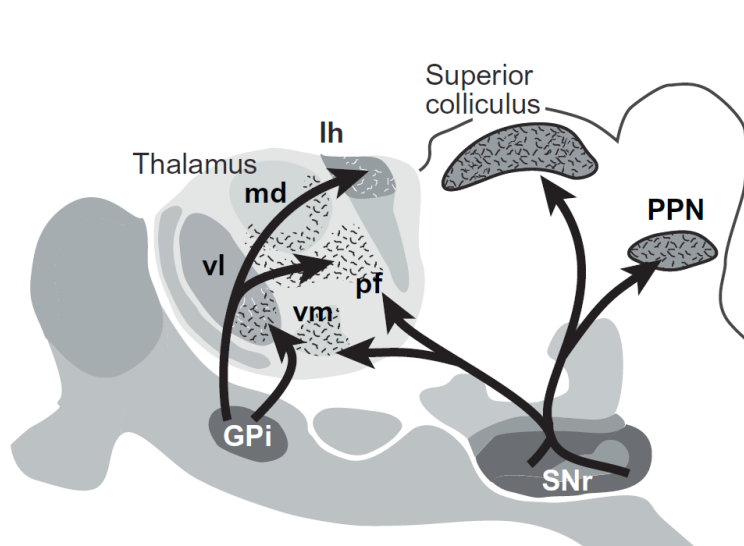


Figure 14 : Voies de sortie des ganglions de la base

Efférences des neurones GABAergiques du GPi et de la SNr. Les projections issues du GPi ciblent les noyaux thalamiques latéral et ventro-latéral (vl), intralaminaire /complexe parafasciculaire (pf), et l'habenula latérale (lh). Les projections issues de la SNr, ciblent quant à elle la région médiodorsale paralamellaire (md), pf et ventromédiale, (vm) des noyaux thalamiques ainsi que les couches intermédiaires du colliculus supérieur et le noyau pédonculopontin (PPN). Les projections du pallidum ventral ne sont pas représentées. D'après Steiner et Tseng 2017.

grande majorité des structures des GB et leurs cibles contrôlent l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Morales and Margolis, 2017).

2. Afférences des ganglions de la base : focus sur le striatum

Les afférences du striatum (Figure 15), peuvent être subdivisées en trois catégories :

-Les afférences sensorimotrices, arrivant majoritairement au niveau du putamen (striatum dorsolatéral chez les rongeurs), sont majoritairement des projections excitatrices issues du cortex moteur, de l'aire moteur supplémentaire (SMA), du cortex somatosensoriel, du cortex visuel secondaire, du cortex auditif, des aires gustatives et du cortex piriforme (Hintiryan et al., 2016). De manière intéressante, chez les primates, les projections du cortex moteur, de la SMA, et du cortex somatosensoriel, conservent une organisation somatotopique au niveau du putamen et des structures en aval à l'exception du SNr (McGeorge and Faull, 1989; Carelli and West, 1991; Romanelli et al., 2005).

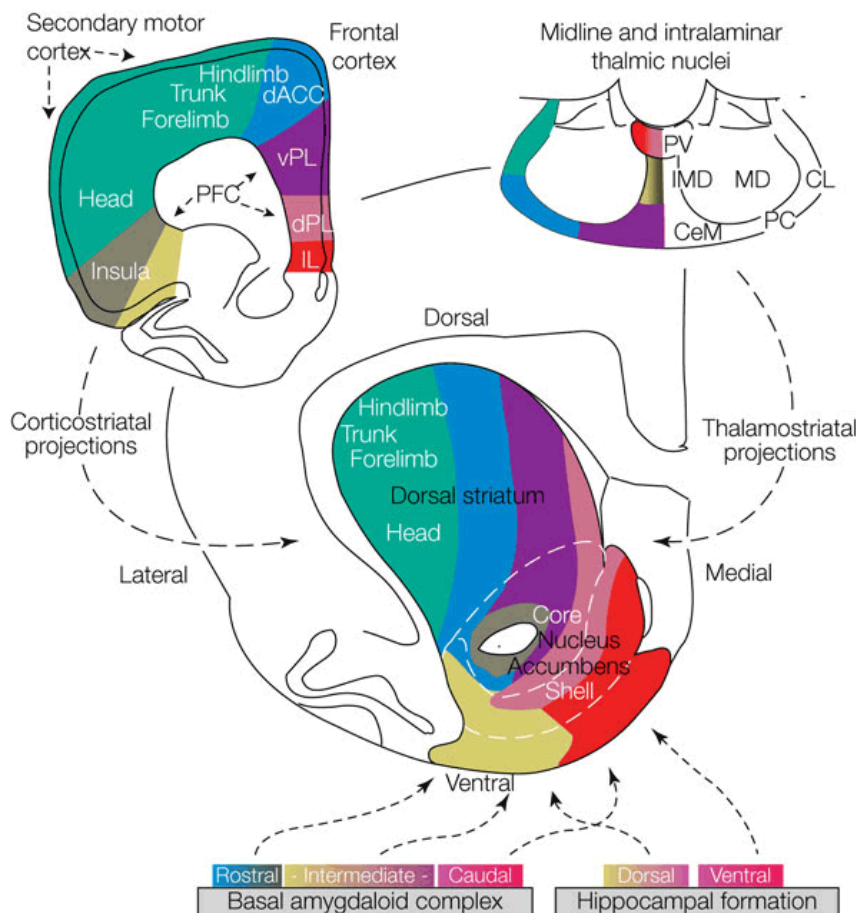


Figure 15 : Organisation anatomique du striatum du rat et de ses afférences.

Au centre se trouve une section coronale du cerveau antérieur du rat montrant le striatum. Les afférences excitatrices convergentes du cortex frontal (en haut à gauche), de la ligne médiane et des noyaux thalamiques intralaminaires (en haut à droite), du complexe amygdaloïde basal (en bas à gauche) et de la formation hippocampique (en bas à droite) se projettent topographiquement sur les zones dorsomédiales à ventrolatérales. Les zones corticales frontales et leurs zones de projection striatales correspondantes sont représentées par les mêmes couleurs. Les afférences thalamiques, amygdaliennes et corticales s'alignent selon une organisation fonctionnelle et anatomique.

Abréviations : ACC, cortex cingulaire antérieur; IL, cortex infralimbique; PFC, cortex préfrontal; dPL et vPL, cortex prélimbiques dorsal et ventral; CeM, CL, IMD, MD, PC et PV, noyaux thalamiques médian central, latéral central, intermédiodorsal, médiodorsal, paracentral et paraventriculaire, respectivement. D'après Takahashi 2008

-Les afférences associatives, provenant pour la majorité du cortex préfrontal, orbitofrontal, cingulaire, pariétal, ciblent essentiellement le noyau caudé (striatum dorsomédian chez le rongeur) (McGeorge and Faull, 1989).

-Les afférences limbiques, provenant de l'hippocampe, de l'amygdale et de l'hypothalamus projettent quant à elle majoritairement au niveau du striatum ventral qui est également innervé par le cortex infralimbique, insulaire et orbitofrontal (Hintiryan et al., 2016).

Néanmoins, certaines aires corticales associatives comme le cortex pariétal, infralimbique et insulaire projettent sur le striatum dorsolatéral. De manière similaire, des aires corticales sensorielles comme le cortex auditif et visuel projettent sur le striatum dorsomédian (Hintiryan et al., 2016).

Le striatum reçoit des projections glutamatergiques de quasiment toutes les aires corticales. En comparaison, la communication entre certaines régions du cortex via les projections corticocorticales semble très limitée (Shepherd, 2013). De ce fait, le striatum est le principal hub de communication entre différentes aires corticales, et certains neurones individuels du striatum peuvent recevoir des projections de plusieurs régions corticales à la fois. De plus, ces afférences corticales sur le striatum sont organisées de manière à ce qu'une fibre d'origine corticale puisse contacter un très grand nombre de neurones striataux, tout en ne formant qu'un nombre réduit de synapses avec chacun d'eux (Cowan and Wilson, 1994). Cette divergence des terminaisons corticales permet à un seul neurone épineux moyen d'intégrer les influences de centaines de milliers de neurones corticaux (Kincaid et al., 1998). Les projections cortico-striatales ont également une organisation fonctionnelle similaire à la topographie dans l'aire corticale d'origine (Goldman-Rakic and Selemon, 1986; Jones et al., 1977). C'est le cas par exemple des projections des cortex somatosensoriels et moteurs qui conservent leurs organisations somatotopiques pour leurs projections vers le striatum dorsolatéral, et les connections entre ces deux structures corticales se superposent au niveau de certains neurones striataux (Carelli and West, 1991). De manière intéressante, les régions corticales qui contrôlent les mouvements de la main ou de la jambe envoient des projections qui convergent, dans le striatum, en s'organisant le long de lignes rostro-caudales spécifiques. Ces bandes rostro-caudales seraient des unités fonctionnelles en rapport avec les mouvements de régions particulières du corps (Graybiel and Grafton, 2015).

De plus, il a été montré que plus les aires corticales sont interconnectées, plus leurs projections sur le striatum se chevauchent. Une telle superposition est plus limitée dans les autres structures des GB et le thalamus (Romanelli et al., 2005; Wilson, 2009). Comme détaillé précédemment, le striatum reçoit également, en plus des afférences corticales, les afférences de toutes les structures limbiques et de quasiment tous les systèmes neuromodulateurs du cerveau. Le striatum peut ainsi détecter des combinaisons d'activités spécifiques de circuits corticaux et limbiques fonctionnellement complémentaires et extrait, avec l'aide des systèmes neuromodulateurs, les patterns d'activités les plus pertinents : par exemple ceux impliquant un grand nombre de neurones, et lors d'activités synchrones de plusieurs régions corticales et limbiques. Cette fonction de filtre des activités corticales et limbiques du striatum est permise grâce à l'organisation de la micro-circuiterie striatale, la spécialisation des différents types neuronaux et des mécanismes moléculaires mise en jeu au sein des neurones striataux.

Le thalamus projette également de manière importante sur le striatum, en effet, mis à part les noyaux antéroventral, réticulaire, ventral postéromédial et postérolatéral, tous les noyaux thalamiques projettent sur le striatum. De plus, il existe une forte convergence des afférences corticales et thalamiques au sein du striatum (Hunnicutt et al., 2016, 2014).

La grande majorité de ces afférences est de nature glutamatergique et leur efficacité est modulée par les des systèmes neuromodulateurs, notamment les afférences issues des neurones dopaminergiques de la SNc qui projettent sur le striatum dorsal et celles de la VTA qui ciblent le striatum ventral (Bolam et al., 2000).

En plus des afférences glutamatergiques et dopaminergiques, le striatum reçoit également des projections des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal (Steinbusch, 1981), les terminaisons noradrénergiques du locus coeruleus (Gaspar et al., 1985) et cholinergiques du noyau pédonculopontin (Dautan et al., 2014; Mena-Segovia and Bolam, 2017).

3. Les voies directe et indirecte des ganglions de la base

Au vu de la connectivité des GB, il est donc facile de se rendre compte qu'ils forment un véritable hub intégratif entre les aires cortico-limbiques et les régions effectrices des comportements (Tepper et al., 2007). Intéressons-nous maintenant au circuit « local » des ganglions de la base (Figure 16). Ce dernier est classiquement organisé en deux grandes voies : une voie monosynaptique, dite « voie directe » formée par les projections inhibitrices du striatum dorsal vers le GPi et la SNr, et du striatum ventral vers l'hypothalamus latéral, la VTA et la SNr au niveau du mésencéphale ventral (VM) (Gerfen and Surmeier, 2011) ; et une voie polysynaptique, la « voie indirecte » où le striatum dorsal contacte d'abord le GPe puis la STN avant de projeter vers le GPi/SNr et le striatum ventral vers le VP avant de projeter vers le VM et le thalamus. Le modèle plus contemporain du circuit inclut une troisième voie appelée la « voie hyperdirecte » formé par les projections excitatrices directes du cortex vers le STN et le GPi (Nambu et al., 2002) (Figure 16).

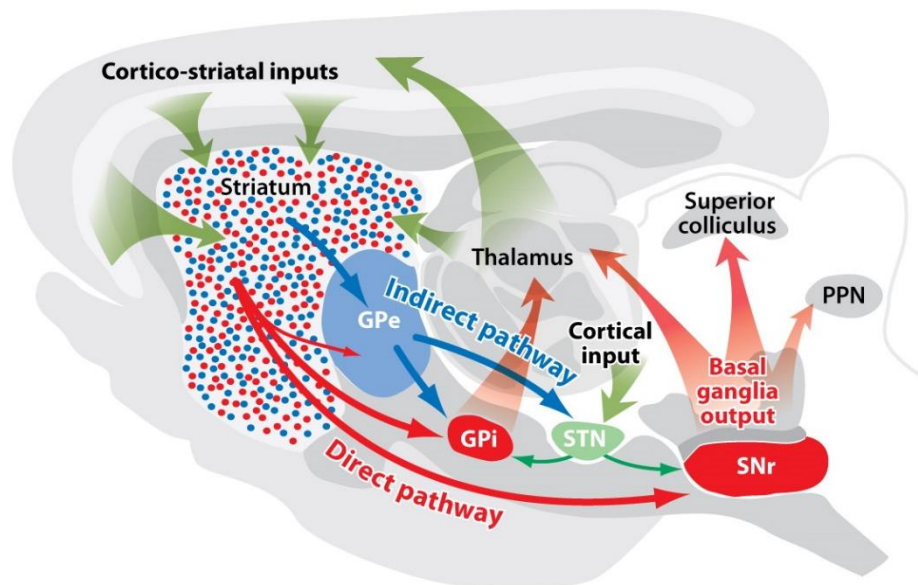


Figure 16 : Diagramme montrant les circuits « classique » des ganglions de la base

Le striatum reçoit des afférences corticales et thalamiques excitatrices. Les sorties des ganglions de la base proviennent du segment interne du globus pallidus (GPi) et de la substantia nigra pars reticulata (SNr) qui sont dirigées vers le thalamus, le colliculus supérieur et le noyau pendunculo-pontin (PPN). Les neurones de la voie directe projettent sur les noyaux de sortie GPi et SNr. Les neurones de la voie indirecte projettent uniquement sur le segment externe du globus pallidus (GPe) qui, conjointement avec le noyau subthalamique (STN), contient des circuits transsynaptiques se connectant à la SNr et le GPi. Les voies directes et indirectes fournissent une régulation opposée de l'interface de sortie des noyaux gris centraux. D'après, Gerfen 2011.

Selon ce modèle, l'activation de la voie directe lève l'inhibition du thalamus qui peut alors activer les aires motrices ; la stimulation de la voie indirecte entraîne quant à elle une désinhibition sur la STN qui va exciter les noyaux de sortie renforçant l'inhibition qu'ils exercent sur le thalamus et le cortex. Comme prédit par ce modèle dichotomique, il a été montré par optogénétique que l'activation de la voie directe favorise les mouvements alors que la stimulation de la voie indirecte a un effet opposé (Kravitz et al., 2010). De manière similaire, cette dichotomie est retrouvée au niveau du NAc où l'activation de la voie directe augmente aussi bien la CPP induite par une faible dose de cocaïne que l'auto-administration de cocaïne, alors que la stimulation de la voie indirecte inhibe ces comportements (Lobo et al., 2010a; Bock et al., 2013).

Toutefois, ce modèle très dichotomique des voies directe et indirecte ayant des rôles distincts, et bien souvent opposés, est remis en question à plusieurs niveaux. Nos connaissances ont largement évolué au-delà d'une voie qui permet l'initiation du mouvement et une seconde qui l'inhibe. En effet, un ensemble d'études récentes ont montré que les deux voies sont co-activées lorsqu'un animal

développe un programme moteur nécessaire à l'obtention d'une récompense (Cui et al., 2013; Isomura et al., 2013; Jin et al., 2014; Tecuapetla et al., 2014)(Figure 17). Il a donc été proposé que l'activation de la voie directe faciliterait la sélection/activation d'un mouvement précis, et qu'une activité simultanée de la voie indirecte permettrait la suppression des actions alternatives/indésirables (Friend and Kravitz, 2014; Mink, 2018). Dans le NAc, une étude a montré une augmentation concomitante de l'activité des neurones de la voie directe (dMSN) et de la voie indirecte (iMSN) dans une tâche où la souris doit appuyer sur un levier pour obtenir de la nourriture. L'inhibition des dMSN ou des iMSN dans cette tâche diminue la motivation des souris (Natsubori et al., 2017).

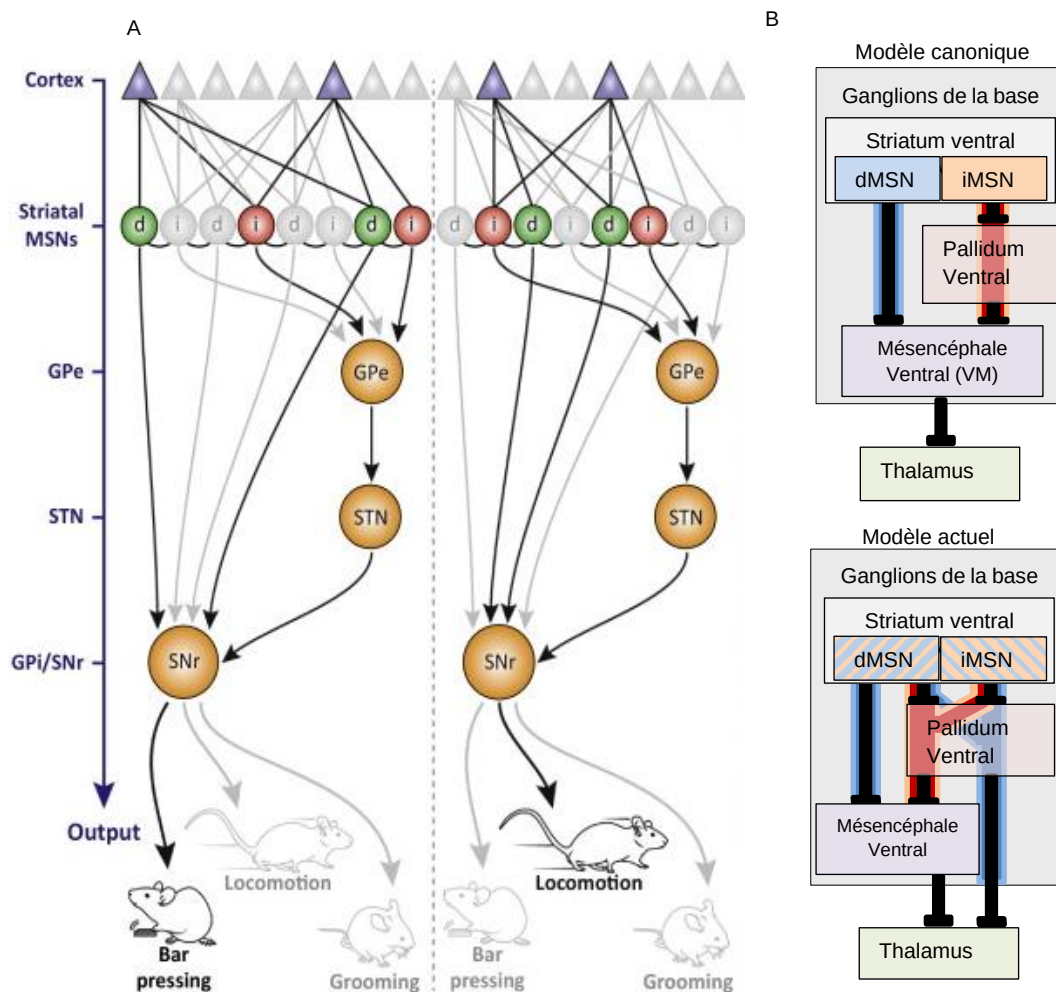


Figure 17 : Modèles récents des ganglions de la base

(A) Schéma montrant différentes populations de neurones corticaux activant différents neurones de la voie directe ou indirecte pour sélectionner des actions différentes. Adaptée de Friend et al. 2014

(B) Schéma montrant l'ancien et le nouveau modèle des voies directes et indirectes du striatum ventral. A gauche le modèle canonique : une ségrégation complète des neurones du NAcc en neurones de la voie directe ou indirecte. A droite, le modèle actuel : les dMSN et iMSN participent à la fois dans la voie directe et dans la voie indirecte. Les MSN projetant dans le VP peuvent faire partie soit de la voie directe ou de la voie indirecte en fonction de la cible des neurones du VP vers lesquels ils projettent.

VP : Pallidum ventral, VM : Mésencéphale ventral. Adaptée de Kupchik et Kalivas 2017

De manière intéressante, les souris peuvent être entraînées à s'auto-stimuler optogénétiquement les iMSN ou dMSN du NAc dans deux tâches. Dans la première tâche, les souris doivent appuyer sur un levier pour recevoir une stimulation des dMSN ou des iMSN. Dans la seconde tâche, elles doivent rester dans une zone précise d'une cage pour recevoir une stimulation des dMSN ou des iMSN. De manière surprenante, les souris s'auto-stimulent au même rythme les dMSN et les iMSN dans la tâche où les souris doivent appuyer sur un levier. Dans la tâche où elles doivent rester dans une zone pour recevoir la stimulation, les souris vont très souvent dans la zone pour recevoir une

stimulation des dMSN. Lorsqu'elles vont dans la zone et reçoivent une stimulation des iMSN, elles évitent cette zone. Ainsi, l'activation de la voie directe a un effet renforçant dans les deux tâches, mais l'activation des iMSN peut être aversive dans certaines conditions (Cole et al., 2018).

Au niveau anatomique, la ségrégation entre les projections des neurones de la voie directe et indirecte a elle aussi été remise en cause par plusieurs études. En effet, il a été montré que le GPe, en plus de recevoir les projections des neurones de la voie indirecte (iMSN), reçoit également des projections d'une fraction de neurones de la voie directe (dMSN) (Lévesque et al., 2003; Matamalas et al., 2009). De manière intéressante, il a été montré que le GPe envoie des projections gabaergiques et cholinergiques directes qui exercent une inhibition tonique sur le PFC. Plus surprenant encore, ces neurones du GPe reçoivent des projections des iMSN et des dMSN du striatum dorsal. De plus, l'activation de la voie indirecte lève l'inhibition exercée par cette voie sur le PFC (Saunders et al., 2015).

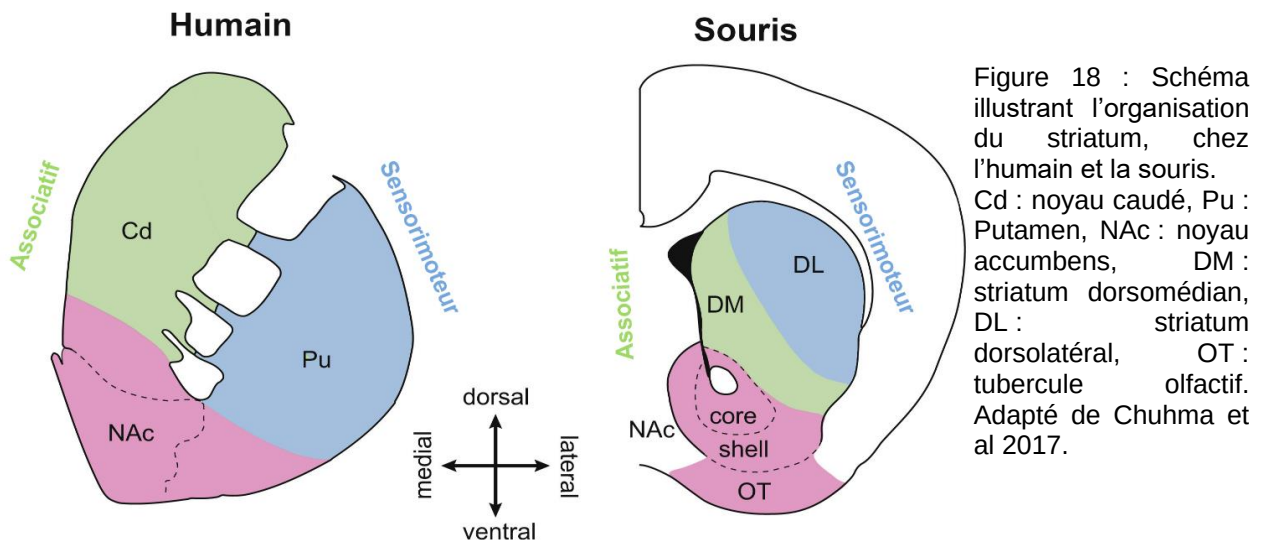
Ces études remettent en cause le modèle initial d'une ségrégation stricte des voies directe et indirecte dans le striatum dorsal et montrent surtout l'existence d'une sortie des GB vers le PFC sous le contrôle simultané des neurones de la voie directe et indirecte. Cette voie pourrait jouer un rôle clé dans les mécanismes impliqués dans les maladies psychiatriques. Au niveau du striatum ventral, cette dichotomie entre voie directe et voie indirecte semble encore plus erronée, car bien qu'une majorité des iMSN du NAc projette vers leur cible canonique, le pallidum ventral (VP), une proportion importante de dMSN de la partie médiane du NAcc projette également vers cette structure (Creed et al., 2016; Kupchik et al., 2015; Zahm and Heimer, 1990). D'autre part, il a été montré que les iMSN envoient des collatérales inhibitrices vers les dMSN (Burke et al., 2017; Dobbs et al., 2016), et que l'activité des iMSN régule la densité de ces collatérales (Cazorla et al., 2014).

L'exécution fine d'un mouvement dirigé vers un but et la génération de comportements motivés résultent donc d'une balance entre les activités simultanées des voies directe et indirecte. Toute altération de cette balance peut induire des déficits moteurs et comportementaux importants, comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Maladie de Parkinson, de Huntington...) et psychiatriques, comme par exemple dans le cas de l'addiction ou de la schizophrénie

B. Le striatum

Le striatum ou néo-striatum est la structure d'entrée et d'intégration la plus importante au niveau volumique, mais également au niveau fonctionnel dans le circuit des GB (Steiner and Tseng, 2017). Chez les primates, le striatum comprend une partie dorsale constituée du putamen et du noyau caudé, séparés anatomiquement par la capsule interne. Terme introduit par Vogt et Vogt cent ans auparavant, le nom striatum vient du latin « corpus striatum », qui veut dire corps strié et fait référence aux fins ponts de substance grise qui relient le noyau caudé à la partie dorsale du putamen qui s'étendent à travers la capsule interne, leur donnant un aspect rayé quand on les examine sur une coupe sagittale (VOGT, 1920). Le putamen et le noyau caudé diffèrent du point de vue de leurs afférences comme nous l'avons vu précédemment, mais également du point de vue fonctionnel : le putamen recevant et intégrant des informations des aires motrices et sensorielles, et le noyau caudé, des informations des aires associatives. Toutefois, ces deux sous-régions du striatum partagent des entrées et sorties communes.

Les analogues de ces régions chez le rongeur seraient le striatum dorsomédian (DMS) et dorsolatéral (DLS) (Goldman-Rakic and Selemon, 1986) (Figure 18).



Les lésions du DMS affectent les réponses dirigées vers la récompense dans des tâches instrumentales et perturbent également les tâches d'apprentissage qui dépendent des informations spatiales, de la mémoire de travail ou de réponse à une récompense contingente (Mitchell et al., 1985; Mitchell and Hall, 1988, p. 198). Les neurones du DMS modulent leurs activités durant les phases précoces d'apprentissage de tâches motrices et lors de changements de la valeur assignée à un stimulus. Suggérant un rôle du DMS dans l'intégration et le stockage des relations stimuli-réponses renforcées, permettant ainsi l'acquisition de nouvelles tâches motrices et l'adaptation aux changements de règle (White, 2009).

Des lésions du DLS chez le rongeur affectent fortement l'acquisition et les performances dans les tâches de séquences motrices et de stimulus-réponse, mais également les réponses habituelles dans les tâches instrumentales. De plus, les neurones du DLS s'activent lors de séquences motrices, et ces activités persistent et s'ajustent en fin d'apprentissage suggérant son rôle important dans la sélection des plans moteurs et la formation d'une mémoire des réponses motrices habituelles (Balleine et al., 2007).

Ventralement au putamen-caudé se trouve le striatum ventral, également appelé le noyau accumbens (NAc), qui joue un rôle central dans les fonctions associatives et limbiques (Goto and Grace, 2008). Le NAc est lui-même subdivisée en deux parties : une partie externe, le NAc Shell et une partie interne, le NAc Core qui diffèrent par leurs projections et leurs fonctions (Heimer et al., 1997). En effet, si toutes régions du NAc reçoivent des proportions d'afférences équivalentes de l'amygdale basolatérale, de la VTA, du noyau gris périaqueducal, les neurones du Core reçoivent des projections corticales plus denses du cortex olfactif, insulaire, prélimbique et infralimbique (Li et al., 2018; Ma et al., 2020). Une étude plus récente a révélé que le NAc Core et la partie latérale du NAc Shell (NAc LShell) possèdent un pattern d'afférences similaires qu'ils ne partagent pas avec la partie médiane du Shell (NAc MShell). En effet le NAc Core et le LShell reçoivent des proportions équivalentes de terminaisons du cortex piriforme, orbitofrontal, des noyaux paraventriculaire, médiodorsal, intermédiodorsal et parafasciculaire du thalamus (Ma et al., 2020). Le LShell reçoit une proportion plus importante de projections du cortex insulaire, gustatif, ectorhinal, perihinal, moteur, somatosensoriel mais également des parties dorsales du striatum. Enfin, le MShell reçoit majoritairement les projections des régions temporales et hippocampales dont le subiculum, le cortex entorhinal et la partie CA1 et CA3 de l'hippocampe. Le MShell reçoit également les projections du septum latéral, du noyau central, médial et basomédial de l'amygdale. L'hypothalamus, surtout sa partie latérale projette spécifiquement sur le MShell (Ma et al., 2020). Fonctionnellement, le NAc core jouerait un rôle important dans l'initiation des comportements orientés vers des stimuli motivationnels pertinents, les apprentissages Pavlovien et instrumentaux, et de manière plus

générale dans la sélection des comportements basés sur les informations associées à la récompense (identité, valeur) (Ito et al., 2004). Le NAc shell encoderait, quant à lui, la valeur d'un stimulus (ou d'une récompense) car des lésions du shell n'affectent pas l'acquisition d'une tâche associative, mais altèrent la préférence pour des récompenses plus importante en quantité (Saddoris, 2013).

C. Les neurones épineux moyens du striatum et leurs rôles dans les réponses aux drogues

1. Les neurones épineux moyens (MSN)

Les neurones épineux de taille moyenne (MSN) représentent autour de 95% des neurones du striatum de la souris, et environ 75 millions sur 100 millions de neurones striataux chez l'homme. Ce sont les seuls neurones qui projettent vers des cibles extra-striatales d'où leur nom alternatif de neurones striataux de projection (SPN). Ils utilisent le GABA comme principal neurotransmetteur. Ils sont caractérisés par un soma de taille moyenne (10-20 μm) et une forte densité en épines dendritiques sur la tête desquelles projettent les terminaisons glutamatergiques issues des aires corticales, du thalamus, de l'amygdale et de l'hippocampe (Bolam et al., 2000). L'efficacité de la transmission à ces synapses glutamatergiques est modulée par les afférences dopaminergiques qui convergent également sur les épines dendritiques des MSN (Doig et al., 2010, p. 20; Moss and Bolam, 2008). Comme les afférences cortico-striatales glutamatergiques forment des synapses asymétriques avec la tête des épines dendritiques des neurones épineux, on observe fréquemment un complexe synaptique tripartite formé par une épine dendritique GABAergique, une synapse asymétrique glutamatergique et une synapse symétrique dopaminergique. Ainsi, les terminaisons dopaminergiques et glutamatergiques convergent au niveau de la même épine dendritique (David Smith and Paul Bolam, 1990) (Figure 19).

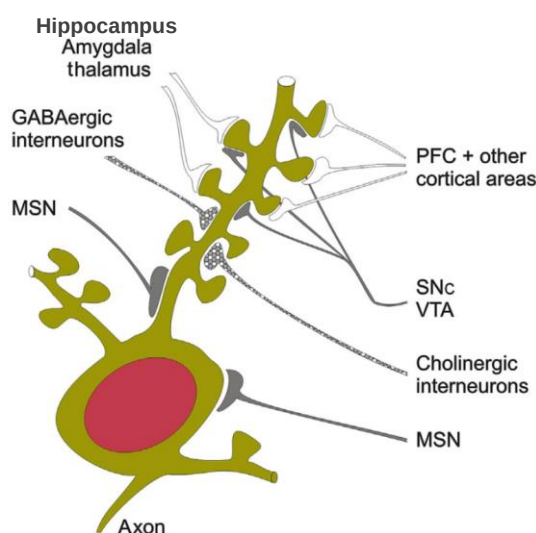


Figure 19: Convergence des afférences glutamatergiques et dopaminergiques sur les MSN. Les entrées excitatrices du cortex, de l'hippocampe, du thalamus et l'amygdale arrivent sur les épines des MSN. Les afférences dopaminergiques des neurones SNc / VTA projettent sur les cous des épines et les prolongements dendritiques. Les afférences des interneurons cholinergique et GABAergiques, ainsi que les collatérales issues d'autres MSN, contactent les dendrites au niveau proximal. D'après Steiner et Tseng 2017.

Les MSN sont principalement subdivisés en deux populations sur la base de critères neurochimiques comme l'expression de neuropeptides et de différents sous-types de récepteurs de la dopamine ou de l'adénosine, mais également des projections distinctes. Les dMSN expriment le récepteur D1 de la dopamine (D1R), la substance P, muscarinique M4 (M4R) de l'acétylcholine et la dynorphine. Les iMSN expriment préférentiellement le récepteur D2 de la dopamine (D2R), A2A (A2AR) de l'adénosine, muscarinique M1 (M1R) de l'acétylcholine et l'enképhaline. Toutefois, il existe une population de MSN qui coexpriment les D1R et D2R dont la proportion exacte dépend de la méthode d'analyse. On estime que ces MSN représenteraient 17% des neurones du NAcc shell

et 5% des neurones du NAcc core de la souris (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gangarossa et al., 2013). L'ensemble des MSN expriment également les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et les récepteurs ionotropiques au glutamate.

De manière générale, chez des souris adultes (14-20 semaines), les D1R-MSN sont plus excitables que les D2R-MSN. En effet, leur potentiel de membrane est plus dépolarisé, et en réponse à des stimulations, ils génèrent plus de potentiels d'actions (Deroche et al., 2020). L'inverse est observé chez des souris plus jeunes (1-10 semaines), où ce sont les D2R-MSN qui sont plus excitables (Cao et al., 2018a; Gertler et al., 2008; Kreitzer and Malenka, 2007). De manière intéressante, ces différences entre les deux types cellulaires sont plus prononcées chez les souris mâles par rapport aux souris femelles (Cao et al., 2018b, p. 20). Il a été montré que chez des animaux anesthésiés, les MSN présentent un potentiel de membrane bistable caractérisé par un état hyperpolarisé (down state) interrompu de manière périodique par des plateaux de dépolarisation (up state) induit par l'activation des afférences excitatrices et associé à la génération de potentiels d'actions (O'Donnell et al., 1999; Stern et al., 1998; Wilson and Kawaguchi, 1996). L'activation des D1R induit une hyperpolarisation quand la cellule est dans le « down state », mais permet une dépolarisation quand les MSN sont dans le « up state » (Hernández-López et al., 1997; Nisenbaum et al., 1998). L'inverse a été observé lors de l'activation des D2R (Hernández-López et al., 2000; Nicola et al., 2000). La dopamine augmente l'excitabilité des D1R-MSN alors qu'elle diminue celle des D2R-MSN (Cepeda et al., 2008). Au niveau morphologique, les D1R-MSN possèdent des dendrites plus longues et plus ramifiées (Gertler et al., 2008).

2. Autres types neuronaux du striatum

Mes travaux de recherche ayant été principalement ciblés sur l'étude des adaptations cellulaires et moléculaires induites par la cocaïne dans la population neuronale principale du striatum composé par les MSN, je ne mentionnerai que brièvement les autres types neuronaux par souci de concision.

a) Les interneurones

Les interneurones striataux constituent 20% de la population neuronale du striatum chez les primates et seulement 2-3% chez les rongeurs (Tepper and Bolam, 2004). Malgré cette faible proportion, ils exercent un rôle important dans la modulation du circuit striatal au niveau présynaptique et post-synaptique. Les interneurones striataux sont distinguables par leur morphologie et l'expression de différents neuropeptides ou protéines (Kawaguchi et al., 1995). On distingue principalement : les interneurones géants cholinergiques (CIN) caractérisés par un grand corps cellulaire, l'expression simultanée des D5R et D2R et une activité tonique, et les interneurones gabaergiques où l'on distingue les interneurones somatostatine – neuropeptide Y - oxyde nitrique synthase - positives (NPY), les interneurones exprimant la parvalbumine (PV) et les interneurones exprimant la calretinine (Tepper et al., 2018; Tepper and Bolam, 2004). Les trois interneurones GABAergiques produisent un puissant potentiel post-synaptique inhibiteur sur les MSNs, dont la fonction serait d'influencer précisément le timing de l'émission des potentiels d'action d'un ou d'un ensemble de MSNs. Le rôle des interneurones cholinergiques serait de moduler le seuil d'excitabilité des MSNs en réponse aux influx corticaux ou thalamiques, en particulier dans les activités relatives à la récompense (Morris et al., 2004). Ces interneurones jouent un rôle clé dans les fonctions intégratives du striatum, mais leurs rôles dans les réponses aux drogues d'abus restent encore mal connus.

3. Rôles des D1R-MSN et D2R-MSN dans les réponses aux psychostimulants

Grâce aux approches cellules-spécifiques, des avancées considérables ont été réalisées dans la compréhension des rôles spécifiques des différents types cellulaires du striatum et des différents récepteurs qu'ils expriment (Salery et al., 2019; Valjent et al., 2009). En effet, nous avons assisté

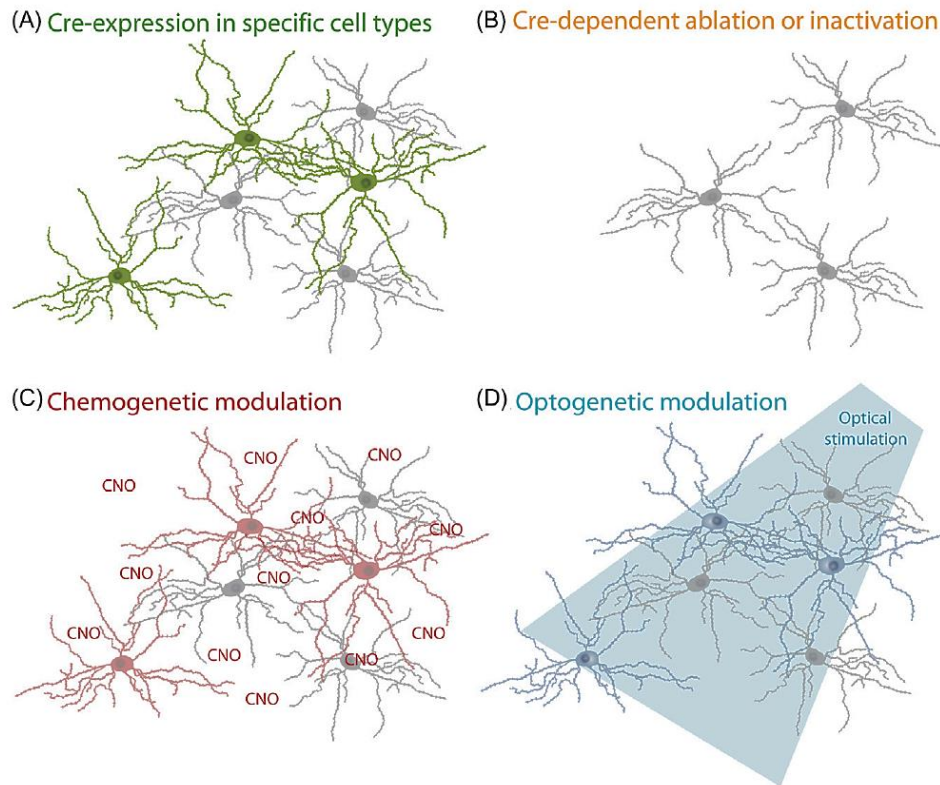


Figure 20 : Illustration de techniques cellulaires-spécifiques de manipulation de l'activité des neurones. (A) Expression de la Cre-recombinase (cellules vertes) dans une structure hétérogène. (B) Ablation ou inactivation des neurones exprimant la Cre-recombinase. (C) Manipulation chimogénétique des neurones exprimant la Cre-recombinase. (D) Modulation optogénétique des neurones exprimant la Cre-recombinase. D'après Steiner et Tseng 2017.

ces dernières années au développement de lignées de souris exprimant, soit des protéines fluorescentes dans des populations ciblées, soit la cre-recombinase sous le contrôle de promoteurs cellules-spécifiques combiné aux techniques d'ablation cellulaire, de KO conditionnel, d'optogénétique, de chimogénétique et les techniques pour perturber des interactions protéines-protéines dans des populations neuronales d'intérêt (Figure 20) (Salery et al., 2019).

Ces avancées ont notamment permis de mieux comprendre les rôles respectifs des D1R-MSN et D2R-MSN dans les apprentissages liés à la récompense, mais aussi dans les différentes phases de l'addiction.

L'ablation sélective des D2R-MSN à l'aide de la toxine diphtérique, en faisant exprimer de manière inductible le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur du A2AR, augmente l'activité locomotrice basale ainsi que le développement et le maintien de la préférence de place conditionnée (CPP) à l'amphétamine (Durieux et al., 2009).

De manière similaire, leur inhibition par des approches chimogénétiques augmente l'acquisition et l'expression de la sensibilisation locomotrice à l'amphétamine (Ferguson et al., 2011a).

À l'inverse, il a été montré que l'activation des D2R-MSN du NAc par optogénétique pendant les injections de cocaïne ne bloque pas le développement de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne. Toutefois, chez des souris sensibilisées à la cocaïne, l'activation des D2R-MSN pendant le sevrage inhibe l'expression de la sensibilisation locomotrice (Song et al., 2014). En revanche, l'activation par chimogénétique des D2R-MSN, dans l'ensemble du striatum, bloque le développement et l'expression de la sensibilisation locomotrice en réponse à l'amphétamine (Farrell et al., 2013a).

Concernant le rôle des deux sous-types de MSN dans les propriétés renforçantes des psychostimulants, il a été montré que l'activation par optogénétique des D2R-MSN diminue la CPP induite par la cocaïne (Lobo et al., 2010a). À l'inverse, l'activation optogénétique ou chémogénétique des D1R-MSN du NAc augmente la CPP à la cocaïne (Calipari et al., 2016; Lobo et al., 2010a).

Il est possible de bloquer le relargage de neurotransmetteurs dans un type cellulaire d'intérêt grâce à l'expression spécifique de la chaîne légère de la toxine tétanique (Hikida et al., 2010). Le blocage de la neurotransmission dans les D1R-MSN du striatum entier inhibe les réponses locomotrices aiguës, la sensibilisation locomotrice et la CPP induite par la cocaïne ou la nourriture, mais n'affecte pas l'aversion dans la tâche d'évitement passif. La même manipulation effectuée dans les D2R-MSN retarde le développement de la sensibilisation locomotrice, mais n'a pas d'effet sur la CPP induite par la cocaïne ou la nourriture. En revanche, le blocage des D2R-MSN atténue l'aversion dans la tâche d'évitement passif. Dans les deux populations, l'inhibition de la transmission durant 33 jours d'abstinence n'a aucun effet sur le maintien de la sensibilisation locomotrice (Hikida et al., 2010). En ce qui concerne les comportements de type opérants, à la suite de la phase d'acquisition de l'auto-administration à la cocaïne, une augmentation des ratio AMPAR/NMDAR, utilisé comme un index de l'efficacité de la transmission glutamatergique sur les MSN, a été observée dans les D1R-MSN mais pas les D2R-MSNs. De manière intéressante, une augmentation du ratio AMPAR/NMDAR dans les D2R-MSNs des souris a été observée spécifiquement dans le cas de souris ayant une faible motivation et une faible persévérance à s'auto-administrer la cocaïne. En accord avec ceci, l'inhibition des D2R-MSNs du NAc, mais pas du striatum dorsal, par chémogénétique, augmente la motivation pour obtenir de la cocaïne mais pas pour la nourriture. À l'inverse, leur activation optogénétique diminue l'auto-administration à la cocaïne (Bock et al., 2013).

L'inhibition chémogénétique des D1R-MSN du DMS n'a, quant à elle, pas d'effet sur l'acquisition de l'auto-administration à la cocaïne, ni sur la recherche compulsive de drogue. En revanche, il a été montré que l'inactivation des D1R-MSN par chémogénétique diminue la recherche compulsive de drogue induite par l'indice associé à la cocaïne, un effet qui n'est pas retrouvé pour la nourriture (Yager et al., 2019).

Des études plus récentes ont non seulement étudié les rôles spécifiques des deux sous-populations de MSN dans les différents aspects et phases des réponses aux drogues d'abus, mais également le rôle de certaines de leurs projections. En effet, l'inhibition par chémogénétique des projections des D1R-MSN du NAc core vers le VP, et pas celles ciblant la SNr, diminue la recherche compulsive de drogue induite par l'indice associé à la cocaïne (Pardo-Garcia et al., 2019). Une autre étude s'est intéressée au rôle des collatérales inhibitrices formées par les D2R-MSN projetant sur les D1R-MSN. Cette étude a révélé que la cocaïne diminue l'efficacité des collatérales des D2R-MSN vers les D1R-MSN, favorisant l'activité des D1R-MSN et la réponse locomotrice aiguë. Ce travail illustre donc un mécanisme original par lequel les D2R-MSN pourraient participer aux effets hyperlocomoteurs de la cocaïne (Dobbs et al., 2016).

La cocaïne altère également différemment la transmission glutamatergique issue de projections distinctes convergeant sur les D1R ou D2R-MSN. En effet, une étude a montré que la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne était associée à une augmentation de la transmission glutamatergique des afférences corticales projetant sur les D1R-MSN sélectivement. La dépotentialisation de ces synapses, induite par des stimulations optogénétique à basse fréquence, a permis d'établir un lien causal entre la plasticité induite par la cocaïne à ces synapses, et la sensibilisation comportementale (Pascoli et al., 2012).

Le même groupe a montré que des souris ayant appris à s'auto-administrer de la cocaïne présentent, après le sevrage, une augmentation des ratio AMPA/NMDA (A/N) au niveau des afférences glutamatergiques sur les D1R-MSN provenant de l'hippocampe ventral, mais pas de celles provenant de l'amygdale. En revanche, une diminution des ratio A/N est observée au niveau des afférences du PFC qui associée à une augmentation de l'indice de rectification de la courbe courant-voltage ce qui suggère une augmentation des AMPAR perméables au calcium au niveau de ces synapses. La dépotentialisation optogénétique grâce à des stimulation à 1Hz des afférences hippocampiques sur les D1R-MSN, diminue le nombre d'appui des souris sur le levier actif suite à la présentation de l'indice associé à la cocaïne après un sevrage, ce qui suggère une diminution de la vigueur de la réponse pour obtenir la cocaïne. Des stimulations à 13Hz de ces afférences augmentent le nombre d'appui des souris sur les leviers et diminuent la discrimination entre les leviers actifs et inactif lors de la présentation de l'indice associé à la cocaïne après le sevrage, ce qui suggère une altération de la discrimination entre action et résultats. D'autres part, La dépotentialisation optogénétique grâce à des stimulation à 1Hz des afférences du PFC sur les D1R-MSN n'a pas d'effet, mais à 13Hz, celle-ci induit une forte diminution du nombre d'appui sur les leviers par les souris lors de la présentation de l'indice associé à la cocaïne après le sevrage ce qui suggère une diminution du comportement de recherche de la drogue (Pascoli et al., 2014b.) Cette étude pionnière montre que la plasticité d'afférences glutamatergiques spécifiques sur les D1R-MSN du NAc participent à différentes composantes des réponses comportementales induites par cocaïne.

Ce groupe a aussi montré qu'une certaine proportion de souris qui ont appris à stimuler par optogénétique les neurones dopaminergiques de la VTA continuent de se stimuler de manière compulsive, même lorsqu'elles sont soumises à un choc électrique concomitant à l'auto-administration. De manière intéressante, ces animaux résistants à la punition présentent une potentialisation des afférences du cortex orbitofrontal sur les D1R-MSN du striatum dorsal. La dépotentialisation optogénétique de ces afférences diminue la fraction d'animaux qui se stimulent de manière compulsive (Pascoli et al., 2018). Ces études pionnières démontrent une relation causale entre les perturbations de la plasticité glutamatergique et les altérations comportementales à long termes induites par la cocaïne.

L'ensemble de ces études a donc permis de préciser les rôles distincts des deux sous-populations de MSN dans les différentes phases des réponses comportementales induites par les psychostimulants. Ces travaux ont également mis en évidence que la modulation, par la DA, des afférences glutamatergiques convergeant sur les MSN est primordiale pour l'établissement des altérations comportementales induites par les psychostimulants. Ainsi, il est important d'identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'intégration des signaux dopaminergiques et glutamatergiques dans ces deux sous-populations de MSN, car cette démarche pourrait potentiellement conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, non seulement dans le contexte de l'addiction, mais également pour d'autres maladies psychiatriques associées à un déséquilibre des transmissions dopaminergique et glutamatergique. Dans cette perspective, le chapitre suivant sera consacré à un rappel des caractéristiques et fonctions des récepteurs de la DA et du glutamate exprimé par les MSN et à leur rôle dans les réponses aux drogues d'abus.

Tableau 5 : Manipulations cellules-spécifiques et conséquences comportementales (modifié d'après Salery et al. 2020)

Modèle	Droque	Manipulation cellule- spécifique	Paradigme comportemental	Conséquences comportementales	Références
Souris	Amphétamine (Amphét).	Ablation des D2R-MSN dans le NAc avec la toxine diphtérique (DTR) Souris Adora2a-cre x DTR inducible Injection de toxine diphtérique dans le NAc	CPP (1, 3 et 5 mg/kg) + sevrage 9J	▪ <u>Ablation des D2R-MSN</u> : ↑ développement et maintien de la CPP	Durieux et al. 2009
Souris	Cocaïne / Méthamphétamine (Méth).	Inhibition inducible de la neurotransmission des D1R-MSN ou D2R-MSN TRE- Toxine-tétanique (TN) Injections d'AAV transportant le transgène tTA sous les promoteurs enkephalin (D2R-MSN) ou substance P (D1R-MSN).	Injection (Inj) aigue (cocaïne : 10mg/kg, méth: 2mg/kg) Sensibilisation locomotrice / CPP (cocaïne 10mg/kg)	▪ <u>Inhibition des D1R-MSN ou des D2R-MSN</u> (striatum entier) : ↓ hyperlocomotion induite par la méthamphétamine ▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u> (striatum entier) : ↓ hyperlocomotion induite par la cocaïne ▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u> : ↓ sensibilisation et CPP ▪ <u>Inhibition des D2R-MSN</u> : - retards de sensibilisation - absence d'effet sur la CPP	Hikida et al. 2010
Souris	Cocaïne	Activation optogénétique des MSN du NAc: HSV-ChR2 ou AAV-DIO-ChR2 dans les souris <i>drd1a-cre</i> et <i>drd2-cre</i> Lumière bleue (10 Hz; délivrées pendant quatre périodes de 3 minutes pendant les 30 minutes de conditionnement)	CPP (5 mg/kg) CPP (7mg/kg)	▪ <u>Activation des D1R-MSN</u> pendant le conditionnement : ↑CPP ▪ <u>Activation de tous les MSN</u> pendant le conditionnement : ↑CPP ▪ <u>Activation des D2R-MSN</u> pendant le conditionnement : '↓CPP'	Lobo et al. 2010
Rat	Amphét.	Inhibition chimogénétique de chaque population de MSN dans le striatum dorsal HSV-pENK-hM4D ou HSV-pDyn-hM4D CNO 1mg/kg	Sensibilisation locomotrice (2mg/kg ; 0,5 mg/kg)	▪ <u>Inhibition des D2R-MSN</u> : ↑ sensibilisation et son expression après un sevrage et challenge d'amphét sans CNO ▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u> : ↓ sensibilisation et inhibition de son expression après un sevrage et challenge d'amphét sans CNO	Ferguson et al. 2011
Souris	Cocaïne	Dépotentialisation optogénétique des projections du PFC infralimbique de sur le Nac shell AAV1-CAG-ChR2 dans le PFC infralimbique des souris <i>drd1a-tdTomato</i> - Fibres optique dans le NAc core (impulsions lumineuses de 4 ms à 1 Hz pendant 10 min)	Inj. chroniques (15mg/kg)	▪ <u>Dépotentialisation des projections infralimbiques du PFC sur le NAc core</u> : - Inhibition de l'expression de la sensibilisation locomotrice lorsqu'elle est effectuée 45 min avant le test - ↓ expression de la sensibilisation locomotrice lorsqu'elle est effectuée après le sevrage, 45 min avant le test - ↓ expression de la sensibilisation locomotrice lorsqu'elle est effectuée après le retrait, 5 jours avant le test	Pascoli et al. 2012
Souris	Cocaïne	Manipulation optogénétique/chémogénétique des D2R-MSN du NAc Souris Adora2a-cre AAV-hSyn-DIO-hM4Di ou AAV5-EF1a-DIO-CHR2 CNO 1mg/kg Impulsions lumineuses 16 Hz pendant 5 minutes toutes les 10 minutes	Auto-administration (AD) Intraveineuse (IV, 1-2mg/kg par perfusion)	▪ <u>Inhibition chémogénétique des D2R-MSN</u> : augmente la motivation à s'auto-administrer de la cocaïne ▪ <u>Activation optogénétique de D2R-MSN</u> : inhibe l'AD de cocaïne	Bock et al. 2013
Souris	Cocaïne	Inhibition optogénétique des D1R-MSN du NAc: AAV-DIO-eNpHR3.0 dans les <i>drd1a-cre</i> - fibres optiques dans le NAc (lumière verte 30s toutes les minutes pendant 60 minutes, 3 mW)	Sensibilisation locomotrice (10mg/kg)	<u>Inhibition des D1R-MSN</u> : ↓ sensibilisation locomotrice	Chandra et al. 2013
Souris	Amphét.	Activation chémogénétique des D2R-MSN dans l'ensemble du striatum <i>adora2a-rM3Ds</i> CNO 1mg/kg	Sensibilisation locomotrice (2mg/kg)	▪ <u>Activation D2R-MSN</u> : - ↓ Activité locomotrice - ↓ Sensibilisation - ↓ expression de la sensibilisation après un sevrage et challenge d'amphét sans CNO	Farrell et al. 2013

Souris	Cocaïne	Dépotentialisation optogénétique des projections de l'hippocampe ventral ou infralimbique sur le Nac shell AAV1-CAG-ChR2 dans le PFC infralimbique ou hippocampe ventral, fibres optiques dans la coquille Nac des souris <i>drd1a</i> -tdTomato Impulsions légères 4 ms à 1 Hz ou 13 Hz pendant 10 min	AD (0.75mg/kg/inf)	IV	▪ <u>Dépotentialisation des projections de l'hippocampe ventral sur les D1R-MSN du Nac shell</u>: - (1Hz) ↓ la vigueur des réponses pour obtenir la cocaïne - (13Hz) altération de la discrimination entre action et résultats ↑ du comportement de recherche de cocaïne ▪ <u>Dépotentialisation des projections de l'hippocampe ventral sur les D1R-MSN du Nac shell</u>: - (1Hz) pas d'effet - (13Hz) ↓ du comportement de recherche de cocaïne	Pascoli et al. 2014
Souris	Cocaïne	Activation optogénétique des D2R-MSN dans le NAc AAV-EF1a-DIO-hChR2 en <i>drd2-cre</i> - fibres optiques dans le NAc (impulsions légères à 20 Hz, 5 ms ; 2-5 mW pour 4 période de 3 min durant des sessions de 40 min)	Sensibilisation locomotrice (15mg/kg)		▪ <u>Activation des D2R-MSN</u>: - ↓ Activité locomotrice spontanée - ↓ expression de la sensibilisation locomotrice lorsque la stimulation est appliquée pendant la période de sevrage	Song et al 2014
Souris	Cocaïne	Inhibition chémogénétique des D1R-MSN dans NAc core AAV-hSyn-DIO-hm4Di dans les souris <i>drd1a-cre</i> et <i>drd2-cre</i> CNO 5mg/kg	CPP (5 mg/kg)		▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u> pendant le conditionnement : ↓ CPP ▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u> pendant le test : ↓ CPP ▪ <u>Inhibition des D2R-MSN</u> pendant le test : pas d'effet	Calipari et al. 2016
Souris	Cocaïne	Inhibition chémogénétique des D2R-MSN du NAc core chez les souris D2R-MSN- <i>drd2</i> -KO <i>adora2a-cre</i> x <i>drd2^{lox/lox}</i> (D2R-MSN-Drd2KO) AAV5-hSyn-DIO-hM4Di dans le noyau NAc	Inj. aigue (15mg/kg)		▪ <u>Inhibition des D2R-MSN</u>: restaure la réponse locomotrice aigue chez les souris D2R-MSN-<i>drd2</i>-KO	Dobbs et al. 2016
Souris	-	Auto-stimulation optogénétique des neurones DA de la VTA (oDASS) (impulsions lumineuses bleues ou oranges de 1sec à 1 Hz pendant 15 sec) Souris DAT-cre; AAV5-EF1a-DIO-ChR2 ou AAV8-hSyn-Flex-ChrimsonR dans la VTA DAT-cre x <i>Drd1a</i> -Tomato AAV8-hSyn-ChrimsonR-tdTomato, AAV8-hSyn-Chrimson-GFP, AAV5-CamKII-eArchT3.0-eYFP, ou AAV-DJ-CamKII-GCaMP6m bilatéralement dans le cortex orbitofrontal (OFC) Impulsions légères : 20 Hz pour 1 min pour la potentialisation ou 1 Hz pendant 5 min pour la dépotentialisation	VTA DA Neurones auto-stimulation		▪ <u>oDASS</u>: - induit une auto-stimulation compulsive dans un sous-ensemble de souris (souris persévérantes), qui continuent à se stimuler malgré des chocs électriques - induit une potentialisation synaptique sélective dans les D1R-MSN dans le NAc chez tous les animaux - induit la potentialisation des synapses de l'OFC vers le striatum sur les D2R- et les D1R-MSN uniquement chez les souris persévérantes ▪ <u>Potentialisation induite par une stimulation optogénétique des synapses OFC-striatum</u> : augmente la proportion de souris persévérantes ▪ <u>Dépotentialisation induite par l'optogénétique des synapses OFC-striatum</u> combinée à l'administration d'un antagoniste D1R : diminue l'auto-stimulation chez les souris persévérantes, qui se maintient au fil du temps	Pascoli et. 2018
Rat	Cocaïne	Inhibition chémogénétique des D1R-MSN dans le NAc <i>drd1a</i> -iCre rats transgéniques AAV2-hSyn-DIO-hM4Di dans le NAc core CNO 10 mg/kg i.p. ou 1nmol intracérébral	AD IV (0.5mg/kg/inf)		▪ <u>Inhibition des D1R-MSN par l'administration de CNO</u>: - ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne ▪ <u>Inhibition des D1R-MSN par CNO local dans le pallidum ventral</u>: - ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne	Pardo-Garcia et al. 2019
Rat	Cocaïne	Inhibition chémogénétique des D1R-MSN dans le striatum dorsomédian CAV2-Cre dans la substance noire - AAV-DIO-hM4Di dans le striatum CNO 5 mg/kg	AD IV (0.4mg/kg/inf)		▪ <u>Inhibition des D1R-MSN</u>: ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne mais pas la saccharose	Yager et al. 2019

4. Les récepteurs de la dopamine et leur implication dans les réponses à la cocaïne.

Dans le SNC, la dopamine module l'excitabilité neuronale en régulant des canaux ioniques ligand et voltage-dépendants. Jusqu'à présent, cinq sous-types distincts de récepteurs DA (DAR) ont été isolés et caractérisés sur la base des travaux pharmacologiques effectués à la fin des années 1970 par Seeman, Spano et ses collègues ainsi que Kebabian et Calne (Kebabian and Calne, 1979; Seeman et al., 1975; Spano et al., 1978). Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) et ont été divisés en deux sous-familles, les récepteurs de type « D1-like » et « D2-like », sur la base de leur interaction avec les protéines G et des voies de signalisation déclenchées suite à leur activation. Ils présentent également des distributions anatomiques et cellulaires propres (Figure 21). Des différences sont

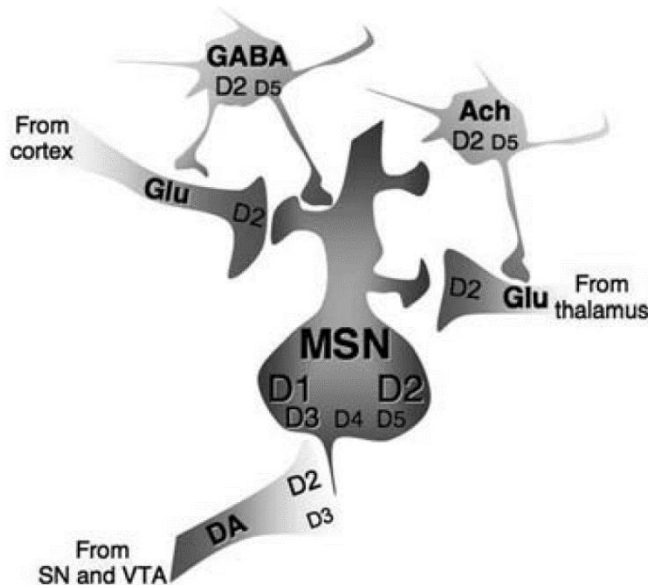


Figure 21 : Illustration des sites d'expression des récepteurs de la dopamine dans le striatum.

Les D1R et D2R sont fortement exprimés par les MSN, suivis des D3R, puis des D4R et D5R (la taille de la police est indicative du niveau d'expression). Les D2R ont un profil d'expression très complexe. En effet, ils sont présents sur les MSN, mais aussi présynaptiquement sur les fibres dopaminergiques, ainsi que sur les terminaisons corticales, thalamiques et celles des interneurones. Les D3R sont à la fois pré- et post-synaptique ; l'expression des D1R, D4R et D5R est telle qu'indiquée. D'après Tirota et al 2010.

également retrouvées entre les différents sous-types de récepteurs au sein d'une même famille. Cependant, des agonistes et antagonistes sélectifs de l'ensemble des membres de ces familles n'ont pas encore été découverts rendant leurs études problématiques par des approches pharmacologiques.

Nous allons brièvement explorer la diversité de ces récepteurs en illustrant leurs rôles dans les réponses à la cocaïne.

a) Les récepteurs de la dopamine de type D1

Classiquement, la sous-famille des récepteurs de la DA de type D1 se compose de deux membres nommés D1A et D1B chez les rongeurs et D1 (D1R) et D5 (D5R) chez les primates. Nous adopterons la nomenclature standard des primates. Ces récepteurs sont couplés à une protéine $G\alpha_s$ (ou $G\alpha_{olf}$ dans le striatum) qui stimule l'enzyme adénylyl cyclase (AC) (Corvol et al., 2001; Hervé et al., 2001). La protéine G est une protéine hétérotrimérique composée de sous-unités α , β et γ distinctes. Après liaison de la dopamine à son récepteur, la sous-unité α se dissocie de l'hétérodimère β/γ , permettant l'interaction de la protéine G avec l'AC qui convertit l'ATP en cAMP, un second messenger important du SNC. L'AMPc ainsi produit se lie et active la protéine kinase A (PKA). La PKA est formée de quatre sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. Dans cet état elles sont inactives. L'AMPc en se liant aux sous-unités régulatrices, dissocie et libère les sous-unités catalytiques qui deviennent actives et vont phosphoryler leur protéines cibles parmi lesquelles on compte, les NMDAR et AMPAR (Esteban et al., 2003; Waltereit and Weller, 2003).

Le D1R s'exprime dans toutes les régions du circuit de la récompense qui reçoivent des afférences dopaminergiques, c'est-à-dire le cortex préfrontal, cingulaire et piriforme, l'hippocampe, l'amygdale et le thalamus, le tubercule olfactif et bien sûr dans le striatum. Au niveau cellulaire, le D1R se trouve principalement dans les régions pérисynaptiques/extrasynaptiques du cou des épines dendritiques (Huang et al., 1992; Smiley et al., 1994). Toutefois, le D1R est très mobile, il se déplace par diffusion latérale (Ladepeche et al., 2013; Scott et al., 2006) et peut être retrouvé dans la densité postsynaptique (Fiorentini et al., 2003b; Ladepeche et al., 2013). Les D1R sont principalement exprimés par les MSN de la voie directe (Gerfen et al., 1990), mais une faible proportion de MSN co-expriment les D1R et D2R (Bertran-Gonzalez et al., 2008).

Le D1R a été largement étudié dans le contexte de l'exposition aux drogues. Une injection aiguë de cocaïne n'augmente pas les niveaux de protéine D1R dans le CPu (W.-L. Sun et al., 2009).

De manière intéressante, l'augmentation de l'activité locomotrice, ainsi que l'apparition de stéréotypies en réponse à une injection aiguë de cocaïne, ne sont pas observées chez une souris KO constitutive pour D1R (Xu et al., 1994). Ces animaux sont également incapables de développer une sensibilisation locomotrice après administration répétée de cocaïne (Xu et al., 2000). Étonnamment, les souris D1R KO sont tout de même capables de développer une CPP induite par la cocaïne (Miner et al., 1995). De manière surprenante, les D1R KO développent une auto-administration normale à la nourriture mais pas à la cocaïne (S. B. Caine et al., 2007). La contribution du D1R à l'auto-administration semble donc être fonction de la nature de la récompense.

Quant à l'effet du blocage pharmacologique du D1R, des études rapportent que le SCH 23390 bloque l'effet aigu et de la sensibilisation locomotrice à la méthamphétamine (Kuribara, 1995), et inhibe la CPP à l'amphétamine mais pas à la cocaïne (Liao et al., 1998). Une autre étude a également rapporté une absence d'effet du blocage des D1R sur la CPP induite par la cocaïne (Adams et al., 2001). Une étude plus récente montre néanmoins que le SCH 23390 bloque le développement de la CPP à la cocaïne chez le rat (Gu et al., 2020). Concernant le conditionnement opérant, un prétraitement avec un antagoniste D1R augmente l'auto-administration à la cocaïne (Corrigall and Coen, 1991; Koob et al., 1987). D'autre part, la stimulation du D1R atténue le comportement de recherche de drogue induite par une injection de cocaïne dans le paradigme d'auto-administration (Self et al., 1996). Toutefois, ce même comportement est également bloqué par un antagoniste D1R (Koob et al., 1996).

Les D1R et D5R ont des séquences très similaires et activent des voies de signalisation communes dont la production d'AMPc et l'activation de la PKA. Cependant, le D5R a plus d'affinité pour la DA que le D1R, et est exprimé dans le PFC, le cortex pariétal, l'hippocampe, le cervelet et le striatum (Ariano et al., 1997), mais également au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la VTA et de la SNc (Khan et al., 2000).

Il a été établi que les souris KO D5R présentent une diminution de la réponse aiguë à la cocaïne (Elliot et al., 2003). Une autre étude a montré que la cocaïne augmente les courants dépendants des récepteurs glutamatergiques de type NMDA dans la VTA via la stimulation des D5R (Schilström et al., 2006). Toutefois, le rôle de ces récepteurs dans les réponses à long terme aux drogues d'abus reste encore mal connu.

b) Les récepteurs de la dopamine de type D2

Les récepteurs D2, D3 et D4 forment la sous famille des récepteurs de la DA de type D2. Ces récepteurs sont couplés à une protéine Gi/o inhibitrice (Felder et al. 1991). Leur stimulation est donc associée à inhibition de l'AC et de la production d'AMPc en aval. À l'inverse des D1R-like, la stimulation des récepteurs D2R-like conduit, dans la majorité des cas, à inhiber l'activité de canaux

ioniques dont les récepteurs au glutamate (Gardoni and Bellone, 2015; Gerfen and Surmeier, 2011; van Huijstee and Mansvelder, 2015). Ils sont également capables de signaler indépendamment de la protéine G_i en interagissant avec la protéine β -arrestine et en déclenchant l'activation de la voie GPCR kinase GRK2 (Pack et al., 2018). En effet, les β -arrestines, malgré leur implication critique dans la régulation de la désensibilisation et du trafic des GPCR, peuvent être des médiateurs positifs de la signalisation intracellulaire, conduisant à la formation de complexes intracellulaires de molécules de signalisation. En particulier, il a été récemment démontré que les D2R et D3R engagent la voie de signalisation Akt / Glycogen Synthase Kinase 3 par un mécanisme indépendant des protéines G qui implique la β -arrestine 2, Akt et la protéine phosphatase PP2A (Beaulieu et al., 2007, 2005).

Les récepteurs D2 sont fortement exprimés dans le striatum dorsal et ventral, mais aussi dans le bulbe olfactif. Les D2R sont également présents dans les régions corticales telles que le cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur, le cortex entorhinal et les structures limbiques comme l'amygdale et l'hippocampe. De plus, ils ont été détectés dans la substance noire et la VTA dans les neurones dopaminergiques (Bouthenet et al., 1991), mais également sur les afférences glutamatergiques du cortex préfrontal (Yamamoto and Davy, 1992). Un épissage alternatif des introns 4 et 5 du gène *drd2* est responsable de l'expression de deux isoformes du D2R : la forme longue et la forme courte, nommée D2L et D2S, respectivement. Le D2S est tronqué de 29 acides aminés dans sa troisième boucle intracellulaire (Dal Toso et al., 1989), une séquence qui jouerait un rôle dans l'adressage du récepteur (Pivonello et al., 2007) puisque le D2S est très majoritairement présynaptique. Il a été suggéré que le D2S, avec sa faible affinité pour DA, pourrait réagir préférentiellement à la libération synaptique de DA (Neve et al., 2019) contrairement au D3R (Sokoloff and Schwartz, 1995). En effet, le D2S est exprimé en présynaptique (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000) où il régule la libération de neurotransmetteurs (Centonze et al., 2002; Wang et al., 2000). Il est à noter que seul l'isoforme D2L est capable d'activer les voies de signalisations β -arrestine et GRK2 (Beaulieu et al., 2007).

Concernant les réponses comportementales induites par les drogues, les souris D2R KO constitutives s'auto-administrent beaucoup plus de cocaïne que les souris sauvages (Caine et al., 2002). En revanche, elles présentent une diminution de la CPP et de l'expression de gènes immédiats précoces (IEG) induite par la cocaïne dans le striatum (Welter et al., 2007). Comme mentionné précédemment, le D2R se trouve à la fois dans les compartiments pré et post-synaptiques. Afin de mieux comprendre la contribution du D2R dans les réponses comportementales, une lignée de souris permettant une délétion du D2R dans les neurones exprimant le DAT a été générée dans le but d'éliminer spécifiquement la population pré-synaptique D2R exprimée par les neurones dopaminergiques. Ces souris montrent une activation locomotrice induite par la cocaïne accrue ainsi qu'un point de rupture plus élevé dans le paradigme d'auto-administration de nourriture en ratio progressif (Bello et al., 2011). D'autres part, la réponse locomotrice aigue, l'induction de c-Fos et d'ERK induite par la cocaïne est inhibée chez les souris KO pour le D2R dans les D2R-MSN (Kharkwal et al., 2016).

De manière intéressante, il a été montré que les interneurones cholinergiques (CIN) expriment le D2R (Le Moine et al., 1990). Les souris KO pour le D2R dans les CIN, présentent une diminution de la locomotion après une exposition aigue, une inhibition de la sensibilisation locomotrice et de la CPP à la cocaïne (Lewis et al., 2020).

Les travaux basés sur des approches pharmacologiques ont montré qu'un prétraitement avec un antagoniste D2R empêche l'acquisition d'une sensibilisation locomotrice induite par deux injections

de cocaïne (Fontana et al., 1993) et l'eticlopride, un autre antagoniste des D2R, bloque le développement de la sensibilisation locomotrice, mais pas de son expression (White, 1998). Un nouvel antagoniste D2R, le L-741626, bloque l'acquisition de la sensibilisation locomotrice (Manvich et al., 2019). D'autre part, le blocage des D2R avec le raclopride bloque l'expression de la CPP à la cocaïne (Adams et al., 2001) et une étude plus récente a également montré que les animaux traités avec un autre antagoniste D2R, le sulpiride, ne présentent pas de CPP pour la cocaïne (Gu et al., 2020).

En accord avec les résultats obtenus avec les souris D2R KO constitutives (Caine et al. 2002), un prétraitement avec l'antagoniste D2R, spiperone, augmente l'auto-administration à la cocaïne (Corrigall and Coen, 1991). D'autre part, la stimulation du D2R facilite le comportement de recherche de drogue induite par une injection de cocaïne dans le paradigme d'auto-administration (Self et al., 1996), et cela même après une période d'extinction (Edwards et al., 2007). Cette hypersensibilité aux drogues lors de traitements aux agonistes des D2R est également retrouvée dans d'autres maladies psychiatriques comme la schizophrénie (Seeman et al., 2005).

Une constatation des études d'imagerie chez l'homme est que les cocaïnomanes montrent une diminution persistante de la liaison de ligands sur les D2R du striatum, associée à diminution d'activité du PFC également observée chez les modèles animaux d'exposition aux drogues (Volkow et al., 2009). Pourquoi les animaux traités à la cocaïne sont-ils fonctionnellement hypersensibles aux agonistes D2R si le traitement à la cocaïne diminue la liaison des agonistes sur les D2R ? Une explication intéressante est soulevée par la constatation que les D2R existent dans deux états d'affinité pour les agonistes D2R : un état d'affinité élevée (D2R-high) et un état de faible affinité (D2R/low), les récepteurs pouvant changer rapidement entre ces deux états. La dopamine se lie principalement au D2R-high, il est donc plus efficace sur le plan fonctionnel (Seeman et al., 2005). D'autre part, de nombreux traitements produisent une hypersensibilité fonctionnelle à la DA (y compris l'administration répétée d'alcool, d'amphétamines et de cocaïne) et induisent une augmentation importante du nombre de D2R-high - mesurée par la fixation d'un radioligand dans le striatum dorsal de rats - sans modifier le nombre total de D2R (Seeman et al., 2007, 2005, 2004). Cette augmentation de la sensibilité des D2R pourrait alors être en lien avec l'augmentation des D2R-high. Le développement de nouveaux ligands permettant de faire la distinction entre les différents états d'affinité du D2R permettra l'observation de ces changements par imagerie chez l'humain et les primates (Subburaju et al., 2018).

De manière intéressante, il a été suggéré que des deux isoformes du D2R générées par épissage alternatif, seule la version courte D2S est présente au niveau pré-synaptique, la version longue D2L n'étant présente qu'au niveau post-synaptique (Centonze et al., 2002; Wang et al., 2000). Ceci est particulièrement intéressant au vu des études menées sur des échantillons post-mortem de sujets ayant un historique d'addiction à la cocaïne. En effet, une de ces études montre que deux polymorphismes mononucléotidiques (PNS) dans les introns du gène DRD2 codant pour le D2R étaient associés à une diminution de l'expression de l'ARNm de D2S. Étonnamment, les allèles contenant ces PNS ont été retrouvés chez 25 % des sujets dépendants à la cocaïne contre 10 % chez les sujets contrôles (Moyer et al., 2011).

Il a également été montré que les souris KO pour le D2L présentent une diminution de la réponse locomotrice aigüe et l'induction de c-Fos induite par la cocaïne (Radl et al., 2018).

Le D3R est caractérisé entre autres par sa grande affinité pour la DA qui est supérieure à celle du D2R. De plus, le D3R n'est exprimé que dans certaines structures clé du circuit de la récompense, notamment la VTA, la SNC, le NAc, les îlots de Calleja et le tubercule olfactif (Bouthenet et al., 1991) où il contribue à l'intégration post-synaptique du signal dopaminergique. Il dispose également de deux isoformes, une longue (D3RL) et une courte (D3RS). La D3RS joue également le rôle

d'autorécepteur sur une faible fraction de neurones dopaminergique (Diaz et al., 1995). De manière intéressante, des études de neuroimagerie suggèrent que les D3R sont augmentés dans la substance noire, le globus pallidus et le pallidum ventral chez les consommateurs de méthamphétamine et de cocaïne (Boileau et al., 2012). Avec ce constat, le D3R est l'une des cibles pharmacologiques les plus étudiées à l'heure actuelle dans les addictions aux psychostimulants (Heidbreder and Newman, 2010). De manière intéressante, les souris D3R KO ont une activité locomotrice basale plus élevée (Karasinska et al., 2005) et présentent une augmentation de l'auto-administration et la CPP à la cocaïne (Kong et al., 2011; Song et al., 2012).

L'intérêt pour le D4R s'est accru considérablement depuis que des études ont rapportés de nombreuses variations du gène humain DRD4 associées à certaines maladies psychiatriques dont l'addiction aux substances, les troubles de déficit de l'attention et les syndromes post-traumatiques (Ptáček et al., 2011; Tol et al., 1992) que nous ne développerons pas. Le D4R existe également sous deux isoformes, la forme longue (D4RL) et la forme courte (D4RS). Le D4R continue de recevoir une attention considérable, car il présente la plus grande affinité pour la clozapine, un des antipsychotiques les plus utilisés en clinique (Seeman and Van Tol, 1994), mais également pour sa distribution car il est principalement exprimé dans le PFC, le cortex pariétal, l'amygdale et l'hippocampe et de manière moins abondant dans le thalamus, le GP et le cervelet avec une très faible expression dans le striatum (Ariano et al., 1997). Sur la base de sa pharmacologie et sa distribution, le D4R a été très étudié dans les tâches de mémoire et d'attention, mais également dans l'addiction. De manière intéressante, les KO D4R ont une locomotion basale diminuée, mais une réponse locomotrice plus élevée en réponse aux psychostimulants (Rubinstein et al., 1997). En revanche, les souris D4R KO s'auto-administrent de la cocaïne ou de la nourriture de manière comparable aux souris contrôles (Thanos et al., 2010). De manière surprenante, l'antagoniste D4R L-745870 bloque la recherche de drogue induite par la nicotine ou l'indice associé à la nicotine après une période d'extinction (Yan et al., 2012). Il serait intéressant de voir si cet effet est valable pour les autres drogues d'abus.

Les récepteurs de la dopamine jouent donc un rôle central dans les adaptations comportementales induites par la cocaïne. Néanmoins, les résultats obtenus grâce aux approches pharmacologiques sont parfois difficiles à interpréter et à concilier car les effets dépendent de la nature des antagonistes (compétitif, non compétitif), de leur mode d'administration (local, IP), de leur spécificité ainsi que du modèle étudié (souris, rat, primate).

5. Les récepteurs du glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus répandu dans le système nerveux central des vertébrés. Ce neurotransmetteur joue un rôle clé dans les réponses à la cocaïne (Figure 22). Lors d'une administration aiguë, les psychostimulants n'entraînent pas directement d'élévation de la libération de glutamate dans les structures des systèmes de récompense (Kalivas, 2004). Mais des expériences de microdialyse ont montrées qu'une injection de cocaïne, après plusieurs semaines de sevrage suivant un traitement chronique, induit une libération de glutamate dans le NAc des rats sensibilisés, tandis qu'elle n'entraîne pas de libération de glutamate chez des animaux naïfs ou non-sensibilisés (Baker et al., 2002; Pierce et al., 1996; Reid et al., 1997; Zhang et al., 2001).

Cette libération accrue de glutamate a lieu malgré le fait que la concentration extracellulaire basale de glutamate soit diminuée durant l'abstinence (Baker et al., 2003; Kozell and Meshul, 2003). L'utilisation d'une sonde biologique sensible au glutamate pour détecter en temps réel sa concentration a permis de confirmer ces résultats. Une libération de glutamate est observée après un traitement chronique à la cocaïne, mais l'administration aiguë de cocaïne ne provoque pas de libération de glutamate dans le striatum (Lee et al., 2008). De manière similaire, une augmentation des niveaux de glutamate a été observée lors de la rechute induit par un indice associé à la cocaïne

après une phase d'extinction à l'auto-administration, un effet qui est inhibé par une inactivation pharmacologique du PFC (McFarland et al., 2003). En accord avec ce résultat, le blocage des récepteurs AMPA dans le NAc bloque la rechute en auto-administration après injection directe de la cocaïne dans le PFC (Park et al., 2002). Ces études montrent que la cocaïne module les niveaux de glutamate et que ces modifications jouent un rôle dans le maintien des altérations comportementales induites par les drogues.

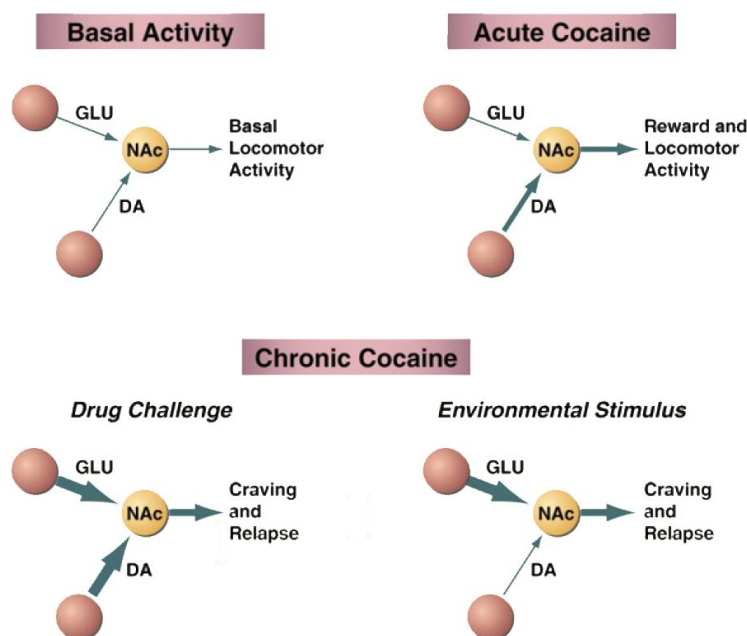


Figure 22 : Implications du glutamate (GLU) et de la dopamine (DA) dans les réponses à la cocaïne.

En condition basale, la libération tonique de la dopamine et du glutamate dans le NAc permet une activité motrice normale. Après une administration aiguë de cocaïne, les niveaux de dopamine du NAc sont élevés, mais pas le glutamate. Cette augmentation stimule l'activité locomotrice et l'effet euphorisant de la drogue. Après une exposition chronique, une seule administration de cocaïne peut provoquer une rechute associée à une augmentation de la libération de dopamine et de glutamate. En l'absence de cocaïne, un indice environnemental associé à la drogue, peut induire le comportement de recherche de drogue et la rechute. Ceci est associé à une forte libération du glutamate avec peu d'implication de la dopamine. D'après Cornish et Kalivas 2001

La transmission des signaux excitateurs à la membrane post-synaptique est assurée par les récepteurs du glutamate, leurs activations induisent une dépolarisation de la membrane du neurone cible. Les récepteurs du glutamate sont pour la plupart des canaux ioniques ligands-sensibles (iGluR) différents par leurs structures et leurs pharmacologies. On compte notamment les récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) et le kainate (KAR). Le glutamate possède également des récepteurs de type métabotrope, les mGluR. L'ensemble de ces récepteurs joue un rôle clé dans la majorité des neurotransmissions excitatrices (~80 %) dans le système nerveux central et jouent des rôles prépondérants dans la plasticité synaptique (Traynelis et al., 2010).

a) NMDAR

Les NMDAR sont des canaux calciques voltage-dépendants (Ca^{2+}) jouant un rôle pivot dans la modulation de la transmission synaptique. Des altérations de leurs fonctions ont été associées à de nombreuses altérations développementales et troubles neurologiques et psychiatriques, y compris la toxicomanie (Lau and Zukin, 2007). Les NMDAR sont exprimés de manière ubiquitaire, ils ont un rôle central dans plusieurs processus physiologiques, notamment la synaptogenèse, la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Ces récepteurs présentent un intérêt majeur pour leur rôle dans la pathogenèse de plusieurs troubles du SNC, y compris l'addiction (Paoletti et al., 2013). Les NMDAR sont des structures hétérotétramériques composées de deux sous-unités obligatoires GluN1 (anciennement dénommées NR1) et de deux sous-unités régulatrices GluN2 (GluN2A-D) et / ou GluN3 (GluN3A-B). Selon la composition des sous-unités, les NMDAR se répartissent en deux catégories principales, les di-hétéromères (GluN1 avec GluN2 identiques) ou les tri-hétéromères,

composés de GluN1 associé à un mélange de sous-unités GluN2 et / ou GluN3 (Paoletti et al., 2013).

Les NMDAR peuvent être localisés dans la densité post-synaptique, mais également dans les sites extrasynaptiques où ils possèdent des fonctions distinctes, voire opposées (Vanhoutte and Bading, 2003). La première particularité des NMDAR, par rapport aux autres iGluR, est structurale. En effet, chaque sous-unité (100-120 kDa) est composée de quatre domaines (Figure 23) :

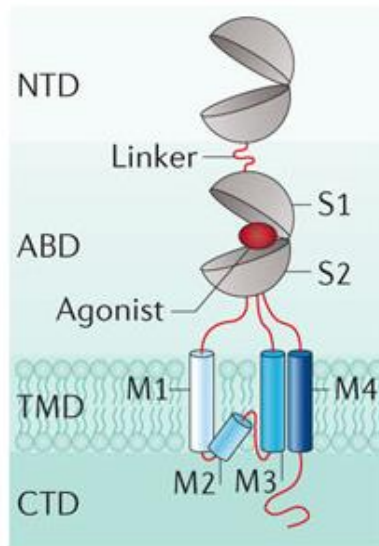


Figure 23 : Structure d'une sous unité NMDAR.

Toutes les sous-unités NMDAR partagent une architecture modulaire composée de quatre domaines distincts : le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'agoniste (ABD) qui se lie à la glycine ou à la D-sérine pour GluN1 et GluN3 et le glutamate pour GluN2, le domaine transmembranaire (TMD) contenant le canal ionique et un domaine intracellulaire C-terminal (CTD).

- Deux larges domaines extracellulaires en forme de coquilles d'huîtres superposés qui représentent la moitié de la masse de la protéine : cette partie N-terminale (NTD) contrôle les propriétés d'ouverture du canal (probabilité d'ouverture, désactivation). Elle est également le site d'action des modulateurs allostériques. Le second étage constitue le domaine de fixation des agonistes (ABD). La fixation du glutamate sur l'ABD de GluN2 et d'un co-agoniste sur celle de GluN1 induit une rotation des coquilles d'huîtres qui s'écartent et permettent l'ouverture du canal (Esmenjaud et al., 2019).

- Un domaine transmembranaire comprenant le canal ionique.

- Un domaine C-terminal (CTD) cytoplasmique impliqué dans le trafic membranaire et la régulation de l'activité et de l'adressage du récepteur par les partenaires intracellulaires. Les domaines CTD de chaque sous-unité sont soumis à des modifications post-traductionnelles contrôlant le trafic des NMDAR, les interactions protéiques, la dynamique du Ca^{2+} et le couplage à des voies spécifiques (Paoletti et al., 2013). Parmi les multiples modifications post-traductionnelles de la partie CTD des NMDAR, la protéine kinase II Ca^{2+} / calmoduline dépendante (CaMKII) (Omkumar et al., 1996) et la protéine kinase C (PKC) (Liao et al., 2001) peuvent phosphoryler le CTD de GluN2B sur le résidu Ser1303, ce qui facilite les courants NMDA (Liao et al., 2001; Lieberman and Mody, 1994), notamment en favorisant l'expression de surface des NMDAR (Jin et al., 2015).

Dans les densités post-synaptiques, les récepteurs NMDA font partie d'un complexe de signalisation macromoléculaire dense composé de protéines d'échafaudage / adaptatrices. Les protéines de la famille des MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), dont PSD95, PSD93, SAP102 et SAP97, lient les NMDAR au cytosquelette. Ces protéines d'échafaudages stabilisent le récepteur à la membrane synaptique et régulent leur adressage et leurs interactions avec d'autres partenaires synaptiques (Chen et al., 2015). Elles sont capables de réguler directement et / ou indirectement la dynamique des récepteurs post-synaptiques, impactant ainsi la plasticité synaptique (Xu, 2011).

Contrairement aux courants AMPAR ou KAR (voir chapitres suivants), les courants NMDA s'activent plus lentement et le canal reste ouvert plus longtemps. Une des particularités du NMDAR est la présence d'un ion magnésium (Mg^{2+}) qui bloque son canal au repos. Outre la nécessité d'une dépolarisation préalable de la membrane permettant l'expulsion de l'ion Mg^{2+} , l'ouverture du canal requiert également que le glutamate se fixe sur la sous-unité GluN2 et qu'un co-agoniste (Glycine ou D-sérine) se fixe sur la sous-unité GluN1 (Paoletti et al., 2013). Les sous-unités GluN2 modulent les propriétés électrophysiologiques des NMDAR, par exemple, les sous-unité GluN2B confèrent au récepteur une cinétique de désactivation plus lente que les GluN2A. La sous-unité GluN2D attribue au NMDAR une cinétique plus lente que GluN2B. Les NMDAR contenant les sous unités GluN2D et GluN3 sont moins sensibles au blocage Mg^{2+} et sont moins perméables au Ca^{2+} (Ortinski, 2014; Tong et al., 2008).

Il existe huit isoformes connus de la sous-unité GluN1 (GluN1-1a-4a et GluN1-1b-4b) produits par épissage alternatif du gène GRIN1 (Figure 24). Bien qu'ils soient considérés comme mutuellement



Figure 24 : Schéma illustrant les huit transcrits du gène GRIN1 produits par épissage alternatif.

exclusifs, une étude rapporte un exemple de récepteurs avec deux isoformes de GluN1 dans le cortex en développement du rat (Sheng et al., 1994). Les isoformes GluN1-b (contenant l'exon 5) sont exprimés de manière ubiquitaire dans le SNC (Standaert et al., 1994). Ils possèdent 21 acides aminés supplémentaires dans le domaine N-terminal (cassette N1) servant de pont avec le domaine de fixation de l'agoniste de la sous-unité GluN2B et permettant une désactivation plus rapide du récepteur (Regan et al., 2018). Les isoformes GluN1-a (exon 21-22) sont exprimées quant à elles dans l'hippocampe et le thalamus, mais faiblement détectées dans le striatum et les structures des GB alors que leur expression est maximale dans le cervelet (Standaert et al., 1994). Ces isoformes présentent des CTD de longueurs variables conférant des propriétés de trafic membranaires différentes à chaque sous-unité. Néanmoins, il n'y a que très peu d'études qui se soient intéressées aux rôles physiologiques de ces différents isoformes ou à leur rôle dans les maladies psychiatriques.

L'exposition aux drogues d'abus peut affecter l'expression des NMDAR et/ou leur composition en sous-unités. En effet, il a été montré que des injections répétées de cocaïne chez le rat augmentent la formation de synapse silencieuses (ne contenant peu ou pas de AMPAR) suite à une insertion membranaire de sous-unités GluN1 et GluN2B dans le NAc accompagnée d'une augmentation du ratio des courants synaptiques GluN2B/GluN2A (Huang et al., 2009; Schumann and Yaka, 2009). Cet enrichissement des synapses excitatrices en GluN2B dépend de l'activation, en réponse à la cocaïne, du facteur de transcription CREB qui possède des sites de liaisons dans les promoteurs de GluN1 et GluN2B, mais pas de GluN2A (Brown et al., 2011; Klein et al., 1998). Néanmoins,

différentes doses, durée de traitement à la cocaïne ont des effets distincts sur l'expression des sous-unités NMDAR, voir (Smaga et al., 2019) pour revue détaillée.

De nombreuses études se sont intéressées au rôle des NMDAR dans l'addiction. Un prétraitement avec le MK-801, un inhibiteur non-compétitif des NMDAR, est capable de bloquer l'acquisition et le maintien de la sensibilisation locomotrice et de la CPP, mais également l'apparition de convulsions et de stéréotypies en réponse à la cocaïne, aux amphétamines chez les rongeurs (Brown et al., 2008; Karler et al., 1989; Kim et al., 1996; Wolf, 1998). Une étude montre cependant que le MK-801 ne bloque pas l'expression de la sensibilisation locomotrice (Emmanuel Valjent et al., 2006). Il est important de noter que les effets du blocage des NMDAR dépendent de la nature de l'antagoniste utilisé. Par exemple, l'antagoniste compétitif PPC (D-3-(2-Carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphate) bloque la CPP et atténue la réponse aiguë en réponse à la cocaïne, mais contrairement au MK-801, la PPC n'affecte pas la sensibilisation locomotrice (Carmack et al., 2013).

De manière intéressante, l'agoniste partiel ACPC (acide 1-aminocyclopropanecarboxylique) agit comme un antagoniste fonctionnel et bloque l'acquisition de la CPP pour les drogues d'abus, dont la cocaïne, sans altérer la CPP pour la nourriture (Papp, 2002).

En ce qui concerne l'auto-administration à la cocaïne, l'effet du blocage des NMDAR dépend également de la nature des antagonistes et de la dose utilisée. Par exemple, les antagonistes non-compétitifs MK-801 et mémantine bloquent l'acquisition de l'auto-administration à la cocaïne, alors que les antagonistes compétitifs CGP 39551 et L-701,324 n'ont pas d'effet (Hyytiä et al., 1999; Schenk et al., 1993). Cependant, une étude a montré que le LY235959 diminue l'auto-administration à la cocaïne et la motivation pour s'administrer de faibles doses (Allen et al., 2005).

De manière paradoxale, les antagonistes NMDAR compétitifs ou non-compétitifs sont capables, à eux seuls, d'induire de la sensibilisation locomotrice et/ou de la CPP tout en bloquant l'acquisition de ces comportements pour les autres drogues (Carey et al., 1995; Panos et al., 1999; Sripada et al., 2001; Strong et al., 2017). La phencyclidine (PCP) et la kétamine, qui sont principalement des antagonistes non-compétitifs des NMDAR, ont des propriétés antidépresseuses, mais ont un potentiel addictif élevé et des effets secondaires qui peuvent être fatals à forte dose. Donc, en plus de la difficulté d'interpréter l'effet de leurs co-administrations avec les autres substances, la plupart de ces antagonistes produisent des effets secondaires sévères et un manque d'efficacité chez les patients humains qui ont conduit à l'échec de nombreux tests cliniques (Bisaga et al., 2010; Price et al., 2013; Santa Ana et al., 2015).

Au vu des résultats parfois controversés obtenus avec les antagonistes NMDAR, de nombreuses études se sont intéressées à la délétion génétique des sous-unités NMDAR pour comprendre leurs rôles dans les réponses aux drogues. Ceci nécessite des approches cellulaires ou structurelles spécifiques car les KO globaux pour les sous-unités GluN1 et GluN2B ne sont pas viables (Forrest et al., 1994; Kutsuwada et al., 1996). Ainsi, la délétion des sous-unités GluN1 dans les D1R-MSN bloque l'acquisition de la sensibilisation locomotrice et la CPP à l'amphétamine (Beutler et al., 2011). La restauration de GluN1 dans les D1R du NAc est suffisante pour restaurer la sensibilisation locomotrice. Étonnamment, chez les animaux KO pour GluN1 dans les D1R-MSN, la suppression de GluN1 dans les D2R-MSN restaure également la sensibilisation locomotrice, suggérant ainsi la nécessité d'une balance entre la signalisation NMDAR dans les D1R et D2R-MSN pour l'action de l'amphétamine (Beutler et al., 2011; Tableau 6).

En accord avec ces résultats, l'expression d'une forme mutée non-fonctionnelle de la sous-unité GluN1 dans les D1R-MSN bloque l'acquisition de la sensibilisation locomotrice et la CPP à la cocaïne (Heusner and Palmiter, 2005). Néanmoins, une étude a montré que la délétion de GluN1 dans les D1R-MSN, mais pas les D2R-MSN, bloque le maintien de la CPP à la cocaïne, mais

n'affecte pas le développement de la CPP. De manière surprenante, ce phénotype est restauré lorsque GluN1 est délétée simultanément dans les deux sous-types de MSN (Joffe et al., 2017). Le même groupe a montré que la délétion de la sous-unité GluN2B dans les D1R-MSN augmente le maintien de la CPP pour la cocaïne, alors que sa délétion dans les D2R-MSN n'a pas d'effet. D'autre part, la délétion de GluN2B dans les deux populations de MSN n'a pas d'effet (Joffe et al., 2018).

Tableau 6 : Manipulations cellules-spécifiques de l'expression des sous-unités NMDAR (modifié de Salery et al 2020)

Modèle	Drogue	Manipulation cellule-spécifique	Paradigme comportemental	Conséquences comportementales	Références
Souris	Cocaïne / Amphét.	Expression d'une forme mutée de la sous-unité NMDAR GluN1 avec une perméabilité réduite au Ca^{2+} dans les cellules qui expriment le <i>drd1a</i>	Sensibilisation locomotrice et CPP (20mg/kg)	- Pas d'effets sur la locomotion basale ou l'hyperlocomotion induit par la cocaïne ou l'amphétamine. - Inhibition du développement sensibilisation locomotrice et de la CPP.	Heusner & Palmiter 2005
Souris	Amphét.	Délétion de GluN1 dans les cellules D1R-positives : <i>Grin1^{lox/lox} x drd1a-cre</i> Délétion de GluN1 dans l'ensemble des MSN : <i>Grin1^{lox/lox} x gpr88-cre</i>	Sensibilisation locomotrice (2.5mg/kg)	Inhibition du développement sensibilisation locomotrice restaurée par une réexpression virale de GluN1 dans les D1R-MSN du NAc ou une délétion de GluN1 dans l'ensemble des MSN	Beutler et al 2011
Souris	Cocaïne	Délétion de GluN1 dans les cellules D1R ou A2AR-positives : <i>Grin1^{lox/lox} x drd1a-cre</i> ou <i>Grin1^{lox/lox} x adora2-cre</i>	CPP (20mg/kg)	- Délétion de GluN1 dans les cellules D1R ou A2AR-positives ou les deux populations n'affecte pas le développement de la CPP et son extinction. - Le maintien de la CPP est altéré quand GluN1 est délété des cellules D1R- mais pas A2AR-positives. Une délétion de GluN1 dans les deux populations restaure ce phénotype	Joffe et al, 2017
Souris	Cocaïne	Délétion de GluN2B dans les cellules D1R ou A2AR-positives : <i>Grin1^{lox/lox} x drd1a-cre</i> ou <i>Grin1^{lox/lox} x adora2-cre</i>	CPP (20mg/kg)	- La délétion de GluN2B dans les cellules D1R-positives augmente le maintien de la CPP - La délétion de GluN2B dans les cellules A2AR positives ou la dans les deux populations n'a pas d'effets	Joffe et al, 2018

b) AMPAR

Les AMPAR sont largement exprimés dans tout le cerveau, à la fois dans les neurones et la glie. Ils sont formés de tétramères de sous-unités spécifiques ; ceux-ci incluent GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Les sous-unités GluA1 et GluA2 sont largement exprimées dans le striatum où les niveaux de GluA3 et GluA4 sont relativement faible. La majorité des AMPAR contiennent les sous-unités GluA2 qui sont imperméables au Ca^{2+} .

L'expression des AMPAR peut être altérées par l'exposition à la cocaïne (Wolf, 2010). En effet, une augmentation de l'expression membranaire et l'expression totale dans le NAc d'AMPAR perméables au Ca^{2+} (CP-AMPAR) et dépourvus de la sous-unité GluA2 après 21 jours d'abstinence à des injections répétées et 45 jours d'abstinence à l'auto-administration de cocaïne (Boudreau and Wolf, 2005 ; Conrad et al., 2008). De manière intéressante, l'incorporation de ces CP-AMPAR augmente l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs des MSN, et le blocage des CP-AMPAR dans le NAc core diminue la recherche de cocaïne (Conrad et al., 2008). Ces études mettent en évidence que, même après une période d'abstinence longue, les expositions à la cocaïne passées laissent une trace durable qui est la potentialisation de la transmission glutamatergique jouant un rôle central dans la rechute (Conrad et al., 2008). Des études antérieures ont montré que les antagonistes des AMPAR peuvent bloquer l'acquisition et l'expression de CPP pour la cocaïne (Kaddis et al., 1995), et diminuer l'expression de la sensibilisation locomotrice (Pierce et al., 1996). Les AMPAR sont donc essentiels pour l'expression des comportements liés à la cocaïne.

c) *mGluR*

Le glutamate, tout comme la dopamine, peut activer des GPCR. Pour le glutamate, les récepteurs sont composés des mGluR qui sont localisés à la fois dans les compartiments extra-synaptiques et pré-synaptiques pour les mGluR2 /3 (groupe 2), mGluR4 et mGluR6-7-8 (groupe 3), alors que les mGluR1 /5 (groupe 1) sont post-synaptiques (Bellone and Mameli, 2012; Niswender and Conn, 2010). Les mGluR du groupe 1 sont principalement couplés à la protéine Gq et induisent l'activation de la phospholipase C (PLC), des voies Inositol- 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG), qui peuvent mobiliser les réserves de Ca^{2+} intracellulaires et activer les voies de signalisations dépendantes du calcium (Hou and Klann, 2004; Page et al., 2006). Les mGluR du groupe 2 sont couplés aux protéines Gi /o. Leur stimulation inhibe la production d'AMPc et la voie PKA. Ils contrôlent le relargage de glutamate au niveau pré-synaptique. Les mGluR du groupe 3 sont également couplés aux protéines Gi /o et exprimés au niveau des terminaisons glutamatergiques du striatum (Niswender and Conn, 2010).

Les mGluR sont également impliqués dans les réponses aux drogues. En effet, un agoniste des mGluR du groupe III, le L-AP4, inhibe l'acquisition de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne (Mao and Wang, 2000). De manière intéressante, les animaux mGluR5 KO ne s'auto-administrent pas la cocaïne et ne développent pas de sensibilisation locomotrice (Chiamulera et al., 2001). Une étude a montré dans le NAc de rats que la baisse de la concentration extracellulaire de glutamate durant l'abstinence à la cocaïne réduit l'expression des mGluR2/3 qui inhibent la libération de glutamate en pré-synaptique. Ceci faciliterait l'augmentation de la libération de glutamate en réponse aux indices associés à la cocaïne et la rechute (Kalivas, 2009; Xi et al., 2002).

d) *Récepteurs du Kainate*

Les récepteurs du kainate (KAR) sont ligands-dépendants. Ce sont des tétramères formés à partir de combinaisons de cinq sous-unités : GluK1-5. Les KAR sont exprimés à la fois dans les compartiments pré et post-synaptique. Les KAR sont perméables aux Na^+ et K^+ , mais certains isoformes permettent une perméabilité au Ca^{2+} (Köhler et al., 1993). Les réponses post-synaptiques typiques des KAR sont très lentes (Castillo et al., 1997). Notre compréhension du rôle du KAR dans les comportements liés aux drogues d'abus sont très limités. Toutefois, il a été établi que la délétion de GluK1 chez la souris augmente la sensibilisation locomotrice et la CPP pour la cocaïne (Gregus et al., 2010).

III. Interactions entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques dans le striatum et effets de la cocaïne

Les recherches effectuées au cours des dernières années ont mené à la découverte de propriétés surprenantes du système dopaminergique et son lien étroit avec le système glutamatergique. Les interactions entre ces deux systèmes s'opèrent à de multiples niveaux, qu'il s'agisse du contrôle exercé par la DA sur la libération de DA et de glutamate, de la co-libération de glutamate par les neurones dopaminergiques ou encore des interactions physiques directes existant entre les récepteurs de la DA et du glutamate. Comme nous le verrons dans ce chapitre, les interactions entre les transmissions dopaminergique et glutamatergique jouent un rôle important dans les adaptations neuronales induites par les substances addictives. Pour des raisons de concision, parmi l'ensemble des mécanismes impliqués dans les relations réciproques entre la signalisation dépendante de la DA et de glutamate, une partie importante de ce chapitre sera dédiée aux interactions entre les récepteurs DA et NMDA qui ont occupé une place centrale dans mes travaux de thèse.

A. Régulation de la libération de neurotransmetteurs

Plusieurs études se sont intéressées au contrôle de la libération du glutamate et de la DA par les récepteurs de la dopamine. On retrouve au niveau pré-synaptique des auto-récepteurs et des hétéro-récepteurs qui permettent de réguler la libération du glutamate et de la DA. Dans le striatum, l'activation des D2R présents au niveau des terminaisons dopaminergiques et glutamatergiques provoque une diminution de la libération de DA (Cragg and Greenfield, 1997; Sulzer et al., 2016; Tepper et al., 1997) et de glutamate, respectivement (Cepeda et al., 2001; Flores-Hernández et al., 1997; Wang and Pickel, 2002; Yamamoto and Davy, 1992). L'inhibition par la DA de la libération de glutamate par les terminaisons corticales projetant sur le striatum dépend du niveau d'activité des afférences corticales. En évoquant la libération de DA électriquement, ou par administration d'amphétamine, il a en effet été établi que seules les afférences corticales faiblement actives étaient soumises à cette inhibition. Il a donc été proposé que l'augmentation de DA, induite par les drogues d'abus, puisse conduire à un filtrage « aberrant » des afférences cortico-striatales les moins actives au profit des plus actives. Cela pourrait participer au développement des comportements addictifs (Bamford et al., 2018, 2004). Ces travaux ont également établi que l'inhibition des afférences cortico-striatales par la DA reposait sur la stimulation des D2R pré-synaptiques (Bamford et al., 2004).

En ce qui concerne le contrôle de la libération de DA par le glutamate, la présence de différents sous-types de récepteurs glutamatergiques, notamment les AMPAR et NMDAR, a été démontrée sur les terminaisons des neurones DA nigrostriataux chez le rat et la souris (Desce et al., 1992; Krebs et al., 1991; Tarazi and Baldessarini, 1999). La stimulation de ces NMDAR par le glutamate est impliquée dans le déclenchement de la libération de DA par les terminaisons nigrostriatales (Krebs et al., 1991; Kulagina et al., 2001). Dans le striatum, l'infusion d'inhibiteurs de recapture du glutamate augmente la libération de DA, via l'activation des NMDAR (Saulskaya and Marsden, 1995).

Ces études soulignent l'existence de régulations réciproques de la libération de glutamate et de DA dans le striatum, notamment par les NMDAR qui peuvent favoriser la libération de DA dans le striatum alors que les D2R diminuent la transmission glutamate cortico-striatale (David et al., 2005; Sulzer et al., 2016).

En ce qui concerne les neurones dopaminergiques de la VTA, leur activité, et donc la libération de DA, est également régulée au niveau de leur corps cellulaires. Cette régulation se fait principalement par l'innervation glutamatergique provenant principalement du cortex. En effet, il a été montré que la stimulation des NMDAR, exprimés au niveau des neurones dopaminergiques, jouent un rôle central dans la genèse de l'activité phasique (associée à une libération accrue de DA) de ces neurones (Chergui et al., 1993).

Si les neurones dopaminergiques sont connus pour leur capacité à produire et à libérer la DA, des travaux récents montrent qu'ils ont également la capacité de libérer du glutamate de façon concomitante. En effet, l'expression de l'ARN messager de VGLUT2, un des transporteurs vésiculaires du glutamate, marqueur spécifique de terminaisons glutamatergiques, a été détecté dans une fraction (~15 %) de neurones dopaminergiques de la VTA, dont une partie projette vers le NAc chez le rat adulte (Kawano et al., 2006). La même observation a été faite chez la souris (Yamaguchi et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que les neurones à DA exprimant VGLUT2 ont des domaines ultra-structuraux distincts pour l'accumulation et la libération de DA ou de glutamate (Zhang et al., 2015). Néanmoins, le rôle de cette co-transmission dans les réponses aux drogues d'abus reste mal connu.

De manière intéressante, les interneurones cholinergiques (CIN), diminuent la libération de dopamine dans le striatum via des récepteurs nicotiques $\beta 2$ au niveau des terminaisons dopaminergiques (Exley and Cragg, 2008; Sulzer et al., 2016). D'autre part, les CIN du striatum expriment le sous-type de transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3, et peuvent libérer du glutamate en plus de l'acétylcholine (Gras et al., 2008; Herzog et al., 2004). La délétion de VGLUT3

dans neurones cholinergiques atténue la sensibilisation locomotrice à l'amphétamine (Mansouri-Guilani et al., 2019).

B. Interactions entre les DAR et NMDAR par le biais de voies de signalisation intracellulaires

Il existe un consensus général en faveur d'un effet facilitateur de la DA via la stimulation du D1R sur les fonctions des NMDAR (Flores-Hernández et al., 2002 ; Wittmann et al., 2005). Ces effets sont bidirectionnels puisque la stimulation des NMDAR favorise également l'expression des D1R à la membrane plasmique et la production d'AMPc en aval (Pei, 2004). Ces processus conduisent à l'activation des D1R-MSN lors d'élévations des taux de DA. En accord avec ces observations, une exposition aiguë à la cocaïne augmente rapidement les flux de Ca^{2+} dans les D1R-MSN par un mécanisme qui dépend de la stimulation des D1R (Luo et al., 2011). Durant la CPP, une augmentation de Ca^{2+} dans les D1R-MSNs précède le moment où l'animal rentre dans le compartiment préalablement associé à la cocaïne (Calipari et al., 2016). L'expression d'une forme mutante de la sous-unité GluN1 des NMDAR dans les D1R-MSN bloque l'élévation de Ca^{2+} induit par la cocaïne et inhibe également la sensibilisation locomotrice ainsi que la CPP. Cette augmentation du Ca^{2+} induite par la stimulation du D1R implique donc les NMDAR et joue un rôle fonctionnel important dans les adaptations comportementales induites par l'exposition à la cocaïne (Heusner and Palmiter, 2005).

De nombreuses études ont montré que la synergie entre D1R et NMDAR joue un rôle fonctionnel dans les réponses aux drogues d'abus. Les travaux de notre laboratoire ont montré qu'une injection aiguë à la cocaïne active la voie ERK dans les D1R-MSN (Bertran-Gonzalez et al., 2008) par un mécanisme qui dépend de la stimulation concomitante des D1R et des NMDAR (Pascoli et al., 2011; Valjent et al., 2005, 2000). Cette convergence des signaux DA et glutamate sur la voie ERK implique une phosphorylation de la sous-unité GluN2B sur la Tyrosine 1472, via la tyrosine kinase Fyn, en aval des D1R. Cet événement induit une facilitation des courants calciques NMDAR et déclenche une cascade de signalisation dépendante du calcium qui conduit à l'activation d'ERK (Emma Cahill et al., 2014; Pascoli et al., 2014a, 2011) (Figure 25).

Les travaux du laboratoire ont également montré que dans les D1R-MSN du NAc, une exposition aiguë à la cocaïne déclenche la formation rapide de nouvelles épines dendritiques qui entrent en contact avec les terminaisons glutamatergiques pré-existantes (Dos Santos et al., 2017). La stabilisation de ces synapses nouvellement formées nécessite l'activation de MNK-1 (mitogen-activated protein kinase interacting protein-1), cible cytoplasmique d'ERK.

Au niveau comportemental, l'inhibition d'ERK bloque la potentialisation à long terme des synapses glutamatergiques issues du cortex et projetant sur les D1R-SPN (Pascoli et al., 2012). L'inhibition de cette voie de signalisation bloque également le développement de sensibilisation locomotrice et de la CPP induites par la cocaïne (Emmanuel Valjent et al., 2006; Valjent et al., 2000), ainsi que la reconsolidation de la mémoire contextuelle associée à la cocaïne (Miller and Marshall, 2005; E. Valjent et al., 2006).

En aval du D1R, la voie cAMP / PKA contribue également à la facilitation des courants NMDAR en ciblant directement des sous-unités spécifiques (Flores-Hernández et al., 2002). Bien que la PKA ne puisse pas cibler directement ERK, elle peut amplifier indirectement sa phosphorylation en activant la phosphoprotéine DARPP-32 (Figure 25) (Valjent et al., 2005). Conformément à une induction ERK spécifique aux D1R-MSN, la cocaïne augmente l'activité de DARPP-32 dans les D1R-MSN et la diminue dans les D2R-MSN (Bateup et al., 2008). La suppression de DARPP-32 dans les D1R-SPN réduit la locomotion basale et l'hyperlocomotion induite par la cocaïne, tandis que sa

suppression dans les D2R-MSN conduit à un phénotype opposé (Bateup et al., 2010). Enfin, il faut également mentionner que la stimulation de la voie D1R et cAMP / PKA peut aussi contrôler indirectement l'activité de ERK en inhibant une phosphatase de ERK enrichie dans le striatum, la protéine STEP (Pulido et al., 1998).

La voie ERK joue un rôle central dans l'expression de gènes immédiats précoces comme c-fos, zif268, Delta-fosB, et Arc (Besnard et al., 2011) qui sont enrichis dans les D1R-MSN en réponse à la cocaïne (Guez-Barber et al., 2011), et contrôlent les adaptations à long terme induites par la cocaïne (Chandra and Lobo, 2017). Parmi ces gènes, l'expression de c-Fos est majoritairement induit dans les D1R-MSN du striatum à partir de 30 min après une injection aigue de cocaïne (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Valjent et al., 2000). L'induction de c-Fos dépend de l'activation de la voie ERK (Valjent et al., 2000). La délétion spécifique de c-Fos dans les D1R-MSN altère l'induction de gènes impliqués dans la plasticité neuronale, bloque la mise en place d'adaptations morphologiques et atténue la sensibilisation locomotrice en réponse à des expositions répétées à la cocaïne (Zhang et al., 2006).

Parmi les protéines de la famille Fos induites par la cocaïne, on compte également Δ FosB, un isoforme du facteur de transcription FosB (Kelz et al., 1999). Δ FosB est induit dans les D1R-MSN du NAc et du striatum dorsal, après des injections répétées de cocaïne, tandis que la morphine et l'héroïne induisent de manière significative Δ FosB dans les deux types de cellules. De manière intéressante, des tendances similaires ont été observées entre les injections de drogue et l'auto-administration (Lobo et al., 2013a). L'induction de FosB dépend de l'activation d'ERK (Guan et al., 2008; Radwanska et al., 2006), et la surexpression de Δ FosB dans les D1R-MSN, mais pas dans

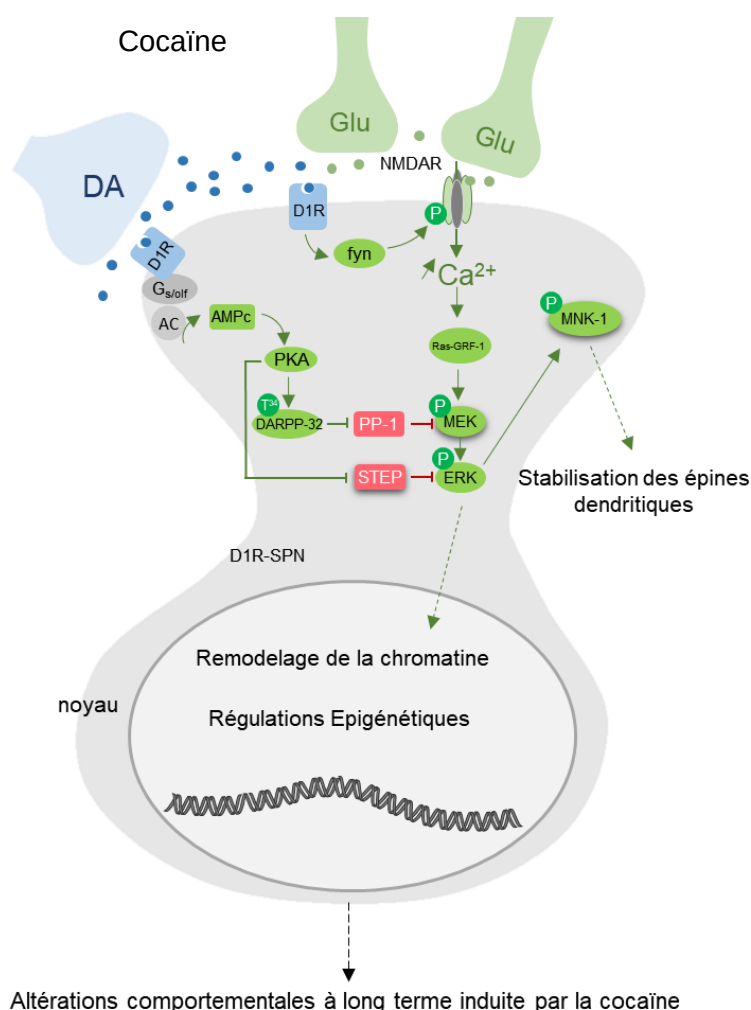


Figure 25 : Les événements moléculaires qui sous-tendent l'activation d'ERK induite par la cocaïne.

Dans les D1R-MSN, la stimulation de D1R conduit à l'activation de la tyrosine kinase Fyn qui cible à son tour la phosphorylation de GluN2B sur Tyr1472 et déclenche l'activation de la voie ERK qui contrôle les adaptations à long terme induites par la cocaïne (voir Pascoli et al. 2011a, 2014a)

les D2R-MSN, augmente la sensibilisation locomotrice et la CPP à une faible dose de cocaïne (Grueter et al., 2013; Kelz et al., 1999).

L'ensemble de ces études illustre donc que l'interaction entre les voies de signalisation D1R et NMDAR jouent un rôle clé dans les réponses induites par la cocaïne.

Pour ce qui est des D2R, le consensus est en faveur d'un effet inhibiteur de leur stimulation sur les fonctions des NMDAR (Kotecha et al., 2002; Li et al., 2009; Liu et al., 2006). En accord avec ces observations, une exposition aigue à la cocaïne diminue lentement les niveaux de Ca^{2+} dans les D2R-MSN par un mécanisme impliquant les D2R (Luo et al., 2011). D'autre part, il a été montré que la stimulation du D2R induit une diminution des courants NMDAR dans le striatum (Liu et al., 2006) et le PFC (Li et al., 2009). Dans le PFC, cet effet inhibiteur reposerait sur l'activation de la voie GSK-3 β , en aval des D2R, qui cible la β -caténine. La phosphorylation de la β -caténine altère son interaction avec la sous-unité GluN2B du NMDAR, ce qui diminue l'expression à la surface membranaire des NMDAR porteurs de cette sous-unité. (Li et al., 2009). Des études d'imagerie calcique chez l'animal vigile montre que durant la CPP, le Ca^{2+} diminue dans les D2R-MSN du NAC quand l'animal reste dans le compartiment préalablement associé à la cocaïne (Calipari et al., 2016). Un point central de mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les élévations de DA induites par l'exposition aux substances addictives modulent la signalisation des NMDAR dans les D1R-MSN et les D2R-MSN, et contribuent à la mise en place des altérations durables induites par ces drogues. Je me suis plus particulièrement intéressé aux rôles potentiels des interactions physiques entre les récepteurs D1R et D2R et les sous-unités NMDAR dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne.

C. Les hétéromères DAR-NMDAR

Outre les voies de signalisation intracellulaires, un nombre important d'études montrent que l'interaction physique directe entre deux récepteurs est un mécanisme clé par lequel les récepteurs peuvent modifier leurs fonctions de manière réciproque. La formation de ces oligomères de récepteurs peut engager deux ou plusieurs récepteurs identiques (homomères) ou distincts (hétéromères). Ces complexes ont été le sujet d'études approfondies parce que leurs propriétés fonctionnelles sont distinctes des récepteurs qui les composent, ce qui en fait des cibles thérapeutiques prometteuses pour le développement de traitements pharmacologiques pour de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques (Borrito-Escuela et al., 2017a; Liu et al., 2016; Rodríguez-Ruiz et al., 2017). Un certain nombre d'études montrent le rôle clé des interactions physiques entre les DAR et les NMDAR dans la modulation de leurs fonctions (Cepeda and Levine, 2006; Fiorentini et al., 2008; Ladepeche et al., 2013; Lee et al., 2002; Liu et al., 2006; Nai et al., 2010; Pei, 2004; Wang et al., 2012a; Woods et al., 2005a). Et bien que les hétéromères DAR/NMDAR aient un potentiel thérapeutique, la majorité des études sur ces complexes a été réalisée *in vitro*.

1. D1R-GluN1

Les mécanismes moléculaires responsables de l'interaction entre les D1R et NMDAR ont fait l'objet de recherches approfondies, notamment parce que ces hétéromères représentent des cibles moléculaires d'intérêt pour rétablir le déséquilibre des fonctions des D1R et NMDAR décrit dans de nombreuses maladies psychiatriques (Andrianarivelo et al., 2019; Cepeda and Levine, 2006; Fiorentini et al., 2006; Wang et al., 2012a; Yao et al., 2008).

Les travaux fondateurs du groupe de Fang Liu ont conduit à l'identification d'une liaison directe de D1R, mais pas de D5R, aux sous-unités GluN1 et GluN2A de NMDAR, et ce aussi bien dans des lignées cellulaires surexprimant les récepteurs qu'à partir de tissus hippocampiques (Lee et al., 2002; Pei, 2004). Ces complexes D1R-GluN1 ont également été détectés dans le striatum de la souris (E. Cahill et al., 2014), y compris dans les fractions PSD (Fiorentini et al., 2003b). Des approches biochimiques menées *in vitro* ont montré que les domaines D1R-t2 (L387-L416) et D1R-t3 (S417-T446) de la séquence C-terminale du D1R se lient respectivement à celles des sous-unités GluN1 et GluN2A. Le domaine D1R-t2 se lie à la cassette C1 de GluN1 (D864-T900) ; (Figure 26) (Lee et al., 2002) qui comprend plusieurs sites de phosphorylations PKA et PKC (Tingley et al., 1997; Wang et al., 2014) modulant le trafic membranaire des NMDAR (Ehlers et al., 1995; Scott et al., 2003).

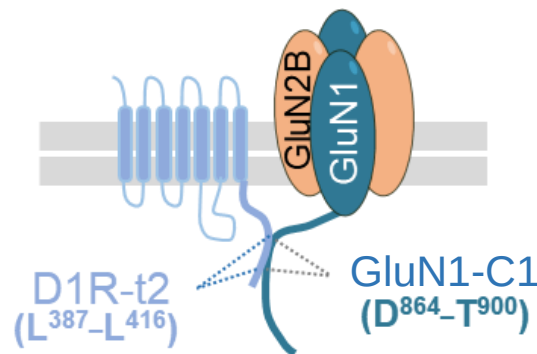


Figure 26 : Représentation schématique de l'hétéromérisation D1R-GluN1.

Des analyses par spectrométrie de masse ont établi que les interactions entre D1R et GluN1 reposaient sur des liaisons électrostatiques formées entre l'épitope riche en arginine localisé dans GluN1-C1 et les résidus acides de la région D1R-t2 (Woods et al., 2005a). Il est intéressant de noter que l'épitope riche en arginine, impliqué dans l'interaction de D1R avec GluN1, partage de grandes similitudes avec celui impliqué dans l'interaction entre D2R et le récepteur à l'adénosine de type A2A (A2AR)(Ciruela et al., 2004), suggérant ainsi que les interactions électrostatiques épito-pe-épito-pe pourraient représenter un mécanisme général d'hétéromérisation des récepteurs. Il convient de noter que les séquences d'acides aminés D1R-t2 et GluN1-C1 sont conservées d'une espèce à l'autre, ce qui suggère que les hétéromères D1R-NMDAR pourraient être impliqués dans des fonctions physiologiques importantes qui ont été préservées au cours de l'évolution (Woods et al., 2005).

Les études sur la modulation de l'interaction D1R-GluN1 par des agonistes ou des antagonistes des récepteurs ont conduit à des résultats controversés. Certains auteurs ont établi une diminution des hétéromères endogènes D1R-GluN1 en présence d'un agoniste des D1R dans des cultures primaires de neurones hippocampiques (Lee et al., 2002), alors que les expériences de BRET effectuées sur les lignées cellulaires surexprimant les récepteurs n'ont montré aucun effet des agonistes et antagonistes D1R ou NMDAR sur cette hétéromérisation (Fiorentini et al., 2003b). Des travaux antérieurs menés dans mon laboratoire d'accueil ont étudié la modulation des hétéromères endogènes dans un modèle *in vitro* de culture primaire de neurones striataux co-stimulés avec un agoniste D1R et une faible dose de glutamate. Ce paradigme de co-stimulation a été validé par le laboratoire comme un modèle reproduisant, *in vitro*, certains des événements moléculaires et cellulaires évoqués par une injection unique de cocaïne *in vivo* (E. Cahill et al., 2014; Pascoli et al., 2011). Dans ce modèle, la stimulation du D1R induit une facilitation des flux calciques dépendants du NMDAR qui déclenche l'activation de la voie ERK, comme observé *in vivo* en réponse à une injection unique de cocaïne et le laboratoire a pu établir que cette co-stimulation entraînait une

augmentation significative des hétéromères D1R-GluN1 (E Cahill et al., 2014). Afin d'étudier le rôle potentiel des hétéromères D1R-GluN1 dans la convergence des signaux D1R et NMDAR sur l'activité de la voie ERK, un peptide pénétrant exprimant la cassette C1 de GluN1 (TAT-GluN1-C1), et un autre exprimant une séquence contrôle (TAT-GluN1-C1Δ) dépourvue des 9 acides aminés basiques importants pour l'interaction avec le D1R ont été développés au laboratoire. Le peptide TAT-GluN1-C1 bloque efficacement l'hétéromérisation D1R-GluN1 induite par la co-stimulation des D1R et NMDAR, et l'inhibition de cette interaction bloque la potentialisation des entrées calciques via les NMDA par le D1R, la plasticité à long-terme dans les D1R-MSN et l'activation ERK en aval (Figure 27a). Il est important de mentionner que le peptide TAT-GluN1 bloque spécifiquement la signalisation en aval des hétéromères D1R-GluN1, tout en préservant les fonctions individuelles des récepteurs, indépendamment de leur hétéromérisation. En effet, ce peptide n'altère pas la production d'AMPc induite par un agoniste du D1R, ni les flux calciques dépendants des NMDAR déclenchés par une application de glutamate (Figure 27b).

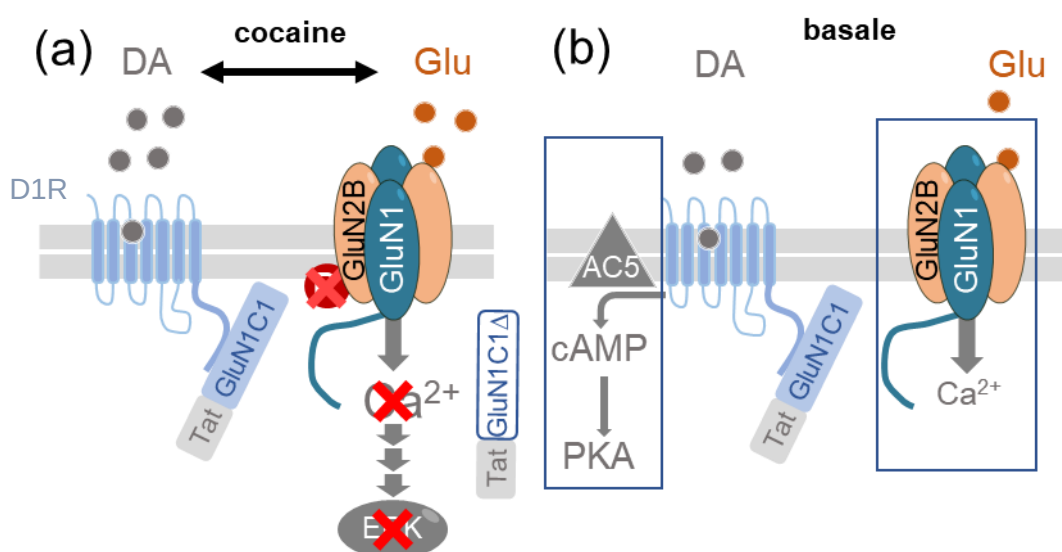


Figure 27 : Stratégie d'étude des hétéromères D1R-GluN1.

(a) Le peptide TAT-GluN1C1 bloque l'interaction entre D1R et GluN1, mais également la phosphorylation de GluN2B et l'activation de ERK en réponse à la cocaïne (b) sans altérer la production d'AMPc après stimulation du D1R ou les flux calciques après stimulation des NMDAR.

À l'inverse, l'utilisation d'un peptide bloquant l'interaction de D1R avec la sous-unité GluN2A a permis d'établir que les hétéromères D1R-GluN2A n'étaient pas impliqués dans l'activation de ERK en aval des D1R et NMDAR (Cahill et al., 2014). L'ensemble de ces observations suggère donc que les hétéromères D1R-GluN1 pourraient agir comme un « pont moléculaire » permettant à la DA de faciliter la signalisation NMDAR pour activer la voie ERK dans les D1R-MSN dans un modèle *in vitro* d'exposition aiguë à la cocaïne.

Un lien causal ayant été établi entre la plasticité synaptique à long terme au niveau des synapses glutamatergiques projetant sur les D1R-MSN et le développement des altérations à long terme induites par la cocaïne (Pascoli et al., 2014c, 2012). Il semble essentiel de déterminer si les hétéromères D1R-NMDAR sont présents au niveau synaptique et s'ils peuvent contrôler la plasticité synaptique. Dans les cultures organotypiques striatales, la diffusion latérale de D1R au niveau de la membrane plasmique est considérablement réduite lors de la stimulation des NMDAR qui favorise l'expression des D1R dans les épines dendritiques. Ce recrutement de D1R dans les épines dépend de la formation d'hétéromères D1R-GluN1, conduisant au modèle de « système de piège par diffusion » selon lequel des changements allostériques induits par les agonistes du NMDAR favorisent l'interaction D1R-GluN1 au niveau des épines dendritiques (Scott et al., 2006). Cette

étude suggère donc que lors de la libération de glutamate, les hétéromères D1R-NMDAR sont formés préférentiellement aux niveaux synaptiques et/ou péri-synaptiques.

Les deux sous-unités régulatrices GluN2 de NMDAR et D1R sont connus pour se lier à la protéine échafaudage PSD-95, qui stabilise leur localisation au niveau des synapses (Bard et al., 2010; Kornau et al., 1995; Ladepeche et al., 2013; Zhang et al., 2007). L'expression des deux récepteurs est donc confinée aux sites synaptiques en raison de leur interaction avec PSD-95. Cependant, Zhang et ses collègues ont démontré que GluN1 et PSD-95 se lient à la partie C-terminale de D1R via des sites d'interaction qui se chevauchent, en partie, au niveau du domaine D1R-t2 (Zhang et al., 2009). Grâce à un mécanisme de compétition, la PSD-95 est donc un facteur limitant de l'hétéromérisation

D1R-GluN1 au niveau des synapses (Figure 28), même si ces complexes récepteurs sont détectés dans les fractions striatales de PSD (Fiorentini et al., 2003).

Afin d'évaluer le rôle fonctionnel de l'interaction D1R-GluN1 dans la modulation de la transmission synaptique, des enregistrements électrophysiologiques ont été effectués à partir de tranches cortico-striatales (Cahill et al. 2014b), préparées à partir des souris *drd1a-egfp* pour visualiser les D1R-MSN (Gong et al., 2003). L'inhibition de l'interaction D1R-GluN1 avec le peptide GluN1-C1 bloque la facilitation des courants post-synaptiques excitateurs NMDA induite par un agoniste D1R, tout en préservant la transmission glutamatergique basale (E Cahill et al., 2014). Il est important de noter qu'un antagoniste des sous-unités GluN2B inhibe, tout comme le peptide GluN1C1, la facilitation des courants NMDA post-synaptiques induite par la stimulation du D1R, tandis que la perturbation des hétéromères D1R-GluN2A avec le peptide D1R-t3 n'a aucun effet (Cahill et al., 2014). Cela suggère d'une part que les hétéromères D1R-GluN2A ne sont pas impliqués dans la modulation des courants NMDAR par DA dans les D1R-MSN et, d'autre part, que l'interaction D1R-GluN1 module préférentiellement les GluN2B-NMDAR, même si le mécanisme sous-jacent reste inconnu.

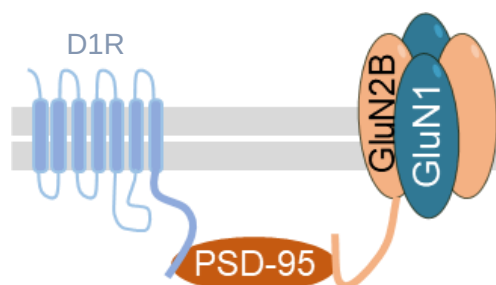


Figure 28 : La PSD-95 perturbe l'interaction entre D1R et GluN1.

La PSD-95 interagit directement avec les parties C-terminale du D1R et de GluN2B et interfère avec l'interaction D1R-GluN1 par compétition. Adapté de Zhang et al. 2009.

Pour étudier le rôle de l'interaction D1R-GluN1 dans la plasticité striatale, des stimulations électriques à haute fréquence (HFS) des afférences corticales projetant sur le noyau accumbens ont été appliquées sur des tranches cortico-striatales. Ces stimulations déclenchent une potentialisation à long terme (LTP) des synapses striatales projetant sur les D1R-MSN et D2R-MSN. Cette approche a permis de démontrer que les hétéromères D1R-NMDAR contrôlaient la LTP au niveau des D1R-MSN, mais pas des D2R-MSN (Cahill et al., 2014b) (Figure 29). En accord avec ces observations, il a également été montré que l'effet facilitateur de D1R sur la LTP NMDAR-dépendante nécessite l'interaction D1-NMDAR dans l'hippocampe (Nai et al., 2010).

En revanche, Ladepeche et ses collaborateurs ont constaté que le blocage de l'interaction D1R-GluN1 avec un peptide correspondant au domaine t2 de D1R (TAT-D1R-t2) augmentait le nombre de synapses potentialisées dans un modèle de culture primaire hippocampique où la LTP a été induite chimiquement (Ladepeche et al., 2013). La divergence apparente entre ces résultats est possiblement due à des différences dans les modèles expérimentaux (tranches cortico-striatales et

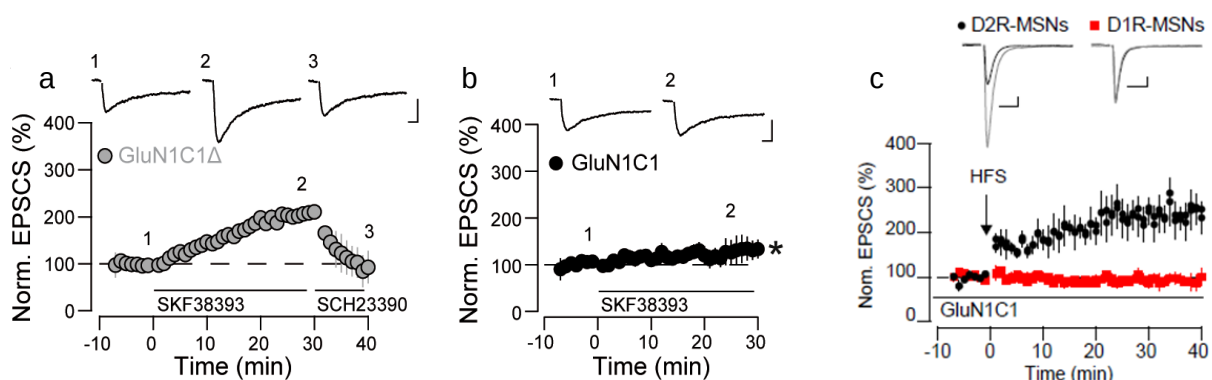


Figure 29 : Rôle des hétéromères D1R-GluN1 dans la plasticité synaptique.

(a) En présence du peptide contrôle TAT-GluN1C1Δ, la stimulation du D1R induit une potentialisation des courants NMDAR. (b) Le peptide TAT-GluN1C1 bloque la potentialisation des courants NMDAR à la suite de la stimulation des D1R. (c) Le peptide TAT-GluN1C1 bloque l'induction de la LTP par une stimulation haute fréquence chez les D1R-MSN mais pas les D2R-MSN. D'après, Cahill et al 2014.

cultures primaires de neurones d'hippocampe) et / ou aux stratégies utilisées pour bloquer les hétéromères D1R-GluN1. En effet, nous avons constaté que le peptide D1R-t2 était capable d'activer le NMDAR et la voie ERK par lui-même (E Cahill et al., 2014), ce qui pourrait expliquer son effet sur la LTP chimique observé par Ladepeche et ses collaborateurs. En revanche, lorsque le peptide GluN1-C1 est utilisé, la liaison de D1R à NMDAR est perturbée, mais la production D1R-dépendante d'AMPC et les courants NMDAR individuels ne sont pas affectés. Dans ces conditions, le blocage de l'interaction D1R-GluN1 conduit bien à une inhibition de la LTP striatale induit par HFS. En ce qui concerne les réponses évoquées par la cocaïne *in vivo*, l'injection du peptide TAT-GluN1-C1 directement dans le NAc atténue fortement l'activation ERK1 / 2 induite par une injection aiguë de cocaïne. Au niveau des réponses comportementales, l'inhibition des hétéromères D1R-GluN1 dans le NAc n'affecte ni la locomotion basale, ni la réponse hyperlocomotrice aiguë induite par une première injection de cocaïne. En revanche, le blocage de l'interaction D1R-GluN1 avant et pendant la première injection de cocaïne réduit fortement la sensibilisation locomotrice induite par une deuxième injection de cocaïne administrée une semaine plus tard (E Cahill et al., 2014).

Ces résultats suggèrent que les hétéromères D1R-GluN1 du NAc jouent un rôle dans le développement d'adaptations persistantes induites par la cocaïne dans un modèle aigu d'exposition à la cocaïne. Toutefois, l'impact d'une exposition aiguë ou chronique à la cocaïne sur l'hétéromérisation de D1R avec GluN1 endogène *in vivo* dans le striatum, et dans d'autres structures cérébrales du circuit de récompense, n'a pas encore été étudiée et le rôle de cette interaction dans le développement et le maintien des adaptations à long terme induites par des expositions répétées à la cocaïne reste également inconnu.

2. D2R-GluN2B

Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'intégration des signaux DA et glutamate dans le striatum en réponse aux drogues d'abus, le groupe du Dr Fang Liu a également démontré l'existence d'une interaction physique directe entre les sous-unités D2R et GluN2B (Figure 30).

Cette interaction a été détectée dans les fractions de densités post-synaptiques d'hippocampe, de cortex préfrontal et de striatum chez le rat (Liu et al., 2006). Cette étude a également montré qu'une seule injection de cocaïne à forte dose (30 mg/kg) déclenche une augmentation des hétéromères D2R-GluN2B dans le NAc et le striatum dorsal. Cette augmentation de l'interaction entre ces récepteurs est associée à une diminution de la phosphorylation de GluN2B sur la Ser1303 par la CaMKII qui inhibe les fonctions des NMDAR contenant la sous-unité GluN2B. Bien que la phosphorylation ait été observée à partir d'extraits totaux de striatum dorsal ou NAc, cet effet dépend strictement de la signalisation D2R, car l'antagoniste D2R, l'ééticlopride, bloque à la fois l'inhibition de phospho-GluN2B-Ser1303 induite par la cocaïne et l'augmentation des hétéromères D2R-GluN2B, tandis qu'un agoniste D2R induit des effets opposés (Liu et al. 2006).

Les séquences impliquées dans l'interaction D2R-GluN2B ont ensuite été caractérisées. Les résidus R220-A234 de la troisième boucle intracellulaire de D2R (D2R-IL3) sont apparus comme critiques pour la liaison de D2R à la partie c-terminale de GluN2B. En utilisant un peptide pénétrant correspondant à ce fragment, capable de perturber les hétéromères D2R-GluN2B, il a été montré que la stimulation du D2R induite par la cocaïne facilite l'interaction D2R-GluN2B, conduisant à une diminution des courants NMDAR dans les D2R-MSN. Cette inhibition de NMDAR repose sur un mécanisme de compétition par lequel les hétéromères D2R-GluN2B induits par la cocaïne perturbent la liaison de la CaMKII à GluN2B ce qui a pour effet de réduire sa phosphorylation sur Ser 1303 et par conséquent les fonctions des NMDAR porteurs de la sous-unité GluN2B(Figure 30).

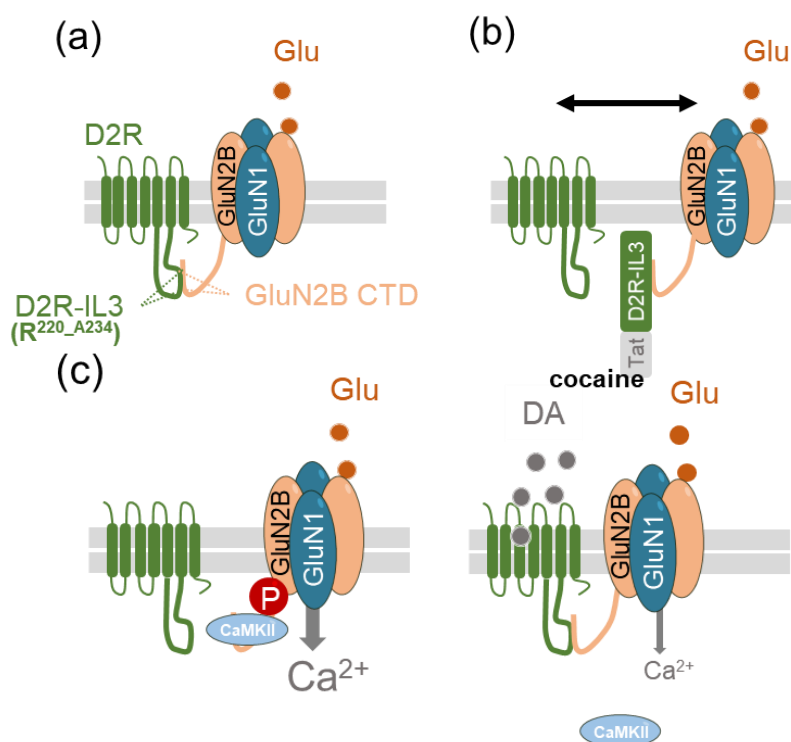


Figure 30 : Formation, régulation et fonctions des hétéromères D2R-NMDAR en réponse à la cocaïne.

(a) Diagramme illustrant la formation d'hétéromères D2R-GluN2B-NMDAR par l'interaction d'un fragment du D2R-IL3 avec le CTD de GluN2B. (b) Mode d'action du peptide Tat-D2R-IL3 qui perturbe l'interaction D2R-GluN2B. (c) Une administration unique de cocaïne favorise l'hétéromérisation D2R-GluN2B dans le striatum ce qui perturbe la liaison de CaMKII à GluN2B et diminue la phosphorylation de GluN2B de Ser1303 ce qui inhibe les fonctions NMDAR dans D2R-MSN (voir Liu et al. 2006).

Au niveau comportemental, la perturbation de l'interaction D2R-GluN2B inhibe l'hyperlocomotion aiguë et les stéréotypes induits par une seule dose élevée de cocaïne (Liu et al., 2006). Cette étude pionnière soutient fortement l'hypothèse que les hétéromères D2R-GluN2B seraient impliqués dans les effets inhibiteurs des psychostimulants sur les D2R-MSN. Néanmoins, il est nécessaire de préciser que le peptide D2R-IL3 utilisé dans cette étude englobe, non seulement la séquence du domaine d'interaction de D2R avec GluN2B, mais aussi une partie de la séquence VLRRRKRVN du D2R qui permet son interaction avec A2AR (Ciruela et al., 2004). Ceci est important à prendre en compte, car il a été montré que l'hétéromérisation D2R-A2AR était, elle aussi, favorisée dans la NAc lors d'expositions répétées à la cocaïne (Borrito-Escuela et al., 2017b), et que son blocage altère

l'auto-administration de cocaïne (Borrito-Escuela et al., 2018). De plus, l'interaction D2R-A2AR est impliquée dans l'inhibition des courants NMDAR par le D2R (Azdad et al., 2009), ce qui complique l'interprétation des résultats obtenus par le groupe de Fang Liu (Liu et al. 2006), et souligne la nécessité d'utiliser une approche plus spécifique pour étudier les fonctions de cette interaction. De plus, la régulation et le rôle de ces hétéromères dans les réponses à l'exposition chronique aux drogues d'abus demeurent inconnus à ce jour.

Dans ce contexte, l'hypothèse centrale de mon travail de thèse était que les hétéromères D1R-GluN1 et D2R-GluN2B pourraient participer aux effets distincts, parfois opposés, des drogues d'abus sur les neurones D1R-MSN et D2R-MSN, et ainsi participer aux adaptations à long terme induites par les substances addictives. Un premier objectif de mon travail de thèse fut de déterminer si, et comment, les hétéromères D1R-GluN1 et D2R-GluN2B étaient modulés *in vivo* dans le striatum lors d'expositions répétées à la cocaïne entraînant des altérations comportementales durables. Le second objectif fut de tester le rôle fonctionnel de chacun de ces hétéromères sur les adaptations cellulaires, moléculaires et comportementales persistantes induites par la cocaïne.

IV. Objectifs

Les relations étroites entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques au sein du circuit de récompense, en particulier au niveau du striatum, jouent un rôle central dans la mise en place des altérations persistantes induites par les psychostimulants. En effet, en augmentant la concentration de DA, les substances addictives modulent durablement la transmission glutamatergique au sein du striatum et entraînent ainsi un vaste répertoire d'adaptations moléculaires, morphologiques, synaptiques et comportementales. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels les drogues d'abus altèrent l'intégration des signaux dopaminergiques et glutamatergiques par les D1R-MSN et les D2R-MSN pour induire des altérations comportementales à long terme.

Mes recherches ont été guidées par les travaux fondateurs de deux de mes « prédécesseurs » au laboratoire. Vincent Pascoli a en effet précédemment établi que la synergie entre les voies de signalisation D1R et NMDAR convergeant sur la voie ERK jouait un rôle central dans les adaptations induites par la cocaïne (Pascoli et al. 2011). Emma Cahill a ensuite montré que l'interaction physique entre le D1R et le NMDAR était nécessaire à la facilitation des NMDAR par la DA, et à l'activation de ERK en aval des D1R et NMDAR (Cahill et al. 2014), alors que l'interaction D2R-NMDAR a été décrite comme responsable de l'inhibition des NMDAR par la DA (Liu et al. 2006).

Une hypothèse qui prédomine actuellement est que les drogues d'abus exerceraient leurs puissants effets renforçants en modulant de manière opposée l'activité des D1R-MSN et D2R-MSN. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de tester si **les hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR, en activant et inhibant l'activité des D1R-MSN et D2R-MSN, respectivement, pourraient jouer un rôle dans les réponses induites par la cocaïne, et ainsi représenter des cibles pharmacologiques potentielles pour le développement de stratégies thérapeutiques.**

Pour répondre à cette problématique, mes travaux se sont articulés en 3 axes :

- Étudier les effets de la cocaïne sur l'hétéromérisation de D1R-NMDAR et D2R-NMDAR *in vivo* dans le striatum de souris.
- Développer une approche permettant de bloquer la formation de ces hétéromères de façon contrôlée dans le temps afin de caractériser leurs rôles dans les différentes phases des réponses à long terme induites par la cocaïne.
- Déterminer si ces hétéromères étaient détectables dans le cerveau humain et s'ils étaient modulés chez des individus avec un historique de dépendance aux psychostimulants.

V. Résultats

A. Article

Differential roles of dopamine-glutamate receptor heteromers in discrete phases of cocaine-evoked adaptations

Andry Andrianarivelo¹⁻³, Estefani Saint-Jour¹⁻³, Paula Pousinha^{4,5}, Sebastian P Fernandez^{4,5}, Anna Petitbon⁶, Veronique De Smedt-Peyrusse⁶, Nicolas Heck¹⁻³, Vanesa Ortiz^{4,5}, Marie-Charlotte Allichon¹⁻³, Vincent Kappès¹⁻³, Sandrine Betuing¹⁻³, Roman Walle⁶, Ying Zhu⁷⁻⁸, Alexis Bemelmans⁹, Naguib Mechawar¹⁰, Jonathan A Javitch^{7,8,11}, Jocelyne Caboche¹⁻³, Pierre Trifilieff⁶, Jacques Barik^{4,5}, Peter Vanhoutte^{*1-3}

¹CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

²INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005, Paris, France

³Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

⁴Université Côte d'Azur, Nice, France

⁵Institut de Pharmacologie Moléculaire & Cellulaire, CNRS UMR7275, Valbonne, France

⁶Université Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, 33000, Bordeaux, France

⁷Division of Molecular Therapeutics, New York State Psychiatric Institute, New York, NY 10032, USA.

⁸Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

⁹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, MIRCen, and CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France.

¹⁰Douglas Mental Health University Institute, Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, QC, Canada.

¹¹Department of Pharmacology, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

*Correspondence should be addressed to Peter Vanhoutte: peter.vanhoutte@upmc.fr

1. ABSTRACT

Drugs of abuse trigger an enduring remodeling within the reward circuit, which hijacks reward processing and contributes to the development of addiction. These adaptations rely on an altered interplay between glutamate and dopamine (DA) signals within the nucleus accumbens (NAc). We demonstrate herein that this aberrant crosstalk induced by cocaine exposure depends on an increased interaction (heteromerization) between DA receptor 1 (D1R) and 2 (D2R) with glutamate NMDA receptors (NMDAR). In a time-dependent manner, we unraveled the differential roles of D1R/NMDAR and D2R/NMDAR heteromers within the NAc in the development and maintenance of cocaine responses. Strikingly, we found that preventing D2R interaction with NMDAR preferentially blocks the maintenance of the sensitizing and rewarding effects of cocaine, while sparing food reward processing. In post-mortem caudate putamen tissues from human subjects having suffered psychostimulant dependence, despite a sharp decrease of D2R protein expression, the proportion of D2R/NMDAR heteromers was three-fold higher compared to controls. These findings uncover molecular targets with putative therapeutic interest for the treatment of addiction.

2. INTRODUCTION

Like many psychiatric disorders, drug addiction is associated with impaired executive functions and reward processing. Alterations in these behavioral domains are linked to an imbalance of dopamine (DA) signals that shape glutamate transmission in the striatum, especially within its ventral part, the nucleus accumbens (NAc) (Emma Cahill et al., 2014; Laruelle, 2014; Lüscher and Malenka, 2011; Pascoli et al., 2014b; Pauls et al., 2014). Over the last decade, strong efforts have been spent in deciphering the sequences of events and molecular determinants associated with the dysregulated integration of accumbal DA and Glu signals. However, the specific molecular determinants of such interplay between DA and Glu transmission remain to be identified as it will potentially ground for the identification of more selective therapeutic strategies for the treatment of addiction. In fact, to date, targeting these neurotransmitter systems independently leads to a loss of efficacy over time and the appearance of severe side effects likely due to their implication in fundamental physiological functions (Emma Cahill et al., 2014).

In this context, receptor heteromers are of particular interest, notably because of their ability to dynamically modulate the component receptor's functions in time and space. Importantly, they also carry functional properties distinct from the component receptors, which make them attractive targets for the development of more selective pharmacological strategies (Andrianarivelo et al., 2019; Borroto-Escuela et al., 2017a; Ferré et al., 2011; Fuxe et al., 2014; Salery et al., 2019; Wang et al., 2012b). In particular, DA and glutamate NMDA (NMDAR) receptor heteromers hold strong relevance as integrators of DA and Glu signals converging onto dendritic spines of the two segregated subpopulations of striatal medium-sized spiny neurons (MSN), expressing either D1 (D1R) or D2 (D2R) DA receptors. Indeed, even though it is currently a matter of debate (Soares-Cunha et al., 2019, 2018), a prevailing hypothesis is that the surge of DA evoked by drugs of abuse facilitates D1R-MSN activation through stimulation of the D1R, which promotes reinforcement, whereas D2R-mediated inhibition of D2R-MSN prevents their so-called anti-reward action (Bock et al., 2013; Hikida et al., 2010; Kravitz et al., 2012; Lobo et al., 2010a; Lobo and Nestler, 2011; Salery et al., 2019; Volkow and Morales, 2015). Yet, D1R-NMDAR heteromers have been shown to mediate the potentialisation of NMDA currents by DA in D1R-MSN (E. Cahill et al., 2014), while D2R-GluN2B interaction is necessary for DA-mediated NMDAR inhibition in D2R-MSN (Liu et al., 2006). Therefore, we hypothesized that the recruitment of these heteromers, by potentiating and inhibiting the activity of D1R-MSN and D2R-MSN, respectively, could contribute to the allostatic overload triggered by psychostimulants.

Although DAR-NMDAR heteromers have great therapeutic potential, most evidence generated to date regarding their functions come from *in vitro* and *ex vivo* studies. We therefore studied the modulation endogenous D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers *in vivo* and highlighted their differential roles in the development and maintenance of cocaine-evoked long-lasting adaptations in mice. Strikingly, we were able to detect heteromers in human brain samples and show that they are modulated in psychostimulant-dependent subjects .

3. RESULTS

Behavioral sensitization to cocaine is associated with DAR-NMDAR heteromerization in the NAc

As a first step towards studying the implication of DAR-NMDAR heteromers in long-lasting adaptations to cocaine, we tested whether a cocaine regimen known to trigger persistent behavioral alterations could modulate the formation of these receptor heteromers in the striatum. A cohort of mice was injected daily with saline or cocaine (15mg/kg) for five days. This repeated cocaine administration triggered a significant locomotor sensitization (**Fig.1a**) that is known to persist over time as it is still observed after re-exposure to cocaine several days or weeks later (Robinson and Berridge, 1993). Saline and cocaine-treated mice were sacrificed one day after the last injection to detect endogenous DAR-NMDAR heteromers in distinct striatal sub-regions through Proximity Ligation Assay (PLA) (Trifilieff et al., 2011). The bright-field PLA detection of D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers appears as a brown punctate signal that is absent when one of the two primary antibodies is omitted (**Fig.1b**). Using this approach, we found that cocaine-treated mice displayed increased D1R-GluN1 heteromerization in the dorso-lateral (DL Str) and dorso-medial (DM Str) striatum, as well as in the nucleus accumbens core (NAc core) and shell (NAc shell) sub-divisions (**Fig.1c**). Cocaine also favored D2R-GluN2B heteromerization primarily in the NAc, with a mild, but significant, effect in the DL Str (**Fig.1d**). This increased heteromerization occurred independently of changes in global expression levels of partner receptors (**Supplementary Fig.1a,b**). Of note, and as previously observed (Yao et al., 2004), repeated cocaine exposure decreases expression levels of the synaptic scaffold protein PSD-95 (**Supplementary Fig.1c**), which could partly explain our results as PSD-95 has been described as an endogenous inhibitor of D1R-GluN1 interaction (Zhang et al., 2009). Altogether, these data demonstrate that behavioral sensitization to cocaine is associated to D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromerization in the striatum.

Cocaine-evoked long-term striatal synaptic plasticity requires D1R-GluN1 interaction.

To study the function of the D1R-GluN1 heteromers in cocaine-induced adaptations, we designed an adeno-associated virus (AAV)-based strategy to disrupt heteromers in a spatial- and time-

controlled manner (**Fig.2a**). This AAV-Tet-On-GluN1C1 allows a doxycycline (dox)-inducible bicistronic expression of the RFP reporter protein together with a peptide corresponding to the C1 cassette (D₈₆₄-T₉₀₀) of GluN1 that binds to D1R (Lee et al., 2002). This peptide disrupts D1R-GluN1 interaction *in vitro*, while preserving the functions of individual D1R and NMDAR independently of their heteromerization (E. Cahill et al., 2014). As a control, we used the AAV Tet-On-GluN1C1Δ that encodes the C1 cassette deleted from 9 amino acids required for electrostatic interactions between D1R and GluN1 (Woods et al., 2005a), which does not interfere with D1R-GluN1 interaction *in vitro* (E. Cahill et al., 2014). Two weeks after stereotaxic injections in the NAc, the addition of dox in the drinking water triggered a rapid and sustained expression of RFP (**Fig.2a**). The analysis of D1R-GluN1 proximity in RFP-positive neurons showed that Tet-On-GluN1C1 drastically reduced D1R-GluN1 interaction when compared to the control AAV (**Fig.2b,c**), indicating an efficient disruption of these heteromers *in vivo*. We also validated that blocking D1R-GluN1 interaction altered downstream cocaine-mediated signaling events (E. Cahill et al., 2014; Pascoli et al., 2011), including GluN2B phosphorylation and extracellular-signal regulated kinase (ERK) pathway activation (**Supplementary Fig.2**), without compromising neuronal survival (**Fig.2d**).

Long-lasting changes of glutamate transmission at cortical projections onto D1R-MSN of the NAc have been causally involved in the development of cocaine-induced locomotor sensitization (Pascoli et al., 2012). To evaluate the contribution of D1R-GluN1 heteromers in drug-induced plasticity at these synapses, we injected AAV-Tet-On-GluN1C1, or related control, together with a mix of AAV-PPTA-Cre and AAV-DIO-eGFP to virally tag D1R-MSN (Dos Santos et al., 2017; Hikida et al., 2010; Yagishita et al., 2014) (**Supplementary Fig.3a**). Injected mice were supplemented with dox before and during daily injections of saline or cocaine for 5 days (5d) followed by 10d of withdrawal (**Fig.2e**). As previously shown (Terrier et al., 2016), we observed that cocaine triggered an increase of AMPA/NMDA (A/N) ratio – an index of synaptic plasticity - in D1R-MSN of mice injected with the control virus in the NAc. By contrast, while preserving basal synaptic transmission in the saline-treated group, the uncoupling of D1R from GluN1 blunted cocaine-evoked increase in A/N ratio (**Fig.2f**), without modifying neither amplitude (**Fig.2g**) nor kinetics of NMDAR EPSCs (**Fig.2h**). This

shows that D1R-GluN1 heteromers control cocaine-evoked changes in glutamate transmission in D1R-MSN.

D1R-GluN1 heteromers control the development of cocaine-induced locomotor sensitization

In light of the marked implication of D1R-GluN1 heteromers in the cellular changes engendered by cocaine, we next evaluated their role in the behavioral sensitizing properties of cocaine. For this, Tet-On-AAV-injected mice were supplemented with dox prior and during saline or cocaine administration. The uncoupling of D1R from GluN1 did not affect neither basal locomotion (**Fig.2i**), nor the acute hyperlocomotor response triggered by the first cocaine injection, but fully blocked behavioral sensitization induced by subsequent injections (**Fig.2j**). Of note, dox supplementation did not alter body weight, basal locomotion and behavioral sensitization to cocaine in mice that were not injected with Tet-On viruses (**Supplementary Fig.4**).

Owing to the time-controlled expression of the interfering peptides, we then assessed the contribution of D1R-GluN1 heteromers in the maintenance phase of locomotor sensitization. To do so, mice injected with Tet-On viruses were treated with saline or cocaine for 5d in the absence of dox. As expected, these mice displayed a similar cocaine-induced locomotor sensitization regardless of the virus injected. To switch off D1R-GluN1 interaction after behavioral sensitization, dox was given after the last saline or cocaine injection and during a 7-day withdrawal period followed by a challenge injection of saline or cocaine. We found that mice displayed the same level of sensitization in response to the cocaine challenge regardless of the AAV used, demonstrating that D1R-GluN1 heteromers are not involved in the maintenance of locomotor sensitization (**Fig.2k**). Since cocaine also favored D1R-GluN1 heteromerization in the dorsal striatum (**see Fig.1c**), we repeated the same behavioral studies by targeting heteromers in this striatal sub-region and obtained the same results (**Supplementary Fig. 5**). Overall, these data show that cocaine-mediated formation of D1R-GluN1 heteromers in the striatum controls cocaine-evoked changes in glutamate transmission in D1R-MSN and the development, but not maintenance, of cocaine sensitizing effects.

D2R-GluN2B heteromers are specifically required for the maintenance of cocaine sensitizing effects

In light of the significant impact of cocaine on D2R-GluN2B formation in the NAc (**Fig.1d**), we designed the AAV-Tet-On-D2R-IL3 that allows a dox-inducible expression of a small fragment of the 3rd intracellular loop (T₂₂₅-A₂₃₄) of D2R that binds to GluN2B (Liu et al., 2006). Since critical amino acids responsible for D2R-GluN2B interaction have not been yet identified within this D2R-IL3 fragment, we used a control virus (AAV-Tet-On-D2R-IL3-scr) driving the expression of a scramble peptide (**Fig.3a**). The AAV-Tet-On-D2R-IL3 efficiently reduced D2R-GluN2B interaction (**Fig.3b**), while sparing the functions of individual component receptors, as shown by its lack of effect on both D2R-mediated inhibition of cAMP production *in vitro* (**Supplementary Fig.6**) and preserved neuronal survival (**Fig.3d**).

Since repeated cocaine exposure does not modify A/N ratio in D2R-MSN (Terrier et al., 2016), the consequences of uncoupling D2R from GluN2B was studied on saline-treated animals in virally-tagged D2R-MSN owing to the co-injection of AAV-DIO-eGFP and AAV-PPE-Cre (Hikida et al., 2010) (**Supplementary Fig.3b**). Blockade of D2R-GluN2B heteromers does not alter, by itself, A/N ratio in D2R-MSN when compared to D2R-MSN transduced with the control virus. Of note, AAV-Tet-On-D2R-IL3 also left unchanged the amplitude and kinetics of NMDA currents (**Fig.3g, h**), indicating a lack of any non-specific effect on individual NMDAR functions, hence validating our interfering viral strategy.

At the behavioral level, disrupting D2R-GluN2B heteromers preserved both basal locomotion (**Fig.3i**) and cocaine-induced locomotor sensitization (**Fig.3j**). However, in contrast to what we observed for D1R-GluN1 heteromers, switching off D2R-GluN2B interaction during cocaine withdrawal in mice that have developed cocaine-induced locomotor sensitization significantly reduced the maintenance of the sensitization compared to cocaine-treated mice injected with the control virus (**Fig.3k**). Mice were then sacrificed to study expression levels of Δ FosB, used here as a proxy for neuronal activity. We observed a significant increase of D2R-MSN expressing Δ FosB after the cocaine challenge upon disruption of D2RGluN2B interaction (**Fig.3l,m**), suggesting an increased activity of D2R-MSN in

mice displaying an altered maintenance of sensitizing effects of cocaine as a consequence of D2R-GluN2B uncoupling.

Altogether, these data demonstrate D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers control the development and maintenance of cocaine sensitizing effects, respectively.

Differential roles of D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers in controlling rewarding effects of cocaine.

We next interrogated the implication of these heteromers in the rewarding effects of cocaine using a conditioned place preference (CPP) paradigm. Mice injected in the NAc with a control virus and supplemented with dox developed a significant cocaine-induced CPP, which was blunted when D1R and GluN1 were uncoupled (**Fig.4a**). Although single or repeated cocaine administration has been shown to trigger dendritic spine formation in D1R-MSN (Dos Santos et al., 2017; Kim et al., 2011), there is no study showing such morphological changes in the NAc in the context of CPP. Mice were thus sacrificed the day after the behavioral test to perform a 3D morphological analysis of GFP-tagged D1R-MSN. Control mice, which developed cocaine CPP, displayed a significant increase of dendritic spine density in D1R-MSN, which was inhibited when D1R and GluN1 were uncoupled (**Fig.4b**). To estimate the role of D1R-GluN1 heteromers on relapse to CPP, injected mice were initially trained for CPP in absence of dox. Once mice have developed CPP, dox was added to switch off D1R-GluN1 interaction during an extinction period followed by a cocaine-induced relapse. D1R-GluN1 disruption did not alter the kinetics of extinction, nor the relapse to CPP (**Fig.4c**), thus supporting a preferential role of D1R-GluN1 heteromers in the development the rewarding effects of cocaine, as observed for locomotor sensitization (**Fig.2j,k**).

The uncoupling of D2R from GluN2B also blocked the development of cocaine CPP (**Fig.4d**). but this was not correlated to morphological changes in D2R-MSN since CPP did not trigger any change in dendritic spine density in D2R-MSN regardless of the AAV used (**Fig.4e**). By contrast, blocking D2R-GluN2B interaction once the mice have developed CPP drastically reduced cocaine-induced relapse (**Fig.4f**). This indicates that D2R-GluN2B heteromers are required for both development and relapse of cocaine-induced CPP, independently of morphological changes in GFP-tagged D2R-

MSN. By contrast, and as observed for behavioral sensitization, D1R-GluN1 interaction is selectively involved in the development phase of the rewarding effects of cocaine.

Uncoupling D1R-GluN1 or D2R-GluN2B heteromers does not alter conditioned place preference for food.

Manipulating D1R-GluN1 or D2R-GluN2B heteromerization *in vivo* allows altering distinct phases of long-term adaptations induced by drugs of abuse, including the rewarding effects of cocaine. We next examined whether these heteromers could also control non-drug reward processing. We found that disrupting either heteromer subtype did not alter the rewarding properties of food (**Fig.5**), supporting a preferential implication of these heteromers in controlling the rewarding effects of cocaine over a non-drug reward.

D2R-GluN2B heteromers are increased in post-mortem brain samples from addict subjects despite decreased D2R expression.

As evidenced above, D2R-GluN2B heteromers play a cardinal role in the maintenance of cocaine's effects in mice, which posits these heteromers as preferential targets in a therapeutic perspective. We thus studied whether such heteromers are similarly modulated in subjects with a history of psychostimulant dependence.

PLA has recently been shown as a suitable approach for the detection of single proteins or receptor heteromers, including D2R-A2AR, from human brain samples (Zhu et al., 2020, 2019). We therefore performed single detection of D2R and GluN2B as well as D2R-GluN2B heteromers in human samples from control subjects and individuals with a history of dependence. Although often poly-addicts, these individuals were chosen for their main dependence to psychostimulants and the presence of traces of psychostimulants in their blood at the time of death (**Supplementary Table 1**). From whole-slide images of caudate putamen samples, automated detection of PLA signal was performed from 25 high-magnification images per subjects randomly selected within the ventral part of the samples, which corresponds to the mouse NAc (**Supplementary Fig.7**).

D2R single detection produced a dense punctate pattern in control subjects (**Fig.6a**), as already reported (Zhu et al., 2019). As expected, this signal was absent when PLA was performed in the

absence of the primary antibody. Interestingly, we detected a significant decrease of relative D2R expression compared to control subjects (**Fig.6b**), which is consistent with the well-established decrease of striatal D2R availability reported in psychostimulant abusers by PET imaging (Koob and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017a; Volkow et al., 1990, 2011, 1999). By contrast, GluN2B single detection produced a dense GluN2B signal that was not different in addict and control samples (**Fig.6c,d**). The double recognition of D2R-GluN2B proximity yielded a punctate signal in control subjects, which also was undetectable when one of the two primary antibodies was omitted (**Fig.6e**). In samples from addicts, there was a trend towards an increase of D2R-GluN2B heteromers in samples from addicts (**Fig.6f**), despite the drastic decrease of D2R levels (**Fig.6a**). We therefore analyzed whether a correlation between D2R levels and D2R-GluN2B heteromerization could exist within each addict sample. We found a significant inverse correlation between these two parameters (**Fig.6g**), suggesting that despite the lower levels of D2R expression in addicts, at least a remaining pool of D2R was preferentially involved in D2R-GluN2B heteromerization. By contrast, there was no correlation between GluN2B expression and D2R-GluN2B heteromerization (**Fig.6h**). Considering the decreased D2R levels in samples from addicts, we normalized the D2R-GluN2B PLA signal to D2R levels for each individual and found a sharp significant increase in relative D2R heteromerization in samples from addicts when compared to controls (**Fig.6i**). To the best of our knowledge these results provide the first evidence of a decreased D2R protein expression levels in the striatum of psychostimulant addicts, which is associated with an increase of D2R-GluN2B heteromerization. Together with our interventional approach in mice, our data support that D2R-GluN2B heteromers may represent therapeutic targets of potential interest in addiction.

4. DISCUSSION

Although multiple evidence indicate that distinct components of drug addiction rely on DA-evoked synaptic adaptations at specific glutamate inputs onto MSN subpopulations (Creed et al., 2016; MacAskill et al., 2014; Pascoli et al., 2018, 2014c, 2012), the underlying molecular mechanisms remain poorly understood (Salem et al., 2019). Identification of events underpinning such imbalance of DA and glutamate signaling is crucial for the development of innovative strategies with therapeutic potentials. Herein, we provide multiple evidence, from mice to humans, that heteromers formed by

glutamate NMDAR and DA D1R or D2R are modulated by psychostimulants and differentially control the development and maintenance phases of cocaine-evoked long-term adaptations.

The focus on receptor heteromers as potential mediators of drugs of abuse adaptations stems from patch-clamp recording on striatal slices showing that D1R-GluN1 and D2R-GluN2B interactions facilitate and inhibit NMDAR-mediated signaling by DA, respectively (E. Cahill et al., 2014; Liu et al., 2006). We reasoned that, by linking DA to glutamate signaling in opposite ways, these heteromers could constitute molecular substrates for drugs of abuse to exert their differential effects on the activity of MSN subtypes, which has been proposed to underlie the switch from recreative drug consumption to addiction (Lobo and Nestler, 2011; Volkow and Morales, 2015). Accordingly, we found that repeated cocaine exposure upregulates both heteromer subtypes in the NAc (**Fig.1**). In-depth characterization of molecular events responsible for the potentialisation of heteromerization upon cocaine exposure is beyond the scope of this study, which aims primarily at defining their functions in drug-mediated adaptations. However, a possible explanation may lie in the observation that repeated cocaine exposure decreases PSD-95 expression in the NAc (**see Suppl Fig.1c**) (Yao et al., 2004). In fact, PSD-95 is a known endogenous inhibitor of D1R-GluN1 interaction (Zhang et al., 2009) that also binds to both D2R (P. Sun et al., 2009a) and GluN2B c-terminus end (Paoletti et al., 2013). Even though the PLA approach used in this study is a reliable technique to provide a snapshot of the impact of cocaine on receptor heteromerization *in situ* in their native environment (E. Cahill et al., 2014; Frederick et al., 2015; Trifilieff et al., 2011), future work is needed to investigate whether heteromerization of DA and NMDA receptors is an input-specific process and whether it relies on modulation of receptor surface expression and/or dynamics.

The development of cocaine locomotor sensitization has been causally linked to potentialisation of glutamate transmission at cortical projections onto D1R-MSN of the NAc (Pascoli et al., 2012). Since preventing heteromerization of D1R and GluN1 reverses both alterations in A/N ratio and the development of behavioral sensitization, while sparing the activity of individual component receptors (see (E. Cahill et al., 2014); **Fig.2&3**; **Suppl.Fig.2&6**), our results suggest that D1R-GluN1 heteromers are central molecular platform for the development cocaine-induced long-term adaptations (**Fig.2**). Accordingly, optogenetic inhibition of NAc D1-MSN decreases locomotor sensitization (Chandra et al., 2013). In contrast, disrupting D1R-GluN1 interaction during a

withdrawal from cocaine spared the maintenance of the sensitized state, supporting a preferential role this heteromer subtype in initial phases of cocaine-mediated adaptations. In agreement with this hypothesis, we observed that preventing D1R-GluN1 heteromerization during CPP conditioning also blocked the development of the rewarding effects of cocaine, but failed to alter the extinction and relapse phases (**Fig.4**). In striking contrast, the disruption of D2R-GluN2B heteromers emphasized their preferential implication in the maintenance of the sensitizing and rewarding effects of cocaine (**Fig.3&4**). These observations are in accordance with the work of Song and colleagues (Song et al., 2014) who showed that optogenetic activation of D2R-MSNs in the NAc preserves cocaine-induced locomotor sensitization but blunts its expression after withdrawal. This suggests that inhibiting endogenous D2R-GluN2B interaction during withdrawal hinders the persistence of cocaine sensitizing and rewarding effects by potentiating D2R-MSN activity. In support of this hypothesis, preventing D2R-GluN2B heteromerization has been shown to blunt DA-mediated inhibition of NMDA currents (Liu et al., 2006) and the alteration of the maintenance phase of locomotor sensitization observed upon D2R-GluN2B heteromer disruption was associated with an ectopic expression of Δ FosB in D2R-MSN (**Fig.3l,m**).

These observations contrast with studies based on cell-type-specific modulations of MSN activity, which support a dichotomic model of basal ganglia functions whereby D1R-MSN and D2R-MSN activation favors and dampens reinforcement, respectively (Bock et al., 2013; Durieux et al., 2009; Hikida et al., 2010; Lobo et al., 2010a; Sallery et al., 2019). The time-controlled inhibition of endogenous receptors heteromerization revealed here that molecular events taking place concomitantly in both MSN populations rather play complementary roles to mediate the full panel of cocaine-induced adaptations. This is in line with recent findings showing that a coordinated activation both MSN subpopulation is required to build a proper motor program in freely moving mice engaged in a reward-oriented actions (Cui et al., 2013; Tecuapetla et al., 2016; Vicente et al., 2016).

Further supporting specific functions of DA and glutamate receptor heteromers, we demonstrate that their implication in shaping reward processing depends on the nature of the reward since the disruption of receptor interactions in either MSN subtype blocked cocaine-induced CPP but spared food-mediated CPP (**Fig.5**). The mechanisms underlying such selectivity to drug reward remain to be established. Nonetheless, such peculiarity makes them promising targets to preferentially

alleviate pathological adaptations induced by drugs of abuse. In particular, the lack of effect on reward processing to a natural reinforcer, added to its specific implication in the maintenance of cocaine-induced adaptations, posit D2R-GluN2B heteromers as a target of choice in a translational stand point. This led us to investigate whether this heteromer subtype could be detected in human samples and modulated in subjects with history of dependence psychostimulant.

Our PLA analysis revealed a strong diminution of D2R protein levels in the NAc of drug abusers **(Fig.6)**. With the “single PLA” approach, the polyclonal secondary antibodies can bind to either a single primary antibody – therefore detecting a single antigen on the D2R – or to two different primary antibodies bound to proximal antigens – potentially revealing D2R homodimers. However, the latter is likely to be largely less efficient and we assume that the single PLA signal in our study mainly reflects density of single D2R (Zhu et al., 2019). To the best of our knowledge, this finding constitutes the first demonstration of a decreased D2R protein expression in post-mortem brain samples from addicts. This is in agreement with the downregulation of D2R mRNA levels that has been described after long-term cocaine exposure in rats (Belin et al., 2013). Importantly, this could also partly account of the decrease in D2R binding readily observed found with PET imaging in the striatum of drug abusers (Koob and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017a; Volkow et al., 1990, 1999, 2011). Despite such downregulation of D2R protein contents, the proportion of D2R forming heteromers with GluN2B was three-fold higher in psychostimulant abusers compared to healthy subjects. Strikingly, addict individuals bearing the lowest D2R expression displayed the highest density of D2R-GluN2B. This raises questions regarding the underlying molecular mechanism of D2R-GluN2B formation in response to psychostimulant. Nevertheless, the increased formation of D2R-GluN2B heteromers we observed in human samples from psychostimulant abusers, combined with interventional approach in mice highlighting their roles in the persistence of cocaine behavioral effects, strongly argue in favor of D2R-GluN2B interaction being a target with therapeutic potential. These important findings constitute a significant breakthrough in the understanding of molecular bases of cocaine-induced adaptations and highlight the potential benefit of targeting D2R-GluN2B heteromers, not only in the field of addiction, but also potentially for the vast spectrum of psychiatric disorders associated with an imbalance of DA and glutamate transmission.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) ; the Institut National de la Santé et de le Recherche Médicale National (INSERM) ; Sorbonne Université, Faculté des Sciences et Ingénierie ; Université de Bordeaux ; Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) ; Université Côte d'Azur ; the Agence Nationale pour la Recherche (ANR ; ANR-15-CE16-001 to P.V and P.T ; ANR-18-CE37-0003-02 to J.B and P.V ; ANR-10-IDEX-03-02 and ANR-16-CE16-0022 to P.T) ; the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ;DPA20140629798 to J.C ; FRM DEQ20180339159 to J.B.) ; NARSAD Young Investigator Grants from the Brain and Behavior Foundation (to P.T) ; the BioPsy labex excellence cluster (to J.C and P.V) ; the labex BRAIN (to P.T). A.A and R.W are recipients of PhD fellowship from the French Ministry of Research; A.P is the recipient of a PhD fellowship from the "Ecole Universitaire de Recherche" (*EUR Neuro*, Bordeaux Neurocampus); E.S.J is the recipient of a fourth-year PhD fellowship from the FRM. Authors would like to thank the imaging facility of the IBPS and the histology facility of the Institut du Cerveau et de Moëlle épinière (ICM).

AUTHORS CONTRIBUTION

A.A performed most PLA, viral injections, behavioral studies, immunohistochemistry, confocal imaging, biochemistry and statistical analysis with the help of E.S.J; M.C.A; V.K; S.B, V.O and R.W. Dendritic spines analysis was performed by N.H and A.A. Electrophysiological recordings were performed by P.P and S.P.F. Viruses were designed by P.V and A.B and produced by A.B. A.P and V.S.P performed cAMP assays. N.M selected and provided human samples. Y.Z and J.J helped A.A for PLA experiments from human tissues and related quantifications. A.A; J.C; P.T; J.B and P.V designed experiments and wrote the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing interests

6. REFERENCES

1. Lüscher, C. & Malenka, R. C. Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron* 69, 650–663 (2011).
2. Laruelle, M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current Opinion in Pharmacology* 14, 97–102 (2014).
3. Pauls, D. L., Abramovitch, A., Rauch, S. L. & Geller, D. A. Obsessive–compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci* 15, 410–424 (2014).
4. Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J. & Vanhoutte, P. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 Activation by Addictive Drugs: A Signal Toward Pathological Adaptation. *Biological Psychiatry* 76, 917–926 (2014).
5. Cahill, E., Salery, M., Vanhoutte, P. & Caboche, J. Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Frontiers in Pharmacology* 4, (2014).
6. Ferré, S. et al. Adenosine A(2A) Receptors and A(2A) Receptor Heteromers as Key Players in Striatal Function. *Front Neuroanat* 5, 36 (2011).
7. Wang, M., Wong, A. H. & Liu, F. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Research* 1476, 154–163 (2012).
8. Fuxe, K. et al. Moonlighting Proteins and Protein–Protein Interactions as Neurotherapeutic Targets in the G Protein-Coupled Receptor Field. *Neuropsychopharmacology* 39, 131–155 (2014).
9. Borroto-Escuela, D. O. et al. Understanding the Role of GPCR Heteroreceptor Complexes in Modulating the Brain Networks in Health and Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11, (2017).
10. Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P. & Vanhoutte, P. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology* 152, 42–50 (2019).
11. Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J. & Vanhoutte, P. From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type–Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biological Psychiatry* (2019) doi:10.1016/j.biopsych.2019.11.001.
12. Soares-Cunha, C. et al. Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-MSN-Driven Increase in Motivation. *eNeuro* 5, (2018).

13. Soares-Cunha, C. et al. Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol. Psychiatry* (2019) doi:10.1038/s41380-019-0484-3.
14. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. & Nakanishi, S. Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron* 66, 896–907 (2010).
15. Lobo, M. K. et al. Cell Type–Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330, 385–390 (2010).
16. Lobo, M. K. & Nestler, E. J. The Striatal Balancing Act in Drug Addiction: Distinct Roles of Direct and Indirect Pathway Medium Spiny Neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 5, (2011).
17. Kravitz, A. V., Tye, L. D. & Kreitzer, A. C. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience* 15, 816–818 (2012).
18. Bock, R. et al. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nature Neuroscience* 16, 632–638 (2013).
19. Volkow, N. D. & Morales, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 162, 712–725 (2015).
20. Cahill, E. et al. D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19, 1295–1304 (2014).
21. Liu, X.-Y. et al. Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron* 52, 897–909 (2006).
22. Robinson, T. E. & Berridge, K. C. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* 18, 247–291 (1993).
23. Trifilieff, P. et al. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotech* (2011) doi:10.2144/000113719.
24. Yao, W.-D. et al. Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. *Neuron* 41, 625–638 (2004).
25. Zhang, J. et al. PSD-95 Uncouples Dopamine-Glutamate Interaction in the D1/PSD-95/NMDA Receptor Complex. *Journal of Neuroscience* 29, 2948–2960 (2009).

26. Lee, F. J. S. et al. Dual Regulation of NMDA Receptor Functions by Direct Protein-Protein Interactions with the Dopamine D1 Receptor. *Cell* 111, 219–230 (2002).
27. Woods, A. S. et al. Role of Electrostatic Interaction in Receptor–Receptor Heteromerization. *Journal of Molecular Neuroscience* 26, 125–132 (2005).
28. Pascoli, V. et al. Cyclic Adenosine Monophosphate–Independent Tyrosine Phosphorylation of NR2B Mediates Cocaine-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Biological Psychiatry* 69, 218–227 (2011).
29. Pascoli, V., Turiault, M. & Lüscher, C. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71–75 (2012).
30. Yagishita, S. et al. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620 (2014).
31. Dos Santos, M. et al. Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biological Psychiatry* 82, 806–818 (2017).
32. Terrier, J., Lüscher, C. & Pascoli, V. Cell-Type Specific Insertion of GluA2-Lacking AMPARs with Cocaine Exposure Leading to Sensitization, Cue-Induced Seeking and Incubation of Craving. *Neuropsychopharmacology* 41, 1779–1789 (2016).
33. Kim, J., Park, B.-H., Lee, J. H., Park, S. K. & Kim, J.-H. Cell Type-Specific Alterations in the Nucleus Accumbens by Repeated Exposures to Cocaine. *Biological Psychiatry* 69, 1026–1034 (2011).
34. Zhu, Y. et al. Detecting G protein-coupled receptor complexes in postmortem human brain with proximity ligation assay and a Bayesian classifier. *BioTechniques* 68, 122–129 (2019).
35. Zhu, Y., Dwork, A. J., Trifilieff, P. & Javitch, J. A. Detection of G Protein-Coupled Receptor Complexes in Postmortem Human Brain by Proximity Ligation Assay. *Current Protocols in Neuroscience* 91, e86 (2020).
36. Volkow, Fowler, Wolf & Henn. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *AJP* 147, 719–724 (1990).
37. Volkow, N. D. et al. Prediction of Reinforcing Responses to Psychostimulants in Humans by Brain Dopamine D2 Receptor Levels. *AJP* 156, 1440–1443 (1999).

38. Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D. & Telang, F. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15037–15042 (2011).
39. Koob, G. F. & Volkow, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry* 3, 760–773 (2016).
40. Trifilieff, P., Ducrocq, F., van der Veldt, S. & Martinez, D. Blunted Dopamine Transmission in Addiction: Potential Mechanisms and Implications for Behavior. *Semin Nucl Med* 47, 64–74 (2017).
41. Pascoli, V. et al. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509, 459–464 (2014).
42. MacAskill, A. F., Cassel, J. M. & Carter, A. G. Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience* 17, 1198–1207 (2014).
43. Creed, M., Ntamati, N. R., Chandra, R., Lobo, M. K. & Lüscher, C. Convergence of Reinforcing and Anhedonic Cocaine Effects in the Ventral Pallidum. *Neuron* 92, 214–226 (2016).
44. Pascoli, V. et al. Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* 564, 366–371 (2018).
45. Sun, P. et al. PSD-95 regulates D1 dopamine receptor resensitization, but not receptor-mediated Gs-protein activation. *Cell Res* 19, 612–624 (2009).
46. Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383–400 (2013).
47. Frederick, A. L. et al. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Molecular Psychiatry* 20, 1373–1385 (2015).
48. Chandra, R. et al. Optogenetic inhibition of D1R containing nucleus accumbens neurons alters cocaine-mediated regulation of Tiam1. *Front. Mol. Neurosci.* 6, (2013).
49. Song, S. S. et al. Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization. *Front. Behav. Neurosci.* 8, (2014).
50. Durieux, P. F. et al. D 2 R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci* 12, 393–395 (2009).

51. Cui, G. et al. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242 (2013).
52. Vicente, A. M., Galvão-Ferreira, P., Tecuapetla, F. & Costa, R. M. Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Current Biology* 26, R267–R269 (2016).
53. Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q. & Costa, R. M. Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166, 703–715 (2016).
54. Belin, D., Belin-Rauscent, A., Murray, J. E. & Everitt, B. J. Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology* 23, 564–572 (2013).
55. Lobo, M. K. et al. Δ FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *J. Neurosci.* 33, 18381–18395 (2013).
56. Dumais, A. et al. Risk Factors for Suicide Completion in Major Depression: A Case-Control Study of Impulsive and Aggressive Behaviors in Men. *AJP* 162, 2116–2124 (2005).
57. Mai, J. K., Paxinos, G. & Voss, T. *Atlas of the human brain.* (Elsevier, Acad. Press, 2008).
58. Michino, M. et al. A Single Glycine in Extracellular Loop 1 Is the Critical Determinant for Pharmacological Specificity of Dopamine D2 and D3 Receptors. *Mol Pharmacol* 84, 854–864 (2013).

7. FIGURES

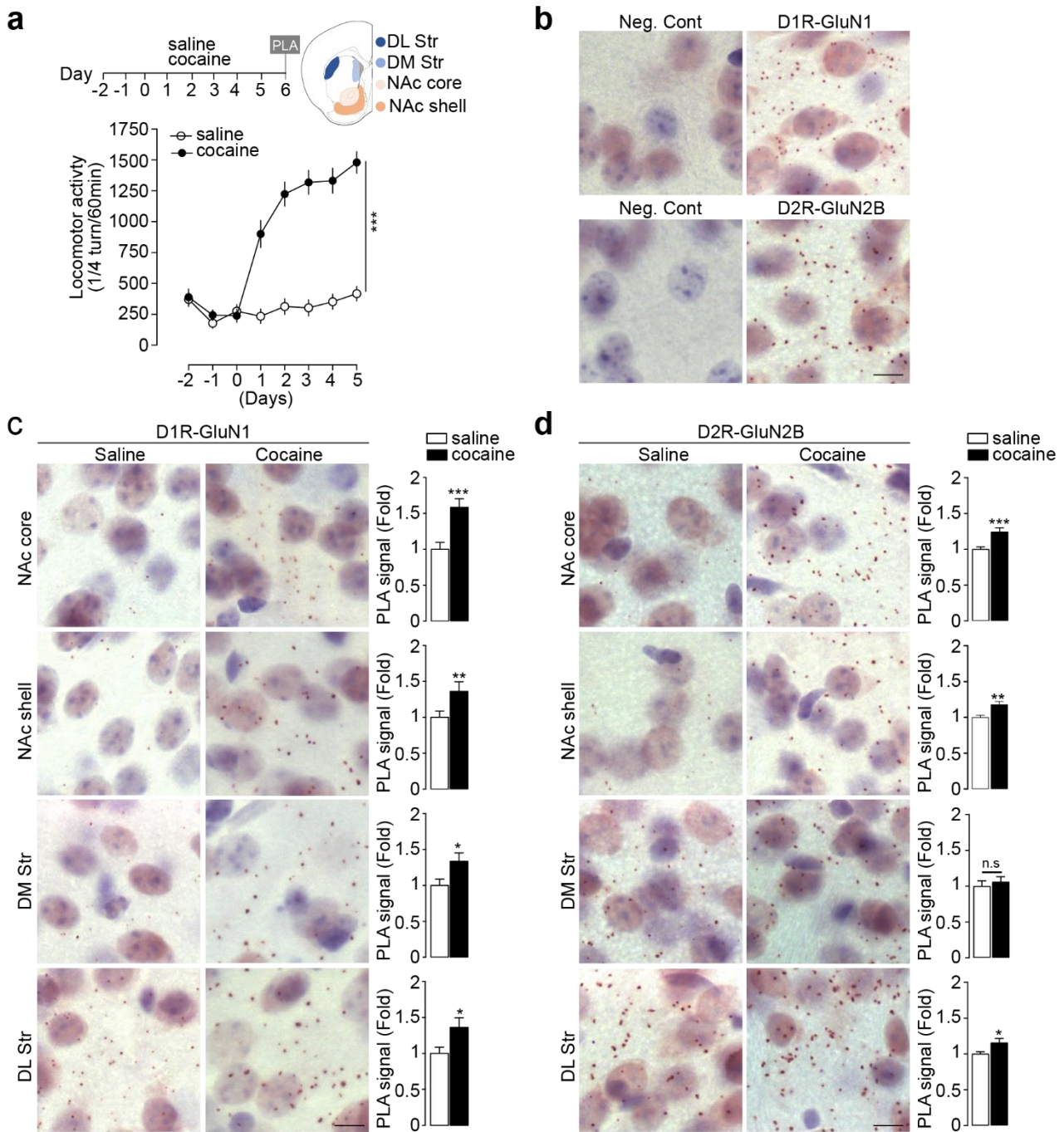


Figure 1 Repeated cocaine exposure triggers D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromerization in the NAc. **(a)** Experimental time frame (DL Str: dorso-lateral striatum; DM Str dorso-medial striatum; nucleus accumbens core (NAc core) and shell (NAc shell) subdivisions and measurement of locomotor activity prior (habituation) and during 5 days of saline or cocaine (15 mg/kg) injections. Two-way ANOVA, treatment effect, $F(1, 24) = 67.79$, $*** P < 0.0001$ saline vs cocaine locomotion on day 5, $n=13$ mice/group. **(b)** Illustrative images of D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers

detection PLA and related negative (Neg.Cont) showing the absence of signal when one primary antibody is omitted. Detection and quantifications of (c) D1R-GluN1 and (d) D2R-GluN2B heteromers in saline- and cocaine-treated groups in striatal sub-regions. PLA signal is represented as fold increase normalized to the saline group. Two-sided Student's *t*-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ saline vs cocaine, $n=28-84$ fields of view per structure (NAc core: 4, NAc shell: 12; DM: 6, DL: 6, fields of view per mice) from 7 mice/group. (b-d) scale bar: 10 μm . Error bars denote s.e.m.

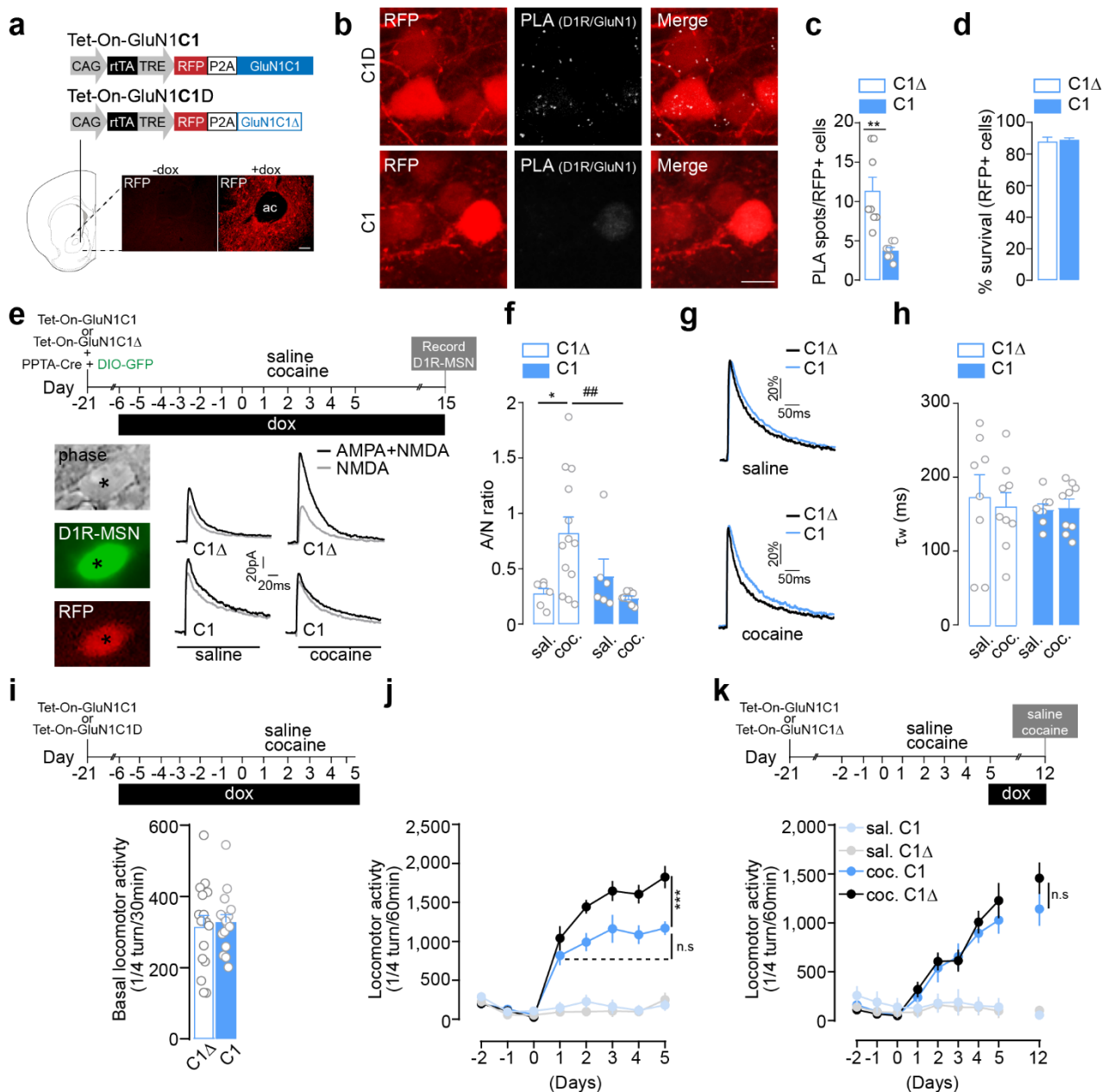


Figure 2 D1R-GluN1 heteromers control cocaine-evoked synaptic plasticity in D1R-MSN and the development of behavioral sensitization. **(a)** Virus used to disrupt D1R-GluN1 interaction (Tet-On-GluNC1; C1) and control (Tet-On-GluN1C1Δ; C1Δ) injected in the NAc. Illustration of doxycycline (+dox)-mediated expression RFP (ac: anterior commissure). **(b)** Reduction of D1R-GluN1 interaction in C1-infected cells and **(c)** quantifications of PLA signal. Two-sided Student's t-test, $t = 4.078$ df. = 13, $** P = 0.0013$, $n = 7-8$ cells from 4 mice/group. **(d)** Neuronal survival. Two-sided Student's t-test, $t = 0.354$ df. = 6, $P = 0.735$, $n = 4$ mice/group. **(e)** Experimental time frame and representative traces of AMPA+NMDA (black) and NMDA (grey) currents in D1R-MSN (GFP+) -infected with C1 or C1Δ (RFP+). **(f)** AMPA to NMDA (A/N) ratios. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 30) = 2.511$, $*P = 0.033$; $## P = 0.0061$; $n = 3-4$ mice/group and $n = 6-13$ cells/group; **(g)** Illustrative comparison of representative whole-cell patch-clamp recordings of pharmacologically-isolated NMDAR EPSCs, normalized to the peak amplitude (in %) and **(h)** deactivation kinetics analysis. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 30) = 0.205$, $P > 0.999$, $n = 3-4$ mice/group and $n = 8-9$ cells/group. **(i)** Experimental time frame and basal locomotor activity. Two-sided Student's t-test, $t = 0.332$ df. = 30, $P = 0.742$, $n = 16$ mice per group. **(j)** Impact of D1R-GluN1 heteromers on the development of locomotor sensitization. Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 32) = 4.915$, $***P < 0.0001$; n.s $P = 0.2485$, $n = 7-11$ mice/group. **(k)** Experimental time frame and locomotor activity in each group. Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 27) = 0.0584$, n.s $P > 0.999$, $n = 7-8$ mice/group. n.s not significant. **(b)** Scale bar: 10 μ m. Error bars denote s.e.m.

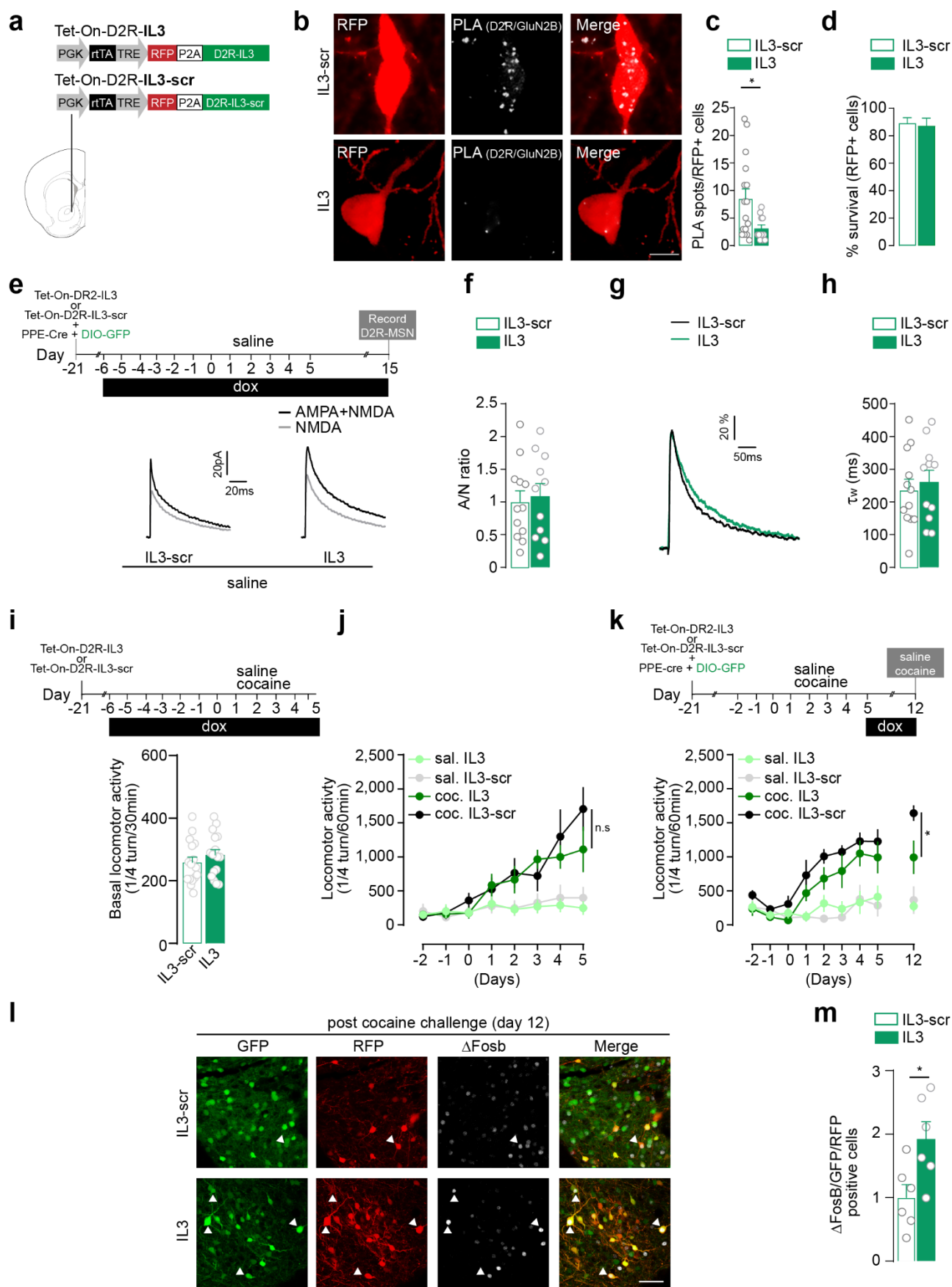


Figure 3 D2R-GluN2B heteromers are required for the development and maintenance of cocaine sensitizing effects. **(a)** Virus designed to disrupt D2R-GluN2B (Tet-On-D2R-IL3) and control (Tet-On-D2R-IL3-scr). **(b)** Reduction of D2R-GluN2B interaction in Tet-On-D2R-IL3 (IL3)- transduced cells; scale bar: 10 μ m; and **(c)** quantifications of the PLA signal. Two-sided Student's t-test, $t = 2.393$ df. = 25, $**P = 0.0246$, $n = 11-16$ cells from 4 mice/group. **(d)** Neuronal survival. Two-sided Student's t-test, $t = 0.2767$ df. = 6, $P = 0.7913$, $n = 4$ mice per group. **(e)** Experimental time frame and representative traces of AMPA+NMDA (black) and NMDA (grey) currents in D1R-MSN (GFP+)-infected with IL3 or IL3-scr (RFP+). **(f)** AMPA to NMDA (A/N) ratios; Two-sided Student's t-test, $t = 0.3397$ df. = 21, $P = 0.7375$, $n = 4-6$ mice/group and $n = 11-12$ cells/group; **(g)** Illustrative comparison of representative whole-cell patch-clamp recordings of pharmacologically-isolated NMDAR EPSCs, normalized to the peak amplitude (in %) and **(h)** deactivation kinetics analysis, Two-sided Student's t-test, $t = 0.5129$ df. = 21, $P = 0.6134$, $n = 11-12$ cells/group; **(i)** Experimental time frame and basal locomotor activity; Two-sided Student's t-test, $t = 0.994$ df. = 30, $P = 0.3282$, $n = 16$ mice/group. **(j)** Impact of D2R-GluN2B heteromer blockade on the development of locomotor sensitization Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 24) = 0.6847$, n.s $P > 0.999$; $n = 6-8$ mice/group. **(k)** Experimental time frame and quantifications of locomotor activity in each group Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 22) = 1.579$, $*P = 0.033$; $n = 6$ mice/group. **(l)** Representative images of Δ FosB expression in D2R-MSN (GFP+) infected with IL3-scr or IL3 (RFP+) after the challenge injection of cocaine (see panel **k**), arrowheads show GFP+/RFP+/ Δ FosB+; scale bar: 50 μ m. **(m)** Quantifications GFP+/RFP+/ Δ FosB+. Two-sided Student's t-test, $t = 2.694$ df. = 10, $**P = 0.0225$, $n = 6$ mice/group. n.s: not significant. Error bars denote s.e.m.

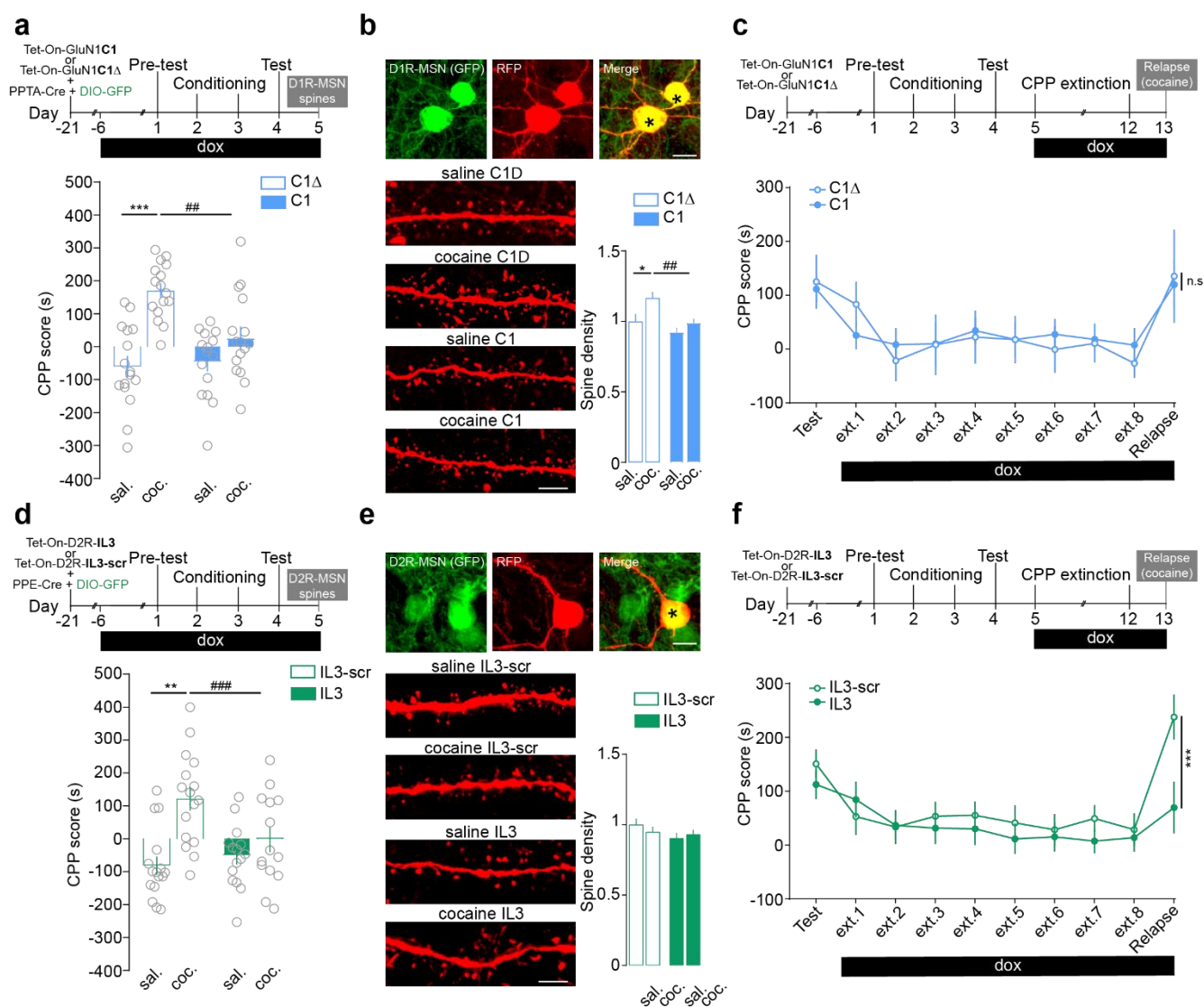


Figure 4 Differential roles of D1R-GluN1 and D2R-GluN2B heteromers in controlling rewarding effects of cocaine. **(a)** Experimental time frame and conditioned place preference (CPP) score. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 59) = 5.281$, $*** P < 0.0001$; $## P = 0.0040$, $n = 15-16$ mice/group. **(b)** Top: low magnification images of D1R-MSN (GFP) infected (RFP) shown by the asterisks; scale bar 10 μm . Bottom: high magnification of dendritic segments; scale bar: 5 μm . Spine density analysis. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 162) = 11.14$, $* P = 0.0446$; $## P = 0.0043$, $n = 27-69$ dendrites from 6 mice/group. **(c)** Experimental time frame to study the impact of D1R-GluN1 uncoupling on the extinction and cocaine induced-relapse to CPP. CPP score: Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 24) = 0.004$, $n.s P > 0.999$, cocaine C1 versus cocaine C1 Δ , CPP score on relapse day, $n = 10-16$ mice/group. **(d)** CPP score. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 57) = 2.424$, $*** P < 0.0001$; $## P = 0.0396$, $n = 14-16$ mice per group. **(e)** Top: low magnification images of D2R-MSN (GFP) infected

(RFP) shown by the asterisk; scale bar 10 μ m. Bottom: high magnification of dendritic segments; scale bar: 5 μ m. Spine density analysis. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 166) = 0.1268$, n.s $P > 0.999$ saline IL3-scr vs cocaine IL3-scr; $n=30-53$ dendrites from 6 mice/group. (f) CPP score during extinction and cocaine-induced relapse. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 31) = 0.899$, $^{**}P = 0.0018$, cocaine IL3 vs cocaine IL3-scr CPP score on relapse day, $n=16-17$ mice/group. Error bars denote s.e.m.

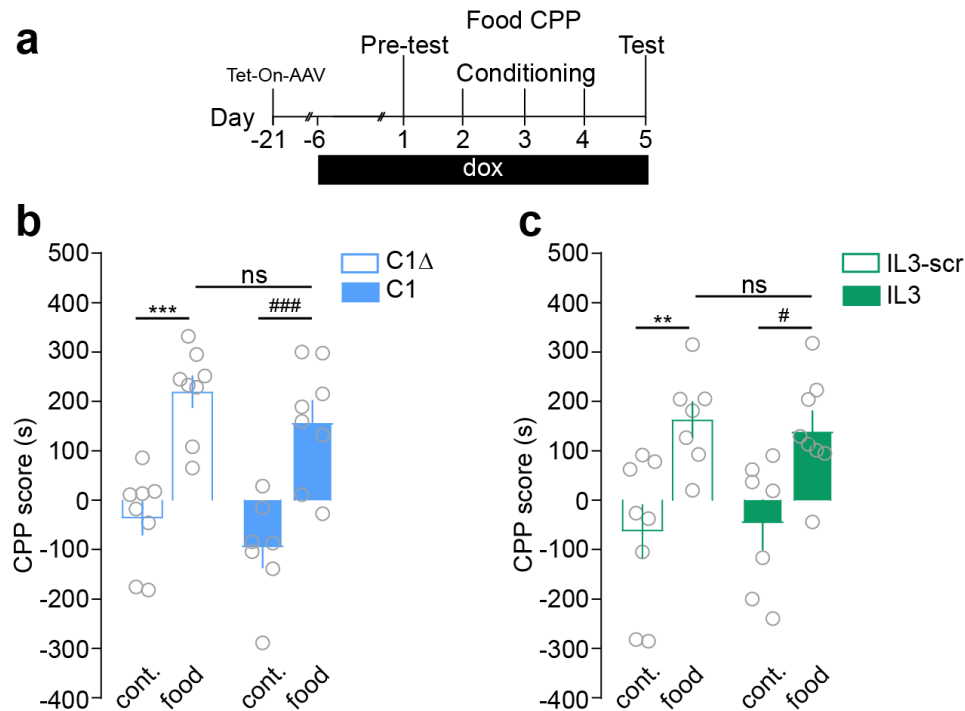


Figure 5 Uncoupling D1R-GluN1 or D2R-GluN2B heteromers does not alter conditioned place preference for food (a) Experimental time frame to study the consequences of heteromer inhibition on the development of food-induced CPP. CPP score upon uncoupling of (b) D1R-GluN1 interaction. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 27) = 2.756$, $^{***}P = 0.0002$, control C1Δ vs food C1Δ; $^{###}P = 0.0002$, control C1 vs food C1; n.s $P > 0.999$, food C1 vs food C1Δ, $n=7-8$ mice/group. or (c) D2R-GluN2B interaction Two-way ANOVA: virus effect $F(1, 26) = 0.007$, $^{**}P < 0.0098$, control IL3-scr vs food IL3-scr; $^{\#}P = 0.0366$, control IL3 vs food IL3; n.s, $P > 0.999$ food IL3 vs food IL3-scr, $n=7-8$ mice/group. n.s: not significant. Error bars denote s.e.m.

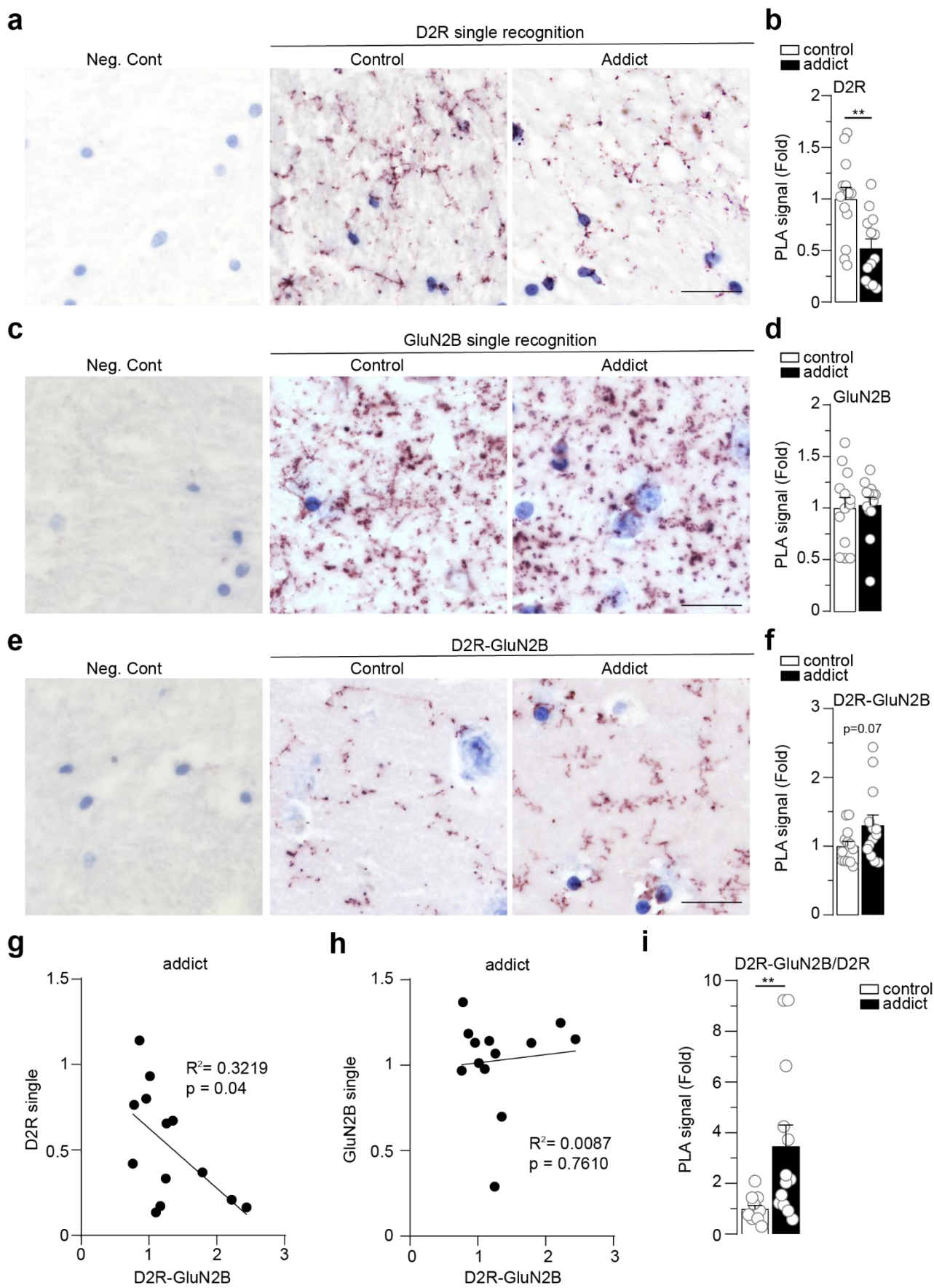
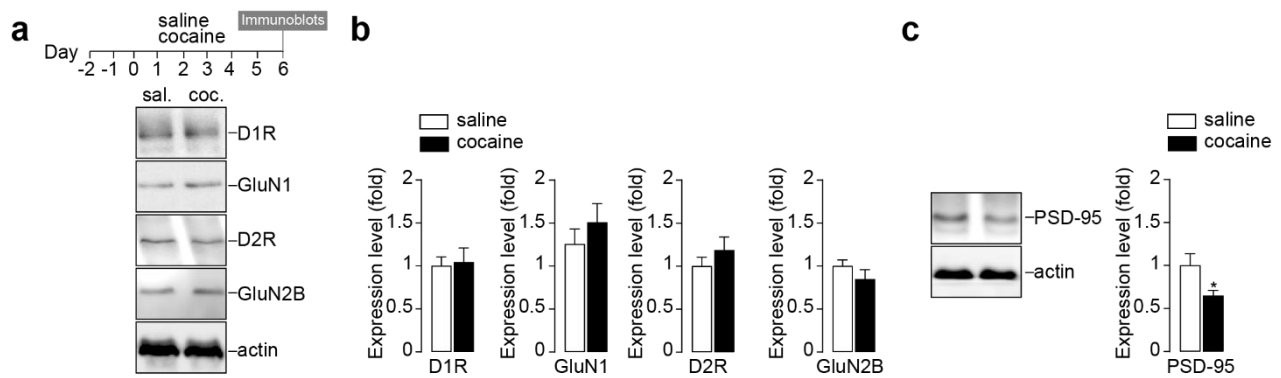
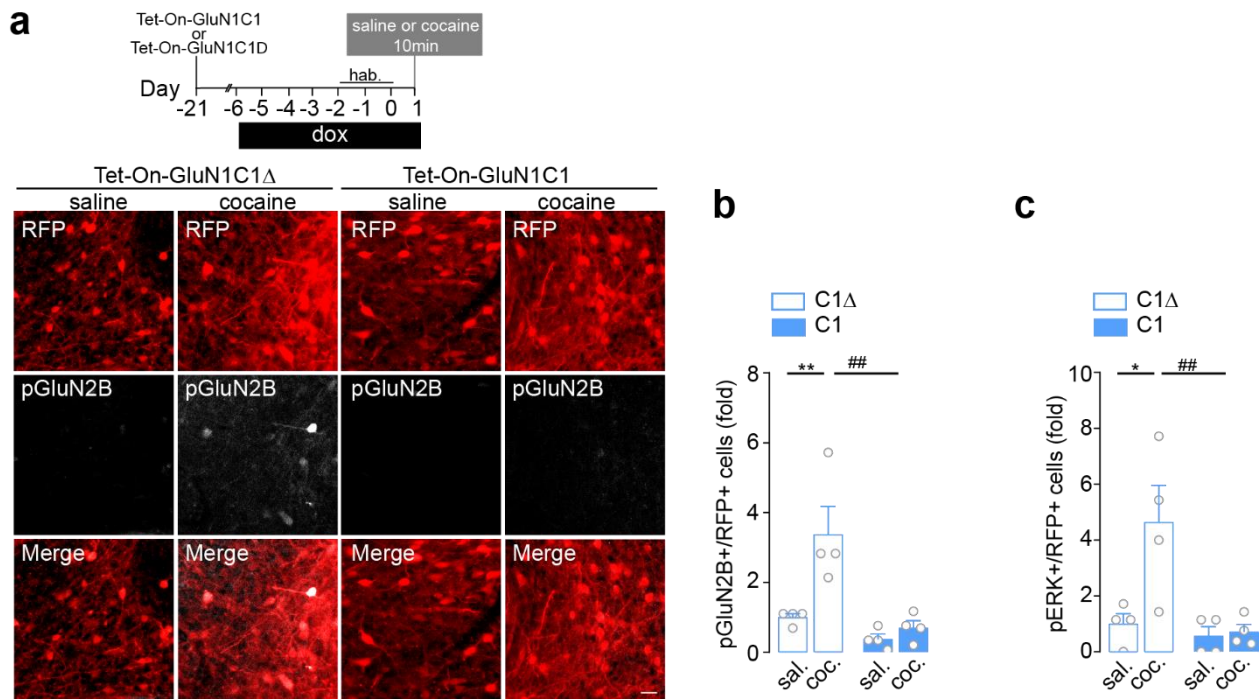


Figure 6 Human caudate putamen samples from addict subjects display a higher proportion of D2R forming heteromers with GluN2B, despite lower D2R expression levels. **(a)** Representative images of D2R single recognition by PLA and negative control, in which the primary antibody is omitted (left panel Neg. Cont). **(b)** D2R single PLA signal represented as fold decreased compared to control subjects. Two-sided Student's t-test, $t = 3.331$ df. = 24, $P = 0.0028$, $n = 13$ subjects/group. **(c)** Illustrations of GluN2B single detection and Neg. Cont. **(d)** Glu2NB PLA signal. Two-sided Student's t-test, $t = 0.224$ df. = 24, $P = 0.8243$, $n = 13$ subjects/group. **(e)** Images of D2R-GluN2B heteromer detection by PLA and Neg. Cont (GluN2B antibody is omitted). **(f)** D2R-GluN2B PLA signal. Two-sided Student's t-test, $t = 1.868$ df. = 24, $P = 0.074$, $n = 13$ subjects per group. **(g)** Pearson correlation between D2R expression levels and D2R-GluN2B heteromerization levels for each sample from addict subjects, $R^2 = 0.3219$, $P = 0.0432$. **(h)** Pearson correlation between GluN2B expression levels and D2R-GluN2B heteromerization, $R^2 = 0.0087$, $P = 0.761$. **(i)** D2R-GluN2B signal normalized to D2R expression for each subject. Two-sided Student's t-test, $t = 2.882$ df. = 24, $P = 0.0082$, $n = 13$ subjects/group. **(a, c, e)** scale bar: 25 μm . Error bars denote s.e.m.

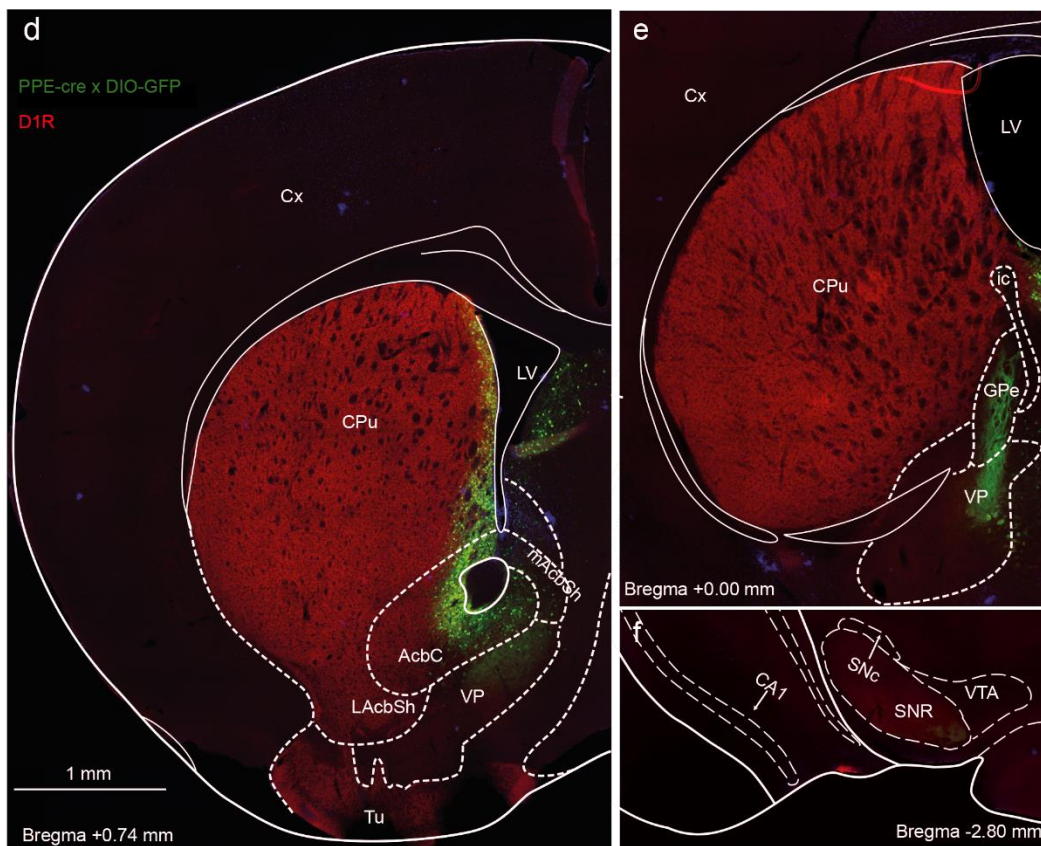
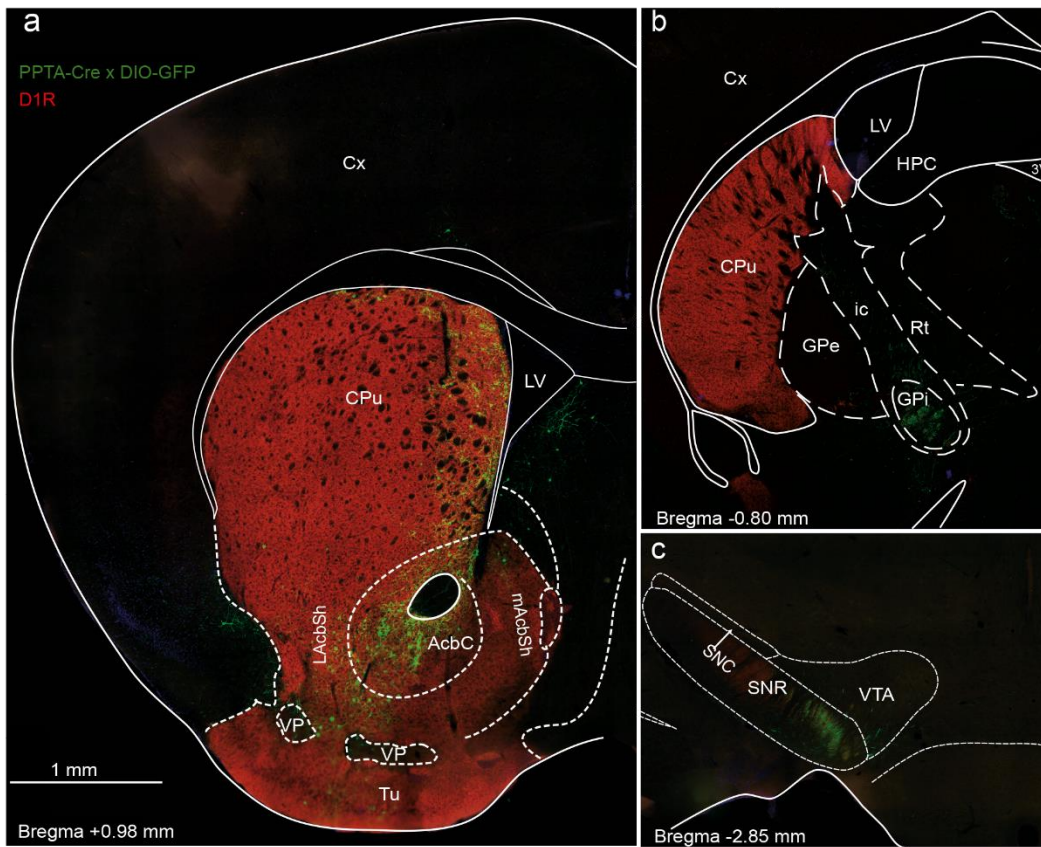
SUPPLEMENTARY FIGURES



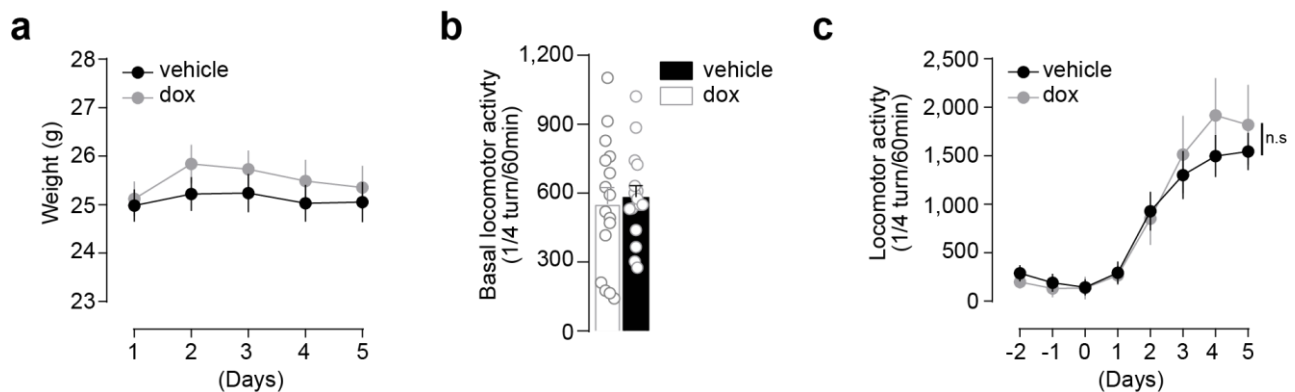
SUPPLEMENTARY FIGURE 1 Repeated cocaine exposure does not alter expression levels of D1R, D2R, GluN1/2b subunits of NMDAR in mice. **(a)** Top: Experimental time frame of saline or cocaine (15mg/kg) treatment. Immunoblots were performed 24h after the last saline (sal.) or cocaine (coc.) injection. Bottom: representative D1R, GluN1, D2R, GluN2B and actin immunoblots. **(b)** Quantifications of D1R Two-sided Student's t-test, $t = 0.2263$ df. = 21, $P = 0.8232$ $n = 11-12$ mice/group; GluN1 Two-sided Student's t-test, $t = 1.001$ df. = 21, $P = 0.3282$ $n = 11-12$ mice/group; D2R Two-sided Student's t-test, $t = 0.992$ df. = 20, $P = 0.33326$ $n = 11$ mice/group and GluN2B Two-sided Student's t-test, $t = 1.163$ df. = 20, $P = 0.2587$ $n = 11$ mice/group normalized to actin levels and represented as fold relative to the saline-treated group. **(c)** Left: Representative PSD-95 and actin immunoblots. Right: Fold decrease of PSD-95 expression levels (normalized to actin) relative to the saline-treated group. Two-sided Student's t-test, $t = 2.272$ df. = 21, $P = 0.0338$ $n = 11-12$ mice/group. Error bars denote s.e.m.



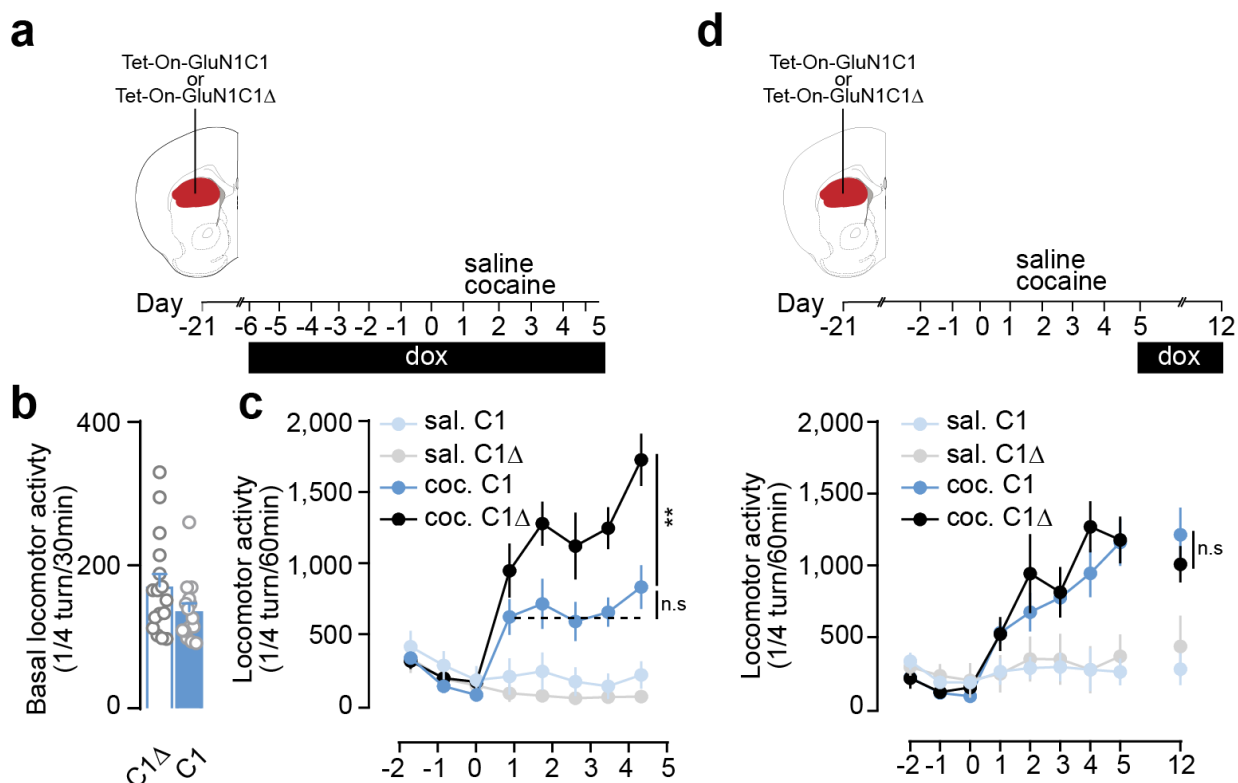
SUPPLEMENTARY FIGURE 2 The uncoupling of D1R from GluN1 in the NAc with AAV Tet-On-GluN1C1 blocks cocaine-mediated GluN2B phosphorylation and ERK activation. **(a)** Top: Time frame of AAV-Tet-On injection, doxycycline (dox) treatment and saline or cocaine (15 mg/kg) administration. Mice were perfused 10 min after a single injection of saline or cocaine. Bottom: Representative images of RFP expression and GluN2B phosphorylation (pGluN2B) in saline or cocaine-treated mice infected with AAV Tet-On-GluN1C1Δ or AAV Tet-On GluN1C1. **(b)** Quantifications of pGluN2B in RFP positive cells represented as fold relative to the saline-treated group infected with the AAV- Tet-On-GluN1C1Δ. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 12) = 10.36$, $**P = 0.0083$, saline C1Δ vs cocaine C1Δ; $###P = 0.0035$, cocaine C1 vs cocaine C1Δ, $n = 4$ mice/group. **(c)** Quantifications of ERK phosphorylation (pERK) in RFP positive cells represented as fold relative to the saline-treated group infected with the AAV- Tet-On-GluN1C1Δ. Two-way ANOVA: virus effect, $F(1, 12) = 7.031$, $*P = 0.0164$, saline C1Δ vs cocaine C1Δ; $###P = 0.010$, cocaine C1 vs cocaine C1Δ, $n = 4$ mice/group. Error bars denote s.e.m.



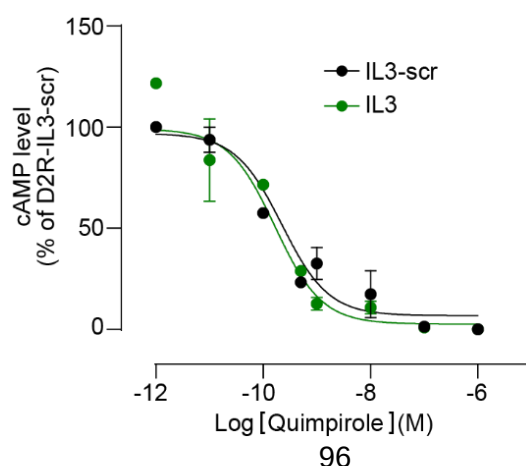
SUPPLEMENTARY FIGURE 3 Virally-mediated tagging of D1R- and D2R-MSN. **(a)** Illustrative coronal sections obtained from mice injected the mix of PPTA-Cre and DIO-GFP in the NAc and the dorsal striatum to tag D1R-MSN. Note that, this combination of AAV yielded a GFP signal in the GPi **(b)** and the SNR and VTA **(c)**, as expected for D1R-MSN. **(d)** Mice injected the mix of PPE-Cre and DIO-GFP in the NAc and the dorsal striatum to tag D2R-MSN. This combination of AAV leads to GFP staining in the GPe and VP **(e)** but no staining in the SNR and VTA. D1R labeling (red) has been performed to facilitate the detection and visualize the limitations of distinct brain regions. Abbreviations: 3V: 3rd ventricle; AcbC: accumbens nucleus core; Cpu: Caudate putamen; Cx: cortex; GPe: external globus pallidus; GPi: internal globus pallidus HPC: hippocampus; ic: internal capsule; LAcbSh: lateral accumbens shell; LV: lateral ventricle; mAcbSh: medial accumbens shell; Tu: olfactory tubercle; VP: ventral pallidum; Rt: reticular nucleus; SNR: substantia nigra, pars reticulata; SNC: substantia nigra, pars compacta; VTA: ventral tegmental area



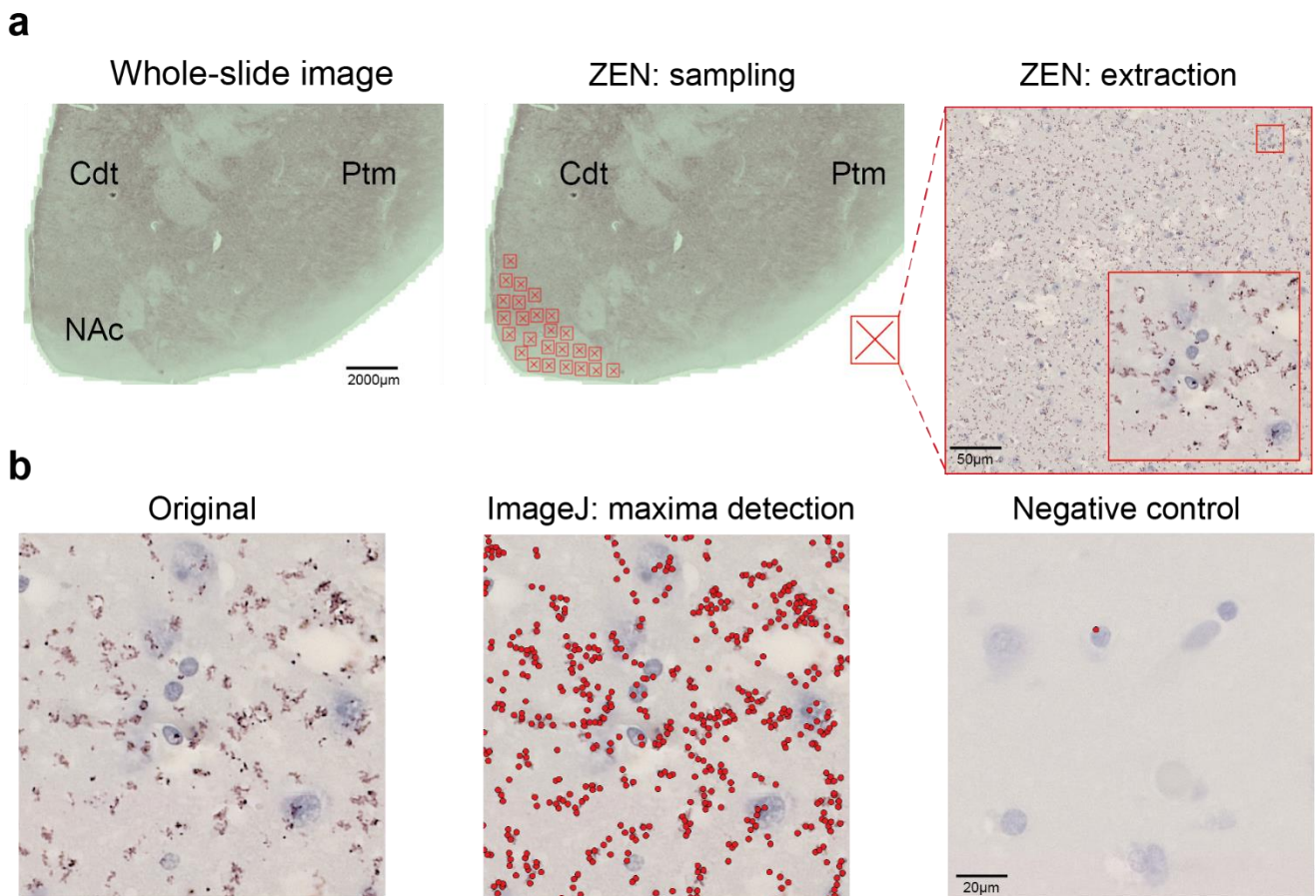
SUPPLEMENTARY FIGURE 4 Innocuity of doxycycline treatment in mice that have not been injected with an AAV-Tet-On. **(a)** Mice were treated for 7d with doxycycline (dox) prior to and during body weight measurement. Two-way ANOVA: doxycycline effect, $F(1, 30) = 0.6105$, $P > 0.999$, dox vs vehicle, $n=16$ mice/group. Lack of effect of dox administration on **(b)** basal locomotion. Two-sided Student's t-test, $t=0.356$ df. = 30, $P=0.723$ $n=16$ mice/group and cocaine (15 mg/kg)-induced locomotor sensitization. Two-way ANOVA: doxycycline effect, $F(1, 13) = 0.152$, $n. P > 0.999$, cocaine dox vs cocaine vehicle locomotion on d5, $n=7-8$ mice/group. Error bars denote s.e.m.



SUPPLEMENTARY FIGURE 5 Disrupting D1R-GluN1 heteromers in the dorsal striatum blocks the development, but not the maintenance, of cocaine-induced locomotor sensitization. **(a)** Experimental time frame to study the consequences of D1R-GluN1 heteromer blockade in the dorsal striatum on basal locomotion and development of cocaine-induced locomotor sensitization. **(b)** Basal locomotor activity. Two-sided Student's t-test, $t = 1.653$ df. = 29, $P = 0.1092$, $n = 15-16$ mice/group **(c)** Cocaine (15 mg/kg)-induced locomotor sensitization. Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 28) = 8.831$, $***P < 0.0001$, n.s. $P > 0.999$, $n = 6-10$ mice/group **(d)** Top: experimental time frame to study the role of D1R-GluN1 heteromers of the dorsal striatum in the maintenance of cocaine-induced locomotor sensitization. Bottom: Locomotor activity in each group. Three-way ANOVA: virus effect, $F(1, 27) = 0.3267$, $***P > 0.999$, $n = 7-8$ mice/group. Error bars denote s.e.m.



SUPPLEMENTARY FIGURE 6 Blocking D2R-GluN2B interaction with D2R-IL3 spares quinpirole-induced, D2R-dependent inhibition of forskolin-induced accumulation of cAMP in HEK 293 cells stably expressing the D2R. LogIC_{50} is -9.78 for D2R-IL3 and -9.65 for D2R-IL3-Scr. Error bars denote s.e.m; n=3 independent experiments for each condition.



SUPPLEMENTARY FIGURE 7 Analysis of the PLA signal from human post-mortem caudate putamen samples. **(a)** From a whole-slide image of human caudate putamen slice (left), the ZEN software allows the extraction of 25 high magnification images randomly selected in a region of interest corresponding to the nucleus accumbens (middle). Extracted images are used to automatically detect the PLA signal (right). **(b)** Illustration of the PLA signal spotted by a custom-made macro for local maxima detection in the case of D2R-GluN2B heteromers (middle panel) and the related negative control (right panel). Abbreviations: Cdt: caudate; NAc: nucleus accubens; Ptm: putamen;

Control samples						
Gender	Age	Cause of death	PMI	pH value	Substances at death	Axis 1 dependence
Male	28	suicide	16	6,93	Nil	Nil
Male	54	suicide	36	N/A	Nil	Nil
Male	26	suicide	55	7,30	Nil	Nil
Male	54	suicide	19	7,10	Nil	Nil
Male	29	suicide	56,5	6,40	Nil	Nil
Male	72	Natural	51	N/A	N/A	Nil
Male	18	Natural	68.5	6,87	Nil	Nil
Female	27	Accident	79,5	5,98	N/A	Nil
Male	31	Natural	101	6,80	Nil	Nil
Male	71	Natural	17	6,20	Nil	Nil
Male	81	Accident	26,75	5,80	N/A	Nil
Male	55	Natural	21	6,70	Nil	Nil
Female	40	Natural	106,5	6,50	N/A	Nil
Samples from addict individuals						
Gender	Age	Cause of death	PMI	pH value	Substances at death	Axis 1 dependence
Male	39	Suicide	36,75	6,74	Cocaine and metabolites	Substance dependence (alcohol)
Female	51	Suicide	33,75	N/A	Ethanol, cocaine and metabolites	Substance dependence
Male	39	Suicide	66,75	6,70	Cocaine and metabolites	Substance dependence (cocaine)
Male	38	Suicide	67	6,50	Cocaine and metabolites , antidepressants (SNRI), benzodiazepines, cannabinoids and metabolites	Substance dependence
Male	53	Suicide	65,75	6,50	Cocaine and metabolites , ethanol, lidocaine	Substance dependence
Male	52	Suicide	86,5	6,20	Cocaine , ethanol	Substance dependence
Male	37	Suicide	18,5	6,90	Cocaine and metabolites , antidepressants (SSRI)	Substance dependence
Male	45	Suicide	38	6,50	Cocaine and metabolites , cannabinoids and metabolites	Substance dependence
Male	24	Accident	77,25	6,33	Cocaine and metabolites , opiates, cannabinoids and metabolites	Substance dependence (cocaine)
Male	51	Accident	81,75	6,80	Opioids, diphenhydramine, benzodiazepines	Substance dependence (cocaine)
Male	32	Accident	32,25	6,20	Amphetamines, methamphetamines , diphenhydramine	Substance dependence (alcohol)
Male	50	Natural	100	6,50	Cocaine and metabolites	Substance dependence (cocaine)
Male	28	Accident	43,5	6,50	Cocaine and metabolites , ethanol	Substance dependence

8. ONLINE METHODS

Animals

6-week-old C57BL/6J male mice were purchased from Janvier labs (Le Genest, St Isle, France). The animals were housed four per cage, in a 12-hour light-dark cycle, in stable temperature (22°C) and humidity (60%) conditions with *ad libitum* access to food and water. They were acclimatized to the animal facility for at least 1 week. All experiments were carried out in accordance with the standard ethical guidelines (European Community Council Directive on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC) and the French National Committee (2010/63)).

Drugs

Drugs were administrated intraperitoneally in a volume of 10 ml/kg. Cocaine hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in a saline solution (0.9% NaCl w/v).

9-tert-butyl doxycycline hydrochloride (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) was dissolved in a saline solution containing DMSO (5%) and Tween20 (5%).

Viral constructions

Rh9AAV-Tet-On-GluN1C1 expresses biscistronically the fluorescent reporter protein RFP and the C1 cassette of the GluN1 subunit (₈₆₄DRKSGRAEPDPKKKATFRAITSTLASDT₉₀₀) upon doxycycline (dox) treatment. The related control virus rh9AAV-Tet-On-GluN1C1Δ expresses a truncated version of C1 that is deleted from a stretch of 9 positively charged amino acids (₈₉₀S890FKRRRSSK₈₉₈), which are required for D1R-GluN1 interaction (Woods et al., 2005a). The rh9AAV-Tet-On-D2R-IL3 encodes a sequence of the third intracellular loop of the D2R (₂₂₅TKRSSRAFR₂₃₄) interacting with GluN2B. The control rh9AAV-Tet-On-D2R-scr (5.10^{13} viral particles/ml) expresses a scramble sequence (KFARRTSASR) of the D2R-IL3. All Tet-On AAV were injected bilaterally by infusing 0.7 μl of a solution at 5.10^{13} viral particles/ml per hemisphere for the NAc (2 μl for the dorsal striatum). The rh9AAV-PPTA-Cre (PPTA-cre) and rh9AAV-PPE-Cre (ENK-cre) contains an expression cassette consisting of the Cre recombinase driven by the promoter of the PPTA gene (prepro-

tachykinin) or the PPE gene (preproenkephalin), which are specifically expressed in D1R-MSN and D2R-MSN, respectively. AAV PPTA-cre or PPE-cre were co-injected with the rh9AAV-pCAG-DIO-eGFP-WRPE (Upenn) expressing flexed eGFP under the CMV/actin hybrid promoter (CAG). All viruses were diluted in PBS pluronic 0.001%.

Stereotaxic injections

Mice were anesthetized with ketamine (150 mg/kg) and xylazine (100 mg/kg) and placed on a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Craniotomies were realized using the following coordinates: 1.7 mm rostral to the bregma, 1.2 mm lateral to midline and 4.6 mm ventral to the skull surface to target the NAc and 1mm rostral to the bregma, 1.8 mm lateral to midline and 3.25 mm ventral to the skull surface for the dorsal striatum. Viral injections were performed bilaterally at a rate of 0.15 μ l/min using a 10 μ l-syringe (Hamilton 1700 series, Phymep, Paris, France) with a 200 μ m gauge needle (Phymep, Paris, France) mounted on a microinfusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA). After the injection, the needle was left in place for an additional 8 min to avoid backflow.

Doxycycline treatments

Three weeks after stereotaxic injections of Tet-On AVV, the expression of the constructs was triggered by daily intraperitoneal (IP) injection of 9TB-doxycycline (10 mg/kg) for 4 days. To maintain expression mice were then supplemented with a mix containing doxycycline (dox) Hcl (2 mg/ml), 9TB-doxycycline Hcl (80 μ g/ml) and sucrose (1%) added in drinking water.

Behavioral testing

All behavioral tests were conducted during the light phase (8:00–19:00). Animals were randomly assigned to the saline or cocaine groups after viral injection. Prior to behavioral testing, mice were handled daily during 7 days in the experiment room. All mice were perfused with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) 24h post-behavior to systematically verify the accuracy of stereotaxic injections and expression of the RFP reporter protein. Mice that did not meet quality criterion (i.e.

non-bilateral expression, off-target diffusion, excessive backflow or low RFP expression) were discarded from the study.

Locomotor activity and cocaine psychomotor sensitization

Locomotor activity was measured in a low luminosity environment inside a circular corridor (Immetronic, Pessac, France) containing four infrared beams placed at each 90° angle. Locomotor activity was expressed as a cumulative count of crossings between quarters of the corridor for the indicated time. Mice were treated with dox 7 days before and until the end of the experiment. Mice were habituated to the test apparatus for 3 days; basal locomotor activity was recorded on the third day of habituation. Cocaine sensitization experiments consisted of five daily 90min sessions during which spontaneous activity was recorded for 30 min before saline or cocaine (15 mg/kg) injections and locomotor activity was then measured for 60 min post-injections. To study the consequences of uncoupling DAR from NMDAR on the maintenance of cocaine-induced locomotor sensitization maintenance, mice were treated for 5 consecutive days with saline or cocaine in the absence of dox. After the last injections, mice were supplemented with dox during a withdrawal period followed by a challenge injection of saline or cocaine.

Cocaine Conditioned Place Preference (CPP)

To study the impact of DAR-NMDAR heteromerization in the development of CPP, mice were treated with dox for 7 days before and until the end of the experiment. The CPP was performed in a two-compartment Plexiglas Y-maze apparatus (Imetronic). Each compartment contains different visual cues and floor textures for which mice did not show any preference on average before conditioning. All sessions lasted 20min. On day 1, mice were placed in the center of the apparatus and allowed to explore freely both compartments. Time spent in each compartment was automatically recorded. Mice spending more than 70% of the time in one compartment were excluded. On day 2, to avoid any initial preference bias, mice were randomly assigned to one or the other compartment for each group. Mice were injected with saline and placed immediately in the assigned closed compartment for 20 min. After 1h, mice were injected with saline or cocaine and placed in the other closed compartment. This was repeated on day 3. The test was performed on day 4, during which mice had

a free access to both chambers. The CPP score was calculated as the difference between the time spent in the cocaine-paired chamber during day 4 minus the time spent in this compartment on day 1. CPP extinction and maintenance experiments were performed on the cocaine groups of mice injected with Tet-On AVV that developed a preference for the cocaine-paired chamber in the absence of dox. Mice were then treated with dox until of the behavioral assessment. For the extinction phase, mice were injected with saline and put back in the apparatus with free access to both compartments for 20 min daily for 8 days. On the ninth day, mice were injected with saline or cocaine and allowed to explore both compartments.

For palatable food-induced CPP, mice were food-deprived to 90% of initial *ad libitum* weight and treated with dox 7 days prior and during behavioral assessment. Experiments were performed in the same apparatus and conditions as for cocaine-induced CPP with following modifications: On day 2, after random group assignment. Mice were placed immediately in the assigned closed compartment containing chocolate crisps (Chocapic, Nestlé, Vevey, Switzerland) or nothing for 20 min. After 1h, mice were placed in the other closed compartment. This was repeated on day 3 and 4. The test was performed on day 5.

Mouse tissue preparation

Mice were anesthetized with an I.P injection of Euthasol (100 mg/kg; Le Vet, Oudewater, Netherlands) and perfused transcardially with 0.1 M Na₂HPO₄/ Na₂HPO₄, pH 7.5 containing 4% PFA at 4°C delivered with a peristaltic pump at 20 ml/min for 5 min. Brains were then extracted, post-fixed overnight in 4% PFA, and stored at 4°C. 30 µm-thick coronal sections were performed with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) and kept at -20°C in a cryoprotective solution containing 30% ethylene glycol (v/v), 30% glycerol (v/v) and 0.1 M PBS.

Immunohistochemistry

On day 1, free-floating sections were rinsed three times for 5 min in Tris-buffered saline (TBS, 0.9% NaCl, 0.1 M Tris base, pH 7.5). Sections were then incubated in blocking solution containing 3% normal goat serum, 0.2% triton X-100 (Sigma, Aldrich) and 50mM NaF for 2 h at room temperature (RT) before overnight 4°C incubation with primary antibodies (see antibodies table) diluted in the

blocking buffer. On day 2, after three 10-min rinses in TBS, sections were incubated for 90 min with secondary antibodies (see antibodies table). The anti-FosB antibody recognizes full-length FosB as well as Δ FosB but at the time point studied (24h post cocaine) all FosB-immunoreactive protein represents Δ FosB (Lobo et al., 2013b). After three 5-min rinses in TBS, sections were incubated for 5 min with Hoescht (Invitrogen) for nuclei counterstaining. Three 5-min TBS and two Tris buffer (0.1 M Tris base, pH 7.5) washes were performed before sections were mounted in Prolong Gold (Invitrogen).

Western Blot

Mice were killed by decapitation and their heads were immediately snap frozen in liquid nitrogen. Microdiscs of NAc were punched out using disposable biopsy punches (1 mm diameter) (Kai medical) and stored in individual tubes at -80°C. Microdiscs were then homogenized by sonication in a lysis solution containing 50 mM Tris HCl, 2% SDS, 0.5 M urea diluted in water. Protein concentrations were determined using the BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL). A fixed amount of protein (30 μ g per lane) was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12%) before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated 1 h at RT in a blocking solution containing TBS with 0.1% tween and 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibodies (see antibodies table). Membranes were washed three times in TBS-Tween and then incubated for 1h at RT with secondary antibodies (see antibodies table) coupled to horseradish peroxidase (HRP). Immunoreactive bands were detected by chemoluminescent detection (ECL kit, GE Healthcare) and images were acquired using the ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). The densitometry of immunoreactive bands was quantified using ImageJ and normalized to the loading control.

Human brain samples

Brain samples from individuals with a history of substance dependence, with toxicological evidence of current psychostimulant use, and from matched healthy controls (n = 13/group; Table S1) were provided by the Suicide section of the Douglas-Bell Canada Brain Bank (DBCBB). Brains were

donated to the DBCBB by familial consent through the Quebec Coroner's Office, which ascertained the cause of death. Two months after death, psychological autopsies with next-of-kin were conducted, as previously described (Dumais et al., 2005).

Dissections of ventral striatum were performed with the guidance of a human brain atlas (Mai et al., 2008) on 0.5 cm-thick formalin-fixed coronal brain sections at an anatomical level equivalent to plate 15 of this atlas (-7.5 mm from the center of the anterior commissure). Tissue was extracted rostral to the anterior commissure and ventral to the tip of the anterior limb of internal capsule and fixed by immersion in formalin until paraffin embedding. The latter was completed using a Leica ASP200S automated processor. Tissue blocks were dehydrated in increasing gradients of alcohol (70%, 95%, 3x100%) for 1.5hr each, followed by clearing in 3 changes of 100% xylene (2hr, 2x1.5hr). The samples were then infiltrated in 3 changes molten paraffin, 3hrs each before embedding. Slices of 6 μ m thickness were then prepared with microtome at the histology facility of the ICM institute (Paris).

Proximity Ligation Assay

Proximity ligation assay (PLA) on mouse brain sections (30 μ m-thick) was performed in 48-well plates according to the manufacturer's instructions for free-floating sections. PLA on human post-mortem paraffin-embedded tissue was performed on sections mounted on superfrost plus slides (Thermo Scientific). 6 μ m-thick human caudate-putamen sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol series and washed briefly in TBS. For antigen retrieval, sections were boiled for 6 min in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6). For brightfield PLA, sections were incubated for 30 min at RT in TBS containing 1% H₂O₂ to block endogenous peroxidase. After three 5 min rinses with TBS containing 0.1% triton X-100 (TBS-T), sections were incubated 1h at RT with blocking buffer (Duolink blocking buffer for PLA) then with primary antibodies (see antibodies table) diluted in the Duolink antibody dilution buffer overnight at 4°C. Anti-rat PLA plus and minus probes were made using the PLA probemaker kit (Sigma Aldrich) with a Goat anti-rat IgG antibody (Jackson ImmunoResearch) according to manufacturer's instructions. Immunofluorescent PLA (green) and the remaining procedures for brightfield PLA were performed as previously described (E. Cahill et al., 2014). For brightfield PLA nuclei were counterstained using the duolink nuclear stain. In this

study, we used both single-recognition PLA, using only one primary antibody to detect single antigen and dual-recognition to detect DAR-NMDAR complexes using two primary antibodies.

Antibodies

Primary Antibody	Reference	Application	Dilution	Secondary antibody	Antibody origin	Dilution
Rabbit polyclonal to phospho-GluN2B (Y1472)	Abcam, Cambridge, UK, ref: ab3856	IHC	1/200	Alexa fluo 488 Goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher, Waltham USA, ref: A11034	1/500
Rabbit monoclonal to phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell signaling, Danvers, USA, ref: 4370S	IHC	1/400	Alexa fluo 488 Goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher, ref: A11034	1/500
Rat monoclonal to D1 dopamine receptor	Sigma-Aldrich, St Louis, USA, ref: D2944	PLA	Dual PLA: 1/200 Single PLA: 1/200			
		WB	1/500	ECL™ Goat anti-Rat IgG, HRP-linked	GE Healthcare, Chicago, USA, ref: NA935	1/5000
Rabbit polyclonal to NMDAR1	Abcam, Cambridge, UK, ref: ab17345	PLA	Dual PLA: 1/200 Single PLA: 1/400			
Rabbit polyclonal to D2 dopamine receptor	Millipore, Burlington, USA ref: ABN462	PLA	Dual PLA: 1/200 Single PLA: 1/400			
		WB	1/500	WB: ECL™ Goat anti-Rabbit IgG, HRP-linked	GE Healthcare, ref: NA934	1/5000
Mouse monoclonal to NMDAR2B NT	Millipore, ref: MAB5782	PLA	Dual PLA: 1/200 Single PLA: 1/500			
		WB	1/500	WB: ECL™ Goat anti-Mouse IgG, HRP-linked	GE Healthcare, Chicago, USA, ref: NA931	1/5000
Mouse Monoclonal to NMDAR1 CT	Millipore, ref: 05-432	WB	WB: 1/200	WB: ECL™ Goat anti-Mouse IgG, HRP-linked	GE Healthcare, ref: NA931	1/5000
Rabbit Polyclonal to Fos B	Santa Cruz, Ref: sc-48	IHC	1/500	Cy5 goat anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Ref: AB_2338013	1/1000

Image acquisition and analysis

For immunochemistry and fluorescent PLA staining, images were taken with a confocal laser scanning microscope (SP5, Leica) using a 20X and a 63X objective (oil immersion, Leica) respectively. The pinhole was set to 1 Airy unit, excitation wavelength and emission range were 495 and 500-550 nm for green PLA signal, 488 and 500-550 nm for Alexa fluo 488 and 590-650 nm for RFP. Laser intensity and detector gain were constant for all image acquisitions. Images were acquired in a range of 5µm with a z-step of 0.2µm. Conditions were run in duplicate and quantifications were made from at least 4 images per condition. Four mice were used for each condition. Maximum projection images were analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

For PLA images quantification, ImageJ was used to construct a mask from RFP positive cells. The mask was then fused with the PLA signal-containing channel using the image multiply function. The PLA punctate signal was quantified on the resulting image in ICY using the spot detector function (detector = scale 3: 65; filtering = Min size: 6; Max size: 30), these parameters were chosen manually from random images to obtain optimal signal-to-noise ratio and minimal false positive in images from negative control conditions. RFP-positive cells showing at least one PLA puncta for one or the other heteromer subtypes were included as this allowed us to identify the MSN subtype analyzed (D1R-MSN v.s D2R-MSN). RFP positive cells which did not present any D1R-GluN1 or D2R-GluN2B PLA signal were discarded. Mouse brightfield PLA images were taken using a microscope (Leica, DM4000) with a 63X objective. A minimum of 6 random fields per structure per mice were taken.

For human brightfield PLA, whole-slide images were taken using a Zeiss, Axioscan with a 40X magnification and z-stack with a 1 µm step interval. Whole-slide scanned images were visualized with ZEN Blue edition lite software (Zeiss, version 3.1). 25 region of interest (ROI) of 500µm x 500µm were generated randomly in the NAc and were exported as TIFF files using the image export plugin. The z-stack with the maximum number of PLA signal in the focus was chosen for each image.

Human and mouse brightfield PLA Images were analyzed using an ImageJ homemade macro that use the Find Maxima tool to detect the PLA punctate with prominence set at >40. Results are represented as the mean PLA signal density per field of views.

For quantification of immunohistochemistry experiments, immunoreactive cells, were analyzed using ImageJ considering the cells with immunofluorescence above a fixed threshold

Spine density analysis

Twenty-four hours after the CPP paradigm, mice were perfused and brains were sliced as described above. Dendrite spine analysis was performed on RFP-positive dendrites from D1R-MSN and D2R-MSN identified based on the presence of GFP driven by the co-injection of AAV-PPTA-cre/AAV-pCAG-DIO-eGFP or Enk-cre/pCAG-DIO-eGFP, respectively. Image stacks were taken using a confocal laser scanning microscope (SP5, Leica). For analysis of D1R-MSN, images were collected through 63x objective with pixel size of 65 nm and z-step of 200 nm. For D2R-MSN, images were collected through 40x objective with pixel size of 95 nm and z-step of 300 nm. The excitation wavelength was 488 for GFP and 561 for RFP, with emission range 500-550 nm and 570–650 nm, respectively. Images were acquired in sequential mode with a Hybrid detector (HyD, Leica). Deconvolution with experimental point spread function from fluorescent beads using a maximum likelihood estimation algorithm was performed with Huygens software (Scientific Volume Imaging). Neuronstudio software was used to reconstruct the dendrite and detect dendritic spines with manual correction.

Patch clamp recordings.

Mice were anesthetized (Ketamine 150 mg/kg / Xylazine 10 mg/kg) and transcardially perfused with aCSF for slice preparation. Coronal 250 μ m slices containing the nucleus accumbens were obtained in bubbled ice-cold 95% O₂/5% CO₂ aCSF containing (in mM): KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0.5, glucose 11, sucrose 234, NaHCO₃ 26, using a HM650V vibratome (Microm, France). Slices were then incubated in aCSF containing (in mM): NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26, glucose 11, at 37°C for 1 h, and then kept at room temperature. Slices were transferred and kept at 31°C in a recording chamber superfused with 2 ml/min aCSF in the continuous presence of 50 μ M picrotoxin (Sigma-Aldrich, France, dissolved in DMSO) to block GABAergic transmission. Neurons were visualized by combined epifluorescent and

infrared/differential interference contrast visualization using an Olympus upright microscope holding 5x and 40x objectives. Whole-cell voltage-clamp recording techniques were used to measure synaptic responses using a Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Signals were collected and stored using a Digidata 1440A converter and pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices, CA). AMPA-R/NMDA-R ratio was assessed using an internal solution containing (in mM) 130 CsCl, 4 NaCl, 2 MgCl₂, 1.1 EGTA, 5 HEPES, 2 Na₂ATP, 5 sodium creatine phosphate, 0.6 Na₃GTP and 0.1 spermine. Synaptic currents were evoked by stimuli (60 μ s) at 0.1 Hz through a glass pipette placed 200 μ m from the patched neurons. Evoked-EPSCs were obtained at V=+40mV in the absence and presence of the AMPA-R antagonist DNQX. In all cases, 30 consecutive EPSCs were averaged and offline analyses was performed using Clampfit 10.2 (Axon Instruments, USA) and Prism (Graphpad, USA). Pharmacologically isolated EPSC NMDAR decay time, recorded from cells voltage clamped at +40 mV, was fitted with a double exponential function, using Clampfit software, to calculate both slow and fast decay time constants, τ_{fast} and τ_{slow} , respectively. The weighted time constant ($\tau_{weighted}$) was calculated using the relative contribution from each of these components, applying the formula: $\tau_w = [(af.\tau_f) + (as.\tau_s)]/(af + as)$, where af and as are the relative amplitudes of the two exponential components, and τ_f and τ_s are the corresponding time constants.

Cyclic AMP accumulation assay

HEK 293 cells stably expressing the D2R (Michino et al., 2013) were grown on polylysine (Poly-D-lysine hydrobromide, Sigma) and transfected with Tet-On plasmids encoding either the D2R-IL3 or D2R-IL3-scr peptides and the Tag RFP (4 μ g per well), complexed with Lipofectamine® 2000 transfection reagent (Invitrogen™), in DMEM (DMEM high glucose GlutaMAX™ Supplement pyruvate, Gibco), and incubated for 5 h. Post-transfection, cells were rinsed and wells filled with DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics to induce D2R expression (Hygromycine 2 μ l/ml (Sigma Aldrich); Blasticidine 1,5 μ l/ml (Cayla Invivogen ant-bl-1); Tetracycline (Sigma T7660-5g) 1 μ l/ml) and incubated overnight. Peptide expression was induced by addition of 1 μ g/ml dox solution, incubating for 48 hours. Following the dox treatment, cells were rinsed in DMEM before pretreatment with 1mM IsoButylMethylXanthine (IBMX, Sigma Aldrich) for 15 min. Cells were then stimulated for

30 min with the indicated concentrations of agonist Quinpirole (Tocris), in the presence of 1 mM IBMX and 10 μ M Forskolin (Tocris). Endogenous phosphodiesterase activity was stopped by aspiration of the medium and the addition of 0.1 M HCL (300 μ l/ well). After centrifugation at 600 g during 10min, protein concentration of supernatants was quantified by BCA (Uptima, Interchim). Cyclic AMP levels were determined in samples containing 10 μ g of protein. The accumulation of cAMP was measured by using a cAMP Enzyme Immunoassay kit (Sigma Aldrich) as described by the manufacturer using Victor3 (Perkin Elmer) plate reader. The curve fit was obtained by GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.).

Statistical analysis

Results were analyzed with Graphpad Prism (version 8.0.1). Sample size was predetermined on the basis of published studies, pilot experiments and in-house expertise. All data are displayed as mean $\pm$ SEM. Two-tailed Student's test was used for the comparison of two independent groups. For more than two groups comparison, one-way, two-way or three-way repeated-measures ANOVA were performed followed by Bonferoni Post-hoc test. Data distribution was assumed to be normal and variances were assumed to be homogenous. The main effect and post-hoc statistical significances are given in the appropriate figure legend for each experiment.

Data availability

The datasets that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

VI. Conclusion générale, discussion et perspectives

L'objectif principal du travail réalisé au cours de cette thèse visait à déterminer le rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par l'exposition chronique à la cocaïne.

La première partie de mon travail fut dédiée à l'étude de l'impact d'expositions répétées à la cocaïne sur l'hétéromérisation de ces récepteurs. Grâce à la technique de « proximity ligation assay » (PLA), j'ai pu montrer que le développement de la sensibilisation locomotrice est associé à une augmentation des hétéromères DAR/NMDAR dans le striatum dorsal et le NAc, et ce, sans changement du niveau d'expression des récepteurs partenaires. Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai validé une approche virale permettant d'exprimer des séquences peptidiques interférentes capables de dissocier les hétéromères D1R/GluN1 ou D2R/GluN2B de manière contrôlée dans le temps, sans altérer les fonctions des récepteurs partenaires indépendamment de leur hétéromérisation. J'ai ainsi pu montrer un rôle différentiel des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans les différentes étapes de la sensibilisation locomotrice et de la préférence de place conditionnée à la cocaïne. Mes résultats montrent que les hétéromères D1R/GluN1 sont impliqués dans le développement des adaptations morphologiques, synaptiques et comportementales induites par la cocaïne. En effet le découplage de D1R et GluN1 bloque sélectivement la phase de développement, mais pas le maintien, de la sensibilisation locomotrice et de la CPP induite par la cocaïne. A l'inverse, les hétéromères D2R/GluN2B sont nécessaires au maintien de ces deux comportements ainsi qu'au développement de la CPP. De manière intéressante, j'ai aussi pu montrer que le blocage de l'un ou l'autre de ces hétéromères n'affecte pas la préférence de place conditionnée induite par la nourriture.

D'un point de vue translationnel, le rôle préférentiel des hétéromères D2R/GluN2B sur le maintien des altérations comportementales évoquées par la cocaïne et leur absence d'effet sur les propriétés motivationnelle d'une récompense naturelle en font une cible privilégiée. J'ai donc décidé de mettre au point la détection de ces hétéromères à partir de caudé putamen humains. Ceci m'a permis de montrer qu'en dépit d'une forte baisse des niveaux d'expression du D2R mesurée dans le caudé putamen de sujets avec un historique dépendance aux psychostimulants par rapport aux contrôles, la proportion de D2R formant des hétéromères avec GluN2B était trois fois plus importante chez les sujets dépendants.

Ce travail apporte donc les premières démonstrations d'une modulation des interactions entre les récepteurs endogènes de la dopamine et du glutamate dans le striatum par une exposition chronique à la cocaïne. Il montre également que ces hétéromères sont détectables chez l'homme et que leur formation est accrue chez les sujets avec un historique d'addiction aux psychostimulants. Mon travail apporte également les évidences d'un rôle distinct de ces hétéromères dans les différentes phases des réponses à long terme induites par la cocaïne. Mes travaux de thèse contribuent également à renforcer l'hypothèse que le ciblage de l'interaction entre les récepteurs de la dopamine et du

glutamate pourrait être une stratégie thérapeutique envisageable pour soulager les symptômes associés à l'addiction mais aussi potentiellement pour d'autres maladies psychiatriques liées à un déséquilibre des transmissions glutamatergiques et dopaminergiques.

A. Modulation des hétéromères DAR/NMDAR par la cocaïne et mécanismes sous-jacents.

1. Modulation des hétéromères DAR/NMDAR dans le paradigme de sensibilisation locomotrice

Le premier volet de ce travail a apporté de nouvelles données concernant la régulation des hétéromères DAR/NMDAR dans le striatum dans le contexte d'injection répétées de cocaïne dans le paradigme de sensibilisation locomotrice. La caractérisation de cette modulation de ces hétéromères par la cocaïne est une étape importante dans la compréhension de leur rôle dans les réponses à cette drogue.

En accord avec de précédentes études démontrant l'existence des hétéromères D1R/GluN1 (E. Cahill et al., 2014; Fiorentini et al., 2003b), et D2R/GluN2B (Liu et al., 2006) dans le striatum, nous avons confirmé, l'existence des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans le striatum de souris en utilisant la technique de PLA. Le choix de cette technique repose sur plusieurs de ses avantages. Il a en effet été établi qu'elle permet de détecter *in vitro* et *in vivo* la proximité entre deux protéines endogènes (Figure 31), sans avoir à recours à des transfections ou surexpression des récepteurs

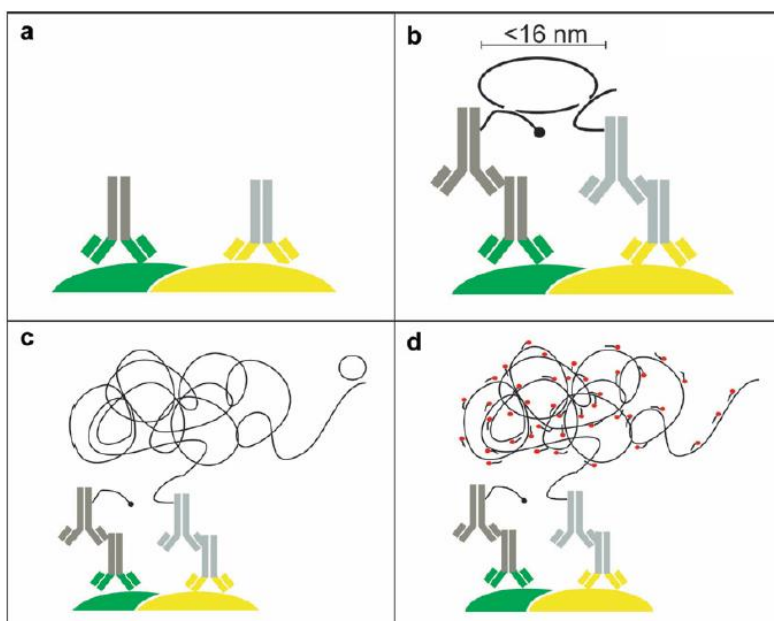


Figure 31 : Principe de la technique de « proximity ligation assay » (PLA).

(a) Deux anticorps primaires produits dans différentes espèces sont utilisés pour détecter les deux antigènes cibles d'intérêt [ici comme exemples, gris foncé/vert (gauche) contre une protéine cible (vert) et gris clair/jaune (droite) contre une deuxième cible protéine (jaune)]. (b) Chaque anticorps secondaire (sonde PLA) spécifique à l'espèce (gris foncé et gris clair, respectivement) fourni dans le kit Duolink a un brin d'ADN simple brin court qui lui est

attaché (ligne noire). Lorsqu'il y a proximité entre les sondes PLA, les brins d'ADN peuvent interagir par le biais d'une addition ultérieure de deux autres oligonucléotides d'ADN qui sont liés en cercle par une ligase (ligne noire circulaire). La distance entre les deux anticorps secondaires doit être au maximum de 16 nm, calculée à partir du nombre de nucléotides dans les bras d'ADN attachés. (c) Après la ligature enzymatique, les deux oligonucléotides ajoutés sont amplifiés par une polymérase pour donner une longue copie concatémère du cercle formé par ligature. (d) Après la réaction d'amplification, des sondes oligonucléotidiques complémentaires marquées sont ajoutées pour mettre en évidence le produit (cercles rouges). D'après Trifilieff 2011.

comme il a été fait dans la majeure partie des études précédentes. Elle permet également de visualiser la localisation des interactions entre protéines partenaires dans différentes structures

cérébrales, comme nous l'avons fait dans différentes sous-régions du striatum dorsal et du NAc. Cependant, la PLA permet de détecter la proximité de protéines lorsque la distance entre les deux partenaires est inférieure ou égale à 40nm. Un signal peut donc être détecté même quand les partenaires n'interagissent pas directement. Néanmoins dans notre cas, nous assumons que le signal PLA reflète la détection des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B car des études antérieures utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* ont établi que les interactions entre D1R et GluN1 (Fiorentini et al., 2003b; Lee et al., 2002) et D2R et GluN2B (Liu et al., 2006) étaient directes. Après avoir confirmé l'existence de hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans les parties dorsales et ventrales du striatum de souris, nous avons comparé l'impact d'injections répétées de cocaïne ou de solution saline dans un protocole de sensibilisation locomotrice. Le choix de ce paradigme repose sur le fait que ces injections répétées conduisent au développement d'une sensibilisation locomotrice qui se maintient au cours du temps, comme on peut le voir en réexposant les animaux à la même dose de cocaïne après plusieurs jours ou semaines de sevrage (Berridge and Robinson, 1998). En utilisant ce paradigme, j'ai pu montrer que la sensibilisation locomotrice était associée à une augmentation des hétéromères D1R/GluN1 dans l'ensemble des sous-régions striatales étudiées 24h après la dernière injection, alors que l'augmentation de l'interaction D2R/GluN2B est plus nette dans le NAc core et shell (Figure 32).

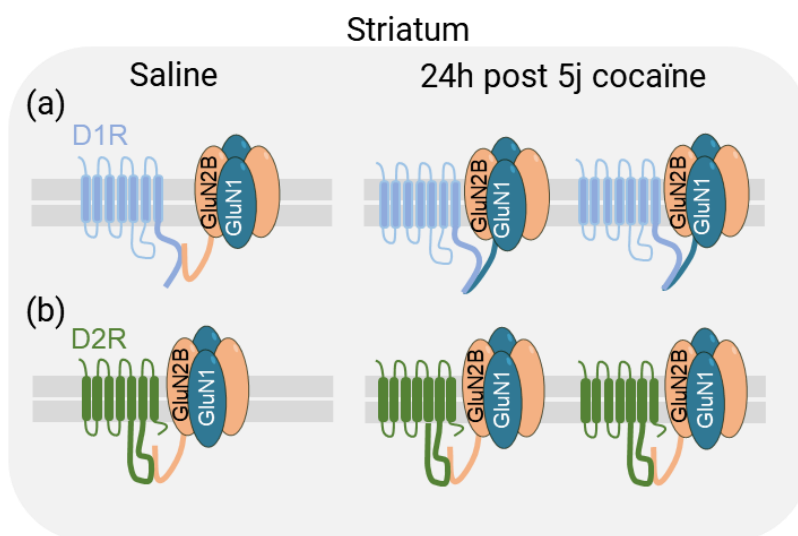


Figure 32 : La sensibilisation locomotrice est associée à une augmentation des DAR/NMDAR dans le striatum.

(a) Des injections répétées de cocaïne (une fois par jour pendant 5 jours) induisent une augmentation des hétéromères D1R/GluN1 dans toutes les régions striatales.

(b) Des injections chronique de cocaïne induisent une augmentation des hétéromères D2R/GluN2B dans le NAc et le striatum dorsolatéral.

Nous avons choisi de mesurer ces hétéromères 24h après les dernières injections de cocaïne sur la base d'études neurophysiologiques qui montrent que les modifications de la plasticité glutamatergique induite par des expositions répétées à la cocaïne dans le striatum sont observés à ce temps (Kourrich et al., 2007) (Pascoli et al., 2012).

a) Types cellulaires exprimant les hétéromères DAR/NMDAR

Les hétéromères DAR/NMDAR peuvent être présents dans différents types cellulaires exprimant les récepteurs partenaires. En effet, notre étude montre la présence d'hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans les D1R-MSN et D2R-MSN, respectivement. Toutefois, les NMDAR et le D2R, par exemple, sont également exprimés par tous les interneurons et les cellules gliales (Tepper et al., 2010). D'autres part, certaines proportion de MSN du NAc, coexpriment les D1R et D2R (Bertran-

Gonzalez et al., 2008), il serait intéressant de savoir si les hétéromères DAR/NMDAR sont également présents dans ces cellules. De plus, en réponse à la cocaïne, une fraction des neurones striataux expriment les marqueurs d'activités cellulaires comme ERK ou c-Fos, il serait intéressant de savoir si les niveaux d'hétéromères sont accrus spécifiquement dans ces cellules activées par la

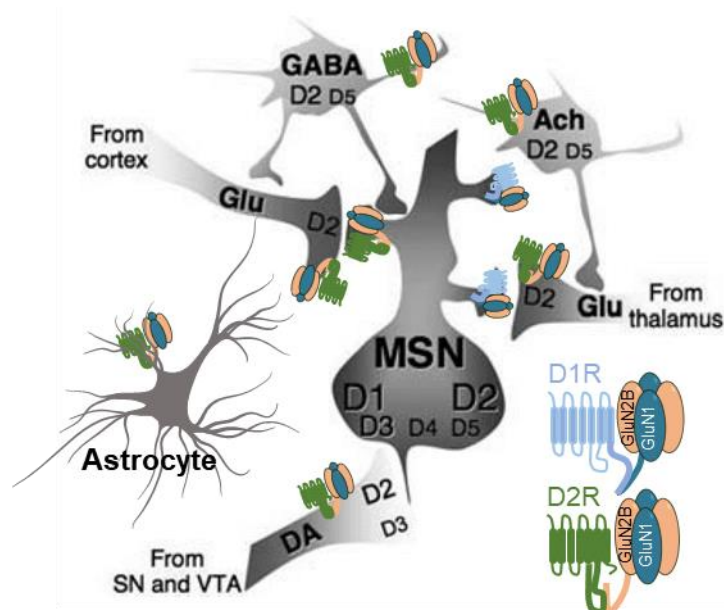


Figure 33 : Schéma hypothétique illustrant les types cellulaires qui pourraient exprimer les DAR/NMDAR dans le striatum.

Les hétéromères D1R/GluN1 sont exprimés par les D1R-MSN. Les hétéromères D2R/GluN2B sont exprimés par les D2R-MSN mais pourraient également être retrouvés dans les interneurones GABAergiques, cholinergiques, les astrocytes et les terminaisons dopaminergiques et glutamatergiques.

cocaïne ou s'ils se forment de manière uniforme dans l'ensemble des MSN (Figure 33). Pour répondre à cette question nous pourrions réaliser le PLA pour détecter les hétéromères en combinaison avec des marquages par immunofluorescences ou hybridation in situ des différents types cellulaires du striatum et/ou de marqueurs d'activité neuronales en conditions basales et en réponse à la cocaïne. Toutefois, nous n'avons à ce jour pas réussi à coupler le PLA avec les des marquages par immunofluorescence. Nous pourrions envisager des expériences de tri par FACS pour isoler les neurones activés en réponses à la cocaïne (cellules c-Fos positives par exemple) et réaliser par ensuite des expériences de co-immunoprécipitations (co-IP) entre les DAR et les NMDAR. Cependant, cette alternative n'est pas triviale à mettre en place et elle nécessiterait un nombre élevé d'animaux afin obtenir des quantités de cellules triées permettant de réaliser les co-IP.

b) Localisation subcellulaire des hétéromères DAR/NMDAR

Dans cette étude, nous nous sommes posé la question de la localisation subcellulaire des hétéromères DAR/NMDAR. En effet, la localisation synaptique, des hétéromères DAR/NMDAR a été suggérée par des études qui ont détecté le complexe D1R/GluN1 dans la fraction de la densité post-synaptique (PSD) des neurones du striatum par co-IP (Pei, 2004). De plus, une étude antérieure menée au laboratoire a établi le rôle des hétéromères D1R/GluN1 dans la modulation des courants post-synaptiques NMDAR par la DA et la LTP des synapses glutamatergique projetant sur les D1R-MSN, ce qui suggère leur localisation à la synapse (E. Cahill et al., 2014). D'autres part, une étude *in vitro* suggère que le D1R et GluN1 sont déjà couplés dans le réticulum endoplasmique (RE) et le cytoplasme et que leur assemblage avec GluN2B permettrait leur adressage membranaire (Fiorentini et al., 2003a) (Figure 34).

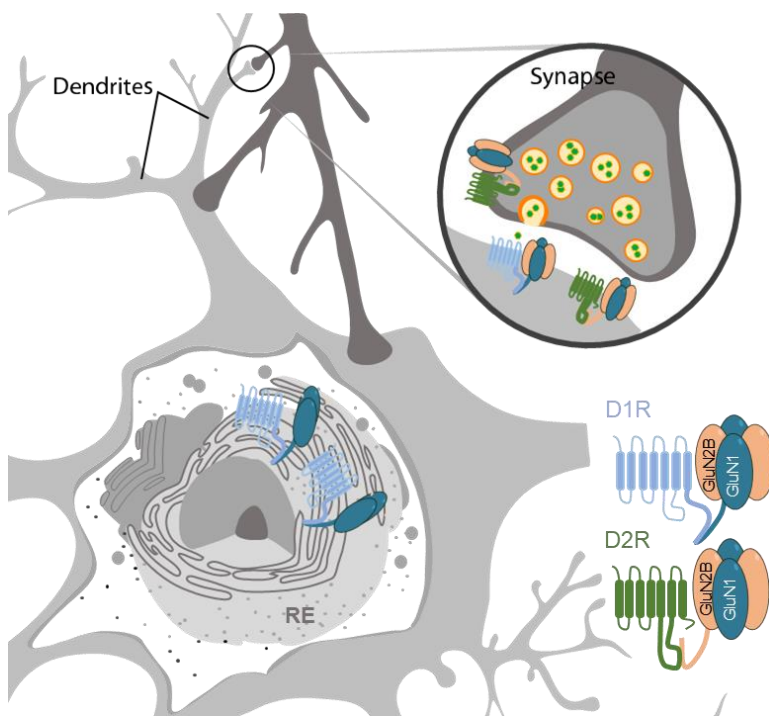


Figure 34 : Schéma illustrant les possibles localisations subcellulaires des DAR/NMDAR dans le striatum.

Les hétéromères D1R/GluN1 seraient localisés au niveau de la densité post-synaptique et pourraient être préassemblés dans le réticulum endoplasmique (RE) des D1R-MSN. Les hétéromères D2R/GluN2B seraient localisés au niveau de la densité post-synaptique des D2R-MSN mais pourraient également être retrouvés en présynaptique au niveau des terminaisons dopaminergiques et/ou glutamatergiques.

Les hétéromères D2R/GluN2B ont également été détectés dans la fraction PSD des neurones du striatum, de l'hippocampe et du PFC (Liu et al., 2006). Toutefois, leur présence dans le compartiment pré-synaptique est également envisageable car la séquence IL3 du D2R, nécessaire à l'interaction avec GluN2B, est également présente dans celle de la forme courte présynaptique du D2R, l'isoforme D2S, et une expression de GluN2B en présynaptique a également été rapportée dans l'hippocampe, même si elle reste controversée (Berg et al., 2013). Néanmoins, l'existence de ces hétéromères en présynaptique n'est pas à exclure. Nous pourrions répondre à ces questions en utilisant la technique de PLA sur des coupes de souris KO pour le D2S (Neve et al., 2019).

Les données de la littérature, notamment celles issues du groupe du Dr Christian Lüscher, ont permis d'établir que les différentes phases des altérations comportementales induites par la cocaïne reposent sur la modulation de la plasticité d'afférences glutamatergiques spécifiques projetant sur les D1R-MSN (Pascoli et al., 2014c, 2012; Salery et al., 2019). Ainsi, il serait également intéressant de déterminer si les hétéromères DAR/NMDAR se forment préférentiellement au niveau de synapses issues d'afférences glutamatergiques spécifiques projetant sur les MSN et si la stimulation d'une afférence glutamatergique, peut suffire pour former des hétéromères dans les cellules cibles. Des marquages rétrogrades des afférences striatales et des stimulations optogénétiques de ces terminaisons permettrait de voir par PLA en fluorescence si ces hétéromères sont formés au niveau de synapses particulières en réponse à la cocaïne et si l'activation de ces synapses génère localement des hétéromères DAR/NMDAR.

c) *Cinétique de formation des hétéromères DAR/NMDAR*

Nos données préliminaires montrent qu'après l'augmentation initiale des hétéromères D1R/GluN1 observée 24h après les dernières injections de cocaïne, ces hétéromères reviennent à un niveau basal après 7 jours d'abstinence mais augmentent à nouveau, et de manière plus prononcée, à la suite d'une réexposition à la cocaïne (Figure 35). La baisse d'hétéromérisation durant le sevrage

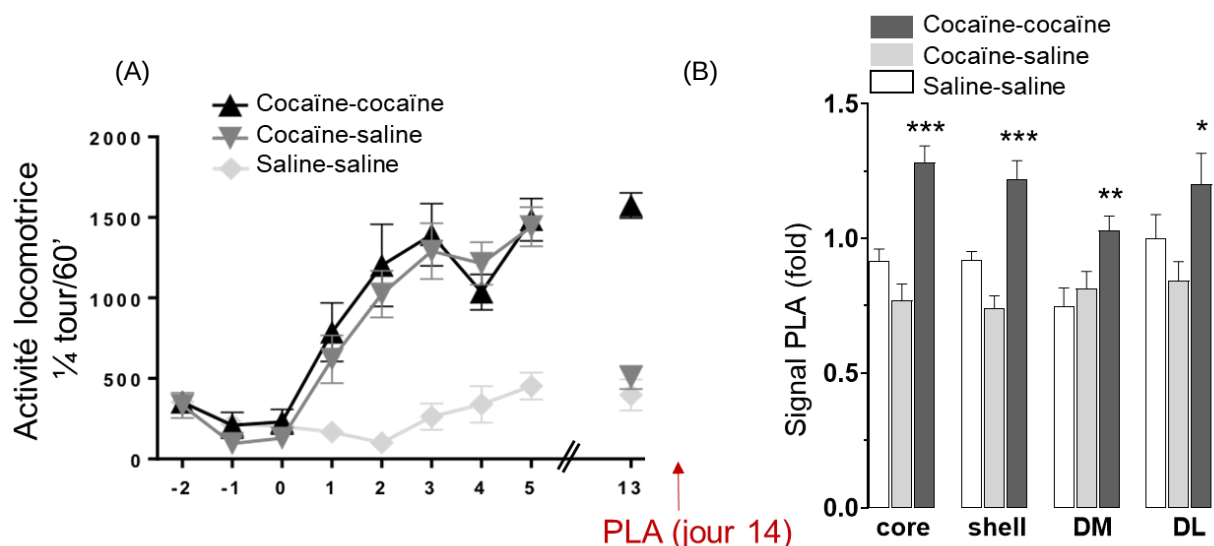


Figure 35 : Modulation des hétéromères D1R/GluN1 durant le sevrage et une réexposition à la cocaïne (A) Mesure de l'activité locomotrice avant (habituation) et durant 5 jours de saline ou de cocaïne (15mg/kg) et à la suite d'une réexposition à la saline ou la cocaïne après 7 jours d'abstinence. (B) Quantification des hétéromères D1R/GluN1 dans les différentes régions striales. Le signal PLA est représenté en ratio d'augmentation par rapport au groupe saline-saline. ANOVA une voie. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ saline-saline vs cocaïne-cocaïne, $n = 28-84$ champs/structure provenant de 7 souris/groupes. DM : striatum dorsomédian, DL : striatum dorsolatéral.

semble corrélée à la baisse des concentrations basales de DA et de glutamate durant l'abstinence décrite par la littérature (Parsons et al., 1991, Robertson et al., 1991, Pierce et al., 1996, Hotsenpiller et al., 2001, Baker et al., 2003). L'hétéromérisation de D1R et GluN1 observée à la suite d'une réexposition à la cocaïne suggère que les niveaux extracellulaires de ces deux neurotransmetteurs réguleraient les niveaux d'hétéromères D1R/GluN1. Nous envisageons également d'étudier la modulation des hétéromères D2R/GluN2B après le sevrage et suite à une réexposition à la cocaïne.

d) *Modulation des hétéromères DAR/NMDAR et conditionnement opérant*

Les travaux que j'ai menés ont permis de montrer une hétéromérisation accrue de D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans le protocole non opérant de sensibilisation locomotrice. Il nous a semblé crucial d'étendre cette analyse dans le contexte du conditionnement opérant d'auto-administration de cocaïne. Pour commencer à aborder ce point, j'ai étudié la modulation de ces hétéromères lors de la phase d'acquisition de l'auto-administration de la cocaïne en collaboration avec l'équipe de R. Maldonado de l'université de Barcelone qui ont réalisé les expériences comportementales. De manière intéressante, chez les animaux contrôles « yoked » qui reçoivent la cocaïne de manière passive et les animaux « master » qui ont appris à s'auto-administrer la substance, nous avons retrouvé une augmentation des hétéromères DAR/NMDAR par rapport aux animaux qui ont reçu de la saline. Au-delà de l'effet pharmacologique de la cocaïne qui peut être évalué chez les souris du groupe « Yoked », nous observons que l'augmentation des interactions D1R/GluN1 est encore plus importante chez les souris « master ». Ceci suggère un effet de l'apprentissage instrumental qui corrèle avec les études montrant que la libération de dopamine dans le NAc est plus élevée chez

les animaux qui s'auto-administrent la cocaïne comparé aux animaux « yoked » (Wydra et al., 2013).

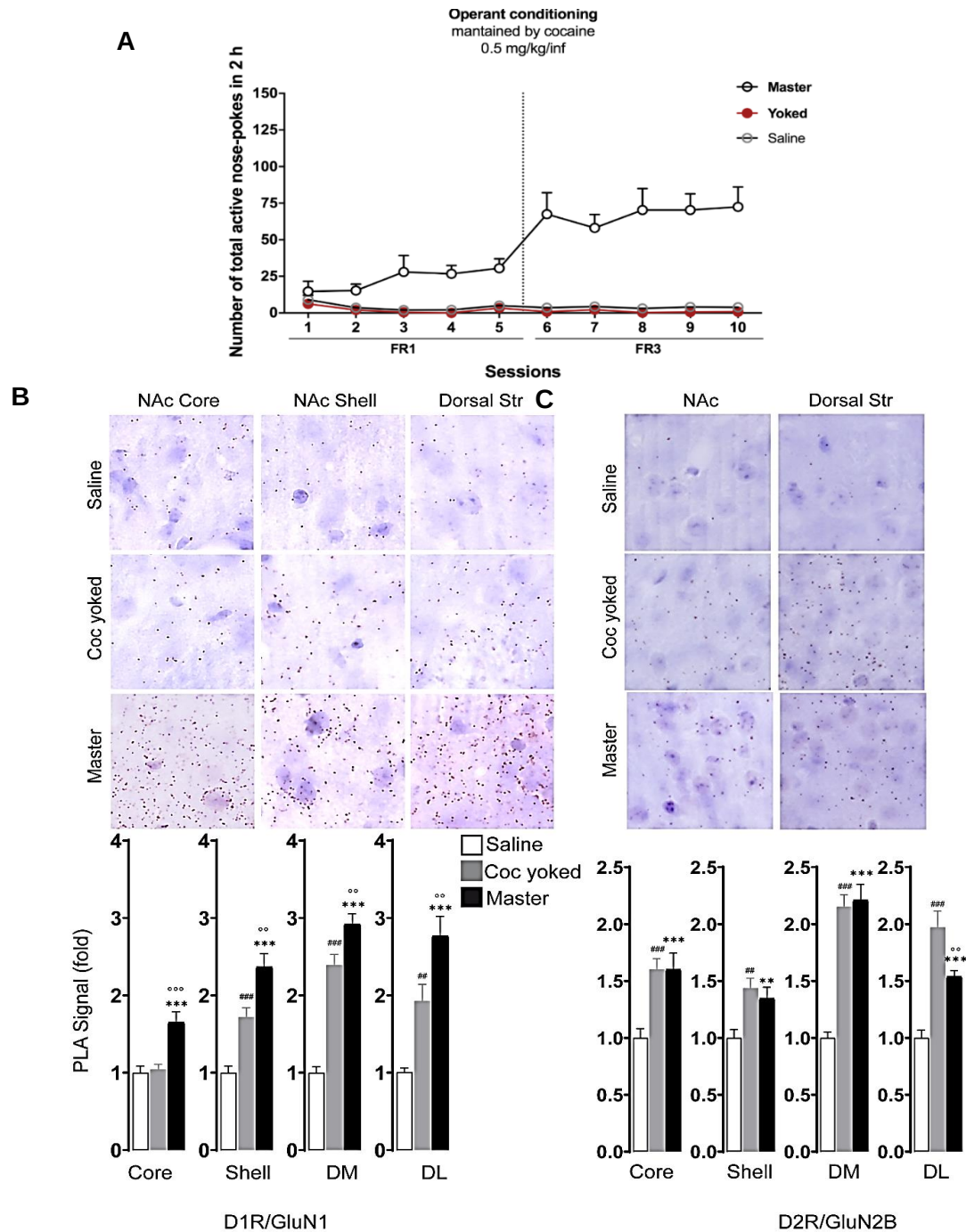


Figure 36 : L'auto-administration de la cocaïne est associée à une augmentation des hétéromères DAR/NMDAR.

(A) nombre d'entrée du museau dans le trou actif dans une session de 2h/jour sur 10 jours donc 5 jours en ratio forcé de 1 (FR1) et 5 jours en FR2. Détection par PLA et quantification des hétéromères (B) D1R/GluN1 et (C) D2R/GluN2B, 24h après chez les animaux s'auto-administrant de la saline ou de la cocaïne (Master) ou recevant de manière passive de la cocaïne (Coc yoked). Le signal PLA est représenté en ratio d'augmentation par rapport au groupe salin. ANOVA une voie. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ master vs saline ; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ coc yoked vs saline ; °° $P < 0.01$, °°° $P < 0.001$ Master vs coc yoked.

(Figure 36). Cet effet n'est pas retrouvé pour les hétéromères D2R/GluN2B qui augmentent au même niveau chez « les yoked » et les « master ». D'autre part, l'augmentation de ces hétéromères est plus importante dans le striatum dorsal que dans le NAcc ce qui suggère une implication plus importante du striatum dorsal dans les tâches instrumentales et pourrait même sous-tendre le

transfert progressif de la plasticité induite par la cocaïne du NAc au striatum dorsal dans la tâche d'auto-administration à la cocaïne (Everitt and Robbins, 2013). Cette étude suggère que quelles que soient les modalités, l'exposition à la cocaïne favorise l'hétéromérisation des DAR avec les NMDAR dans le striatum. Compte tenu du rôle différentiel des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B sur les phases de développement et de maintien de réponses comportementales non opérantes que nous avons mis en évidence, l'étude de la modulation de ces hétéromères sera également réalisée après les phases d'extinction et de rechute de l'auto-administration. D'autre part, les méthodes d'acquisition et de quantification automatisées que j'ai mises au point permettront également d'étendre cette analyse à d'autres structures du circuit de la récompense dans toutes les phases de l'auto-administration à la cocaïne dans un délai raisonnable.

Pour savoir si les hétéromères peuvent être modulés par des récompenses naturelles, nous avons étudié la modulation de ces hétéromères dans un paradigme d'auto-administration de nourriture en collaboration avec Pierre Trifilieff et Roman Walle à l'INRA de Bordeaux. Mais, nous n'avons pas trouvé de différences des niveaux d'hétéromères D1R/GluN1 chez les animaux ayant appris à s'auto-administrer la nourriture par rapport aux contrôles (Figure 37). Nous discutons plus bas des différences entre récompenses naturelles et drogues addictives.

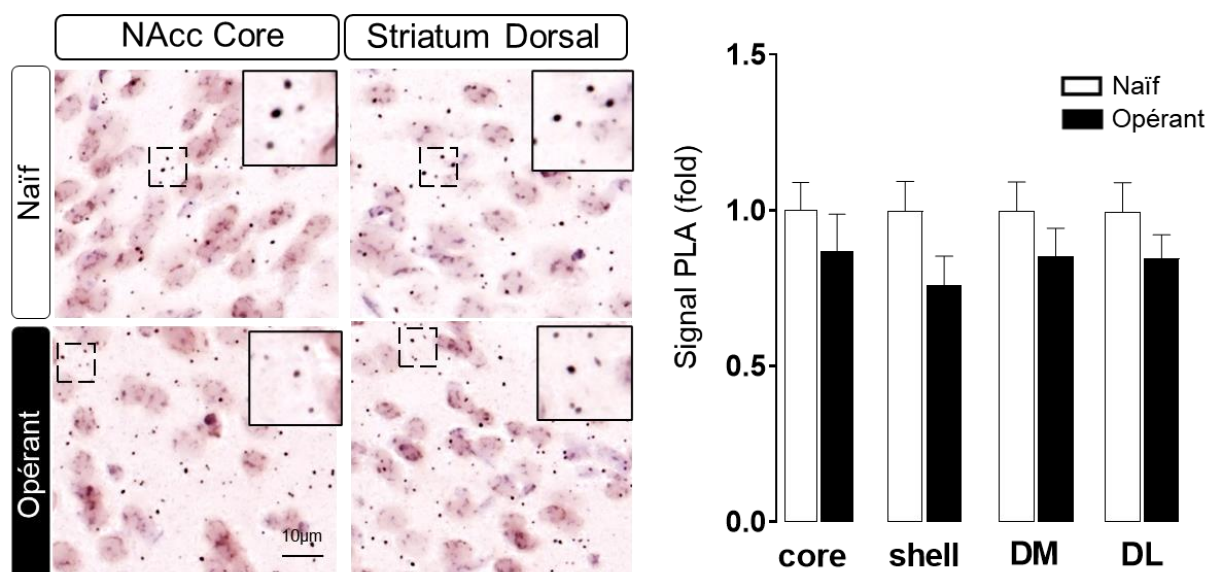


Figure 37: Les hétéromères D1R/GluN1 ne sont pas modulés par l'auto-administration de nourriture. Détection et quantification des hétéromères D1R/GluN1 dans les différentes régions striatales chez des souris naïves et des souris ayant appris à s'auto-administrer de la nourriture. Le signal PLA est représenté en ratio d'augmentation par rapport au groupe naïf. Test T de Student. $P > 0.05$ naïf vs opérant, $n = 28-84$ champs/structure provenant de 7 souris/groupes. DM : striatum dorsomédian, DL : striatum dorsolatéral.

e) *Modulation des hétéromères DAR/NMDAR par d'autres drogues d'abus*

En dépit de leurs modes d'action distincts, les substances addictives ont en commun d'augmenter la DA (Di Chiara and Imperato, 1988) et d'activer la voie ERK (Valjent et al., 2004) dans le striatum. D'autre part, la toxicomanie chez l'humain est rarement « mono-substance » et la consommation de multiples drogues a des conséquences plus néfastes que encore que l'usage d'une substance

seule (Rosselli and Ardila, 1996). Nous étudierons donc la modulation de ces hétéromères par d'autres drogues comme la nicotine, l'alcool ou la morphine, administrées séparément ou en combinaison pour mimer l'exposition à de multiples substances addictives chez la souris. L'hétéromérisation des DAR/NMDAR sera également analysée à partir de tissus post-mortem humains issus de sujets avec un historique de « poly-addiction ». Ces études permettront de définir si la formation des hétéromères DAR/NMDAR est spécifique de la cocaïne ou si elle est généralisable à toutes les substances addictives.

2. Mécanismes potentiellement impliqués dans la formation des hétéromères DAR/NMDAR en réponse à la cocaïne.

a) *Niveaux d'expression et adressage des récepteurs partenaires*

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette augmentation d'hétéromérisation induite par la cocaïne. Tout d'abord, nous avons envisagé que l'exposition répétée à la cocaïne puisse modifier l'expression globale des D1R, D2R et des sous-unités NMDAR. Nous avons vérifié cette hypothèse par western blot et n'avons pas observé de changement d'expression de ces protéines. A notre connaissance, aucune étude ayant utilisé un paradigme de sensibilisation locomotrice semblable au notre (5 jours, 15mg/kg, 24h après la dernière injection) n'a étudié l'expression protéique de ces récepteurs dans le striatum. Cependant, une étude a reporté une diminution de la fixation du raclopride radiomarqué sur le D2R, suggérant une baisse de 50% de son expression (Thompson et al., 2010). Nous n'avons toutefois pas observé de tels changements d'expression par western blot ce qui suggère que, dans notre paradigme expérimental, l'augmentation des hétéromères DAR/NMDAR induite par la cocaïne ne repose pas sur une augmentation globale des niveaux d'expression des protéines partenaires dans l'ensemble des types cellulaires du striatum. Ceci n'exclut pas une augmentation des niveaux d'expressions de ces récepteurs dans un type cellulaire précis. De même, les niveaux globaux d'expression des récepteurs que nous avons mesurés à partir de lysats totaux de striatum ne nous permettent pas d'exclure que la formation des hétéromères induite par la cocaïne ne repose pas sur une augmentation durable de l'expression à la membrane de ces récepteurs. En effet, il a été montré chez le rat, que des injections répétées de cocaïne (15mg/kg, 5 jours, 24h post-cocaïne) augmentent l'expression de surface des NMDAR exprimant la sous-unité GluN2B (GluN2B-NMDAR) dans le NAc générant des « synapses silencieuses » (Huang et al., 2009) qui sont des synapses glutamatergique naissantes, contenant une très grande proportion de GluN2B-NMDAR et peu ou pas de AMPAR (Groc et al., 2006). A cet égard, il serait intéressant de tester si les synapses silencieuses formées en réponse à la cocaïne contiennent une proportion importante d'hétéromères DAR/GluN2B-NMDAR, ou encore si le blocage des hétéromères impacte la formation des synapses silencieuses dans le NAc (Figure 38).

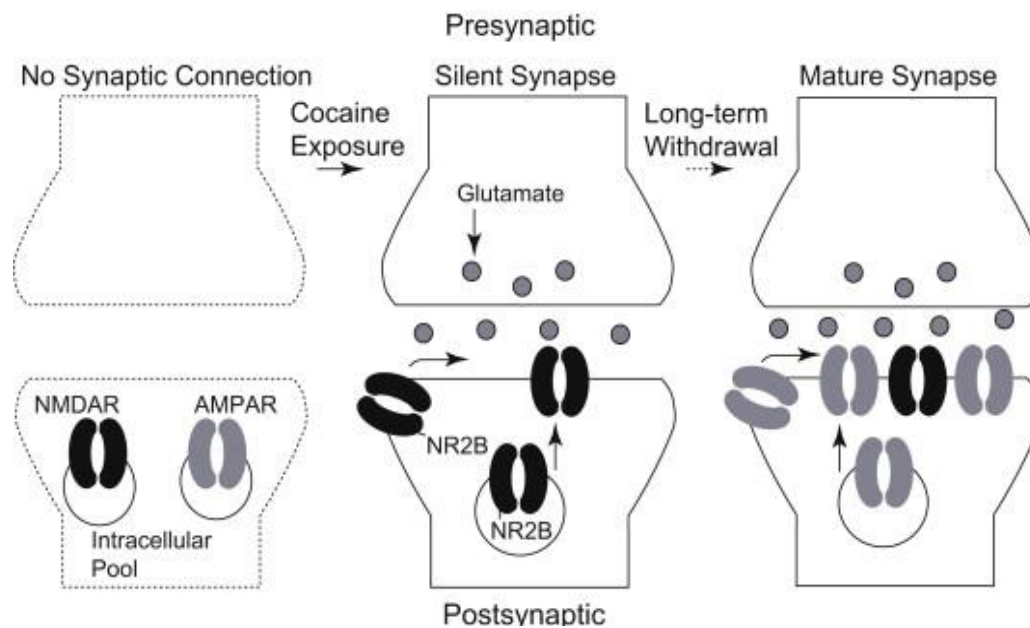


Figure 38 : Schéma hypothétique démontrant les processus cellulaires du développement et de la maturation des synapses silencieuses générées par l'exposition répétée à la cocaïne.

(À gauche) Etat basal, la connexion synaptique est absente, comme le montrent les lignes pointillées. (Milieu) Après une exposition répétée à la cocaïne, des synapses silencieuses sont générées par l'insertion de nouveaux NMDAR comprenant la sous-unité NR2B par diffusion latérale et/ou exocytose. (Droite) Un sevrage long est associé à l'insertion synaptique d'AMPA qui reflète le processus dit « unsliecing » qui conduit à la formation de synapses matures. D'après Lee et Dong 2011.

L'expression membranaire des récepteurs de la DA est elle aussi modifiée en réponse à la cocaïne. Une étude a en effet montré une augmentation de l'expression à la membrane des D1R dans le striatum et une diminution du D2R, 24h et jusqu'à 45 jours après l'auto-administration à la cocaïne (Conrad et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère donc que des modifications de l'expression de surface des récepteurs de la DA et du glutamate pourraient, au moins en partie, rendre compte des modifications d'hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B que nous avons observées dans le striatum en réponse à la cocaïne, hypothèse que nous allons également vérifier. L'augmentation des hétéromères DAR/NMDAR pourrait également être dû à des modifications de la dynamique de diffusion latérale et de la localisation synaptique de ces récepteurs induites en réponse à la cocaïne. En effets une étude menée *ex vivo* sur des tranches aigues de striatum montrent que la diffusion latérale du D1R est très dynamique (Scott et al., 2006) et que la stimulation des NMDAR diminue le taux de diffusion du D1R ce qui conduit à une augmentation de la proportion de D1R dans les épines dendritiques. Cet effet de la stimulation des NMDAR sur l'adressage synaptique des D1R est indépendant de l'entrée de Ca^{2+} par le NMDAR et dépend d'un changement de conformation du NMDAR suite à sa stimulation qui favorise la formation d'hétéromères D1R/NMDAR et permet un « synapse trapping » du D1R (Figure 39).

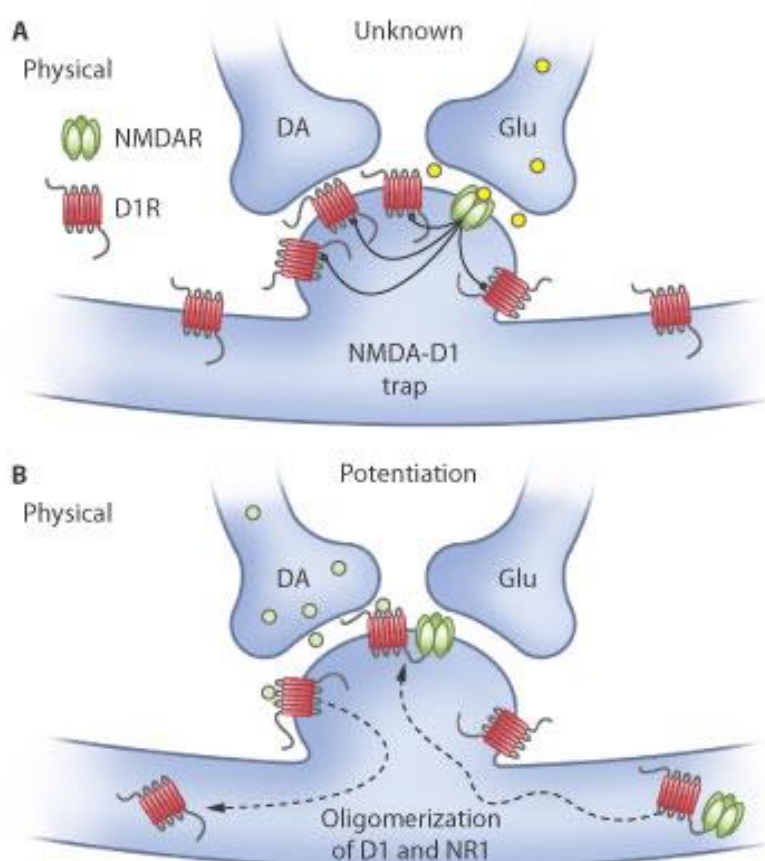


Figure 39 : Schéma hypothétique de formation des hétéromères D1R/GluN1.

(A) Principe du « trapping » des D1R par les NMDAR. L'activation des NMDAR piège les récepteurs D1R qui se déplacent par diffusion latérale à la membrane synaptique. (B) L'oligomérisation des récepteurs D1 avec la sous-unité GluN1 au niveau de la synapse empêche l'internalisation des récepteurs normalement produite par l'activation des récepteurs D1. Les oligomères D1R/GluN1 pourraient être transportés vers la synapse depuis le réticulum endoplasmique. D'après Cepeda et Levine 2006.

D'autre part, les techniques d'imagerie de particules uniques menées sur des cultures de neurones hippocampiques montrent que la diffusion des D1R est diminuée dans les synapses glutamatergiques et que la perturbation des hétéromères D1R/GluN1 bloque la stabilisation des D1R dans la synapse (Ladepêche et al., 2013). Aucune étude similaire n'a cependant été effectuée pour dans le cas des D2R.

b) Modulation des niveaux d'expression de la protéine PSD-95 par la cocaïne.

Bien que nous n'ayons pas observé de changement d'expression totale des récepteurs, nous avons montré, en accord avec des travaux antérieurs (Yao et al., 2004), une diminution de l'expression de la PSD-95 dans le NAc suite à une exposition répétée à la cocaïne (Figure 40). Cette diminution pourrait contribuer à la formation des hétéromères car la PSD-95 est le seul inhibiteur endogène connu de l'interaction D1R/GluN1 (Zhang et al., 2009). En effet, la PSD-95 interagit avec les parties C-terminales du D1R et de GluN2B et empêche, par compétition, l'interaction D1R/GluN1. D'autre part, il a été montré que PSD-95 interagit également avec le D2R (P. Sun et al., 2009b) et pourrait également antagoniser les hétéromères D2R/GluN2B. La baisse de l'expression de PSD-95 pourrait donc faciliter la formation des hétéromères DAR/NMDAR. Nous pourrions vérifier si la diminution de l'expression de PSD-95 est effectivement impliquée dans la formation de ces hétéromères. Nous pouvons pour cela diminuer l'expression de PSD-95 localement dans le striatum (approche shRNA par exemple), ou en surexprimant PSD-95, et en comparant les niveaux d'hétéromères DAR/NMDAR avec ceux d'animaux contrôles.

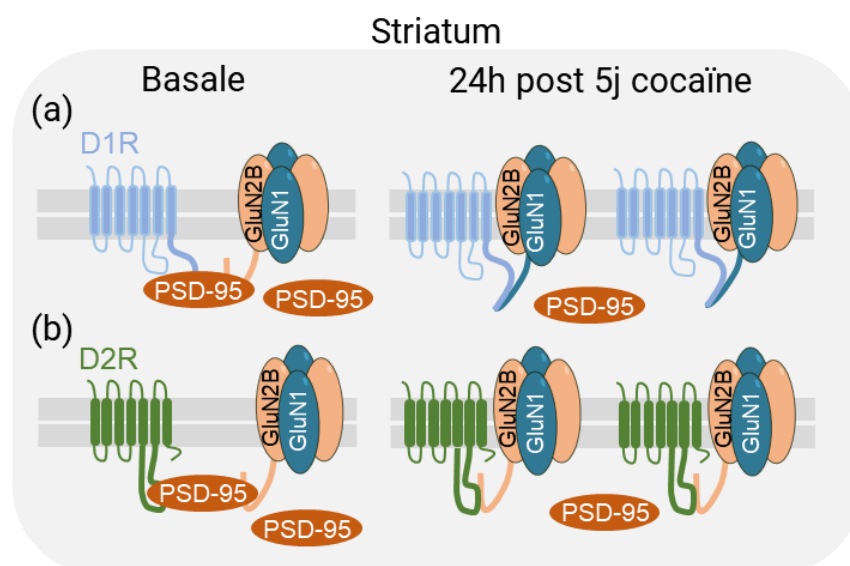


Figure 40 : La cocaïne, en diminuant l'expression de la PSD-95, favorise la formation des hétéromères DAR/NMDAR.

Des injections chroniques de cocaïne (une fois par jour pendant 5 jours) induisent une diminution de l'expression de PSD-95 qui inhibe la formation des hétéromères D1R/GluN1 (a) et des hétéromères D2R/GluN2B (b).

c) Implication de la stimulation des récepteurs de la DA et du glutamate dans la formation des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B en réponses à la cocaïne

Les études antérieures concernant le rôle de la stimulation des DAR ou des NMDAR dans la formation des hétéromères ont conduit à des résultats contradictoires (pour revue Andrianarivelo et al. 2019). Nous avons observé une augmentation des hétéromères DAR/NMDAR suite à des injections répétées de cocaïne qui entraîne une libération concomitante de DA et de glutamate dans le NAc (Parsons et al., 1991; Baker et al., 2002; Pierce et al., 1996; Reid et al., 1997; Zhang et al., 2001). Ceci pose la question du rôle respectif de la stimulation des DAR et des NMDAR dans la modulation des interactions entre ces récepteurs en réponse à la cocaïne.

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur des cultures primaires de neurones striataux ont montré qu'un agoniste D1R induit la formation de ces hétéromères alors qu'une faible dose de glutamate n'a pas d'effet. En revanche, la co-stimulation de neurones striataux avec un agoniste D1R en présence d'une faible dose de glutamate conduit à une hétéromérisation plus importante qu'avec l'agoniste D1R seul (Cahill et al. 2014). Ces résultats suggèrent donc un rôle prépondérant de la stimulation du D1R sur l'hétéromérisation D1R/GluN1 mais également un rôle synergique de la co-stimulation des deux récepteurs partenaires. En accord avec le rôle prépondérant du D1R, j'ai obtenu des données préliminaires montrant qu'une injection unique de cocaïne, qui n'induit la libération que de la DA (Di Chiara and Imperato, 1988 ; Lee et al., 2008) est suffisante pour déclencher l'hétéromérisation de D1R avec GluN1 (données non montrées). Ces observations vont donc en faveur d'un rôle important de la stimulation du D1R dans l'interaction D1R/GluN1. Toutefois, la densité de ces hétéromères observées après une injection unique de cocaïne est bien moins importante que celle observée suite à des injections répétées, ce qui est en faveur d'un effet synergique de la stimulation des récepteurs de la DA et du glutamate dans l'hétéromérisation D1R/GluN1 *in vivo* dans le NAc.

Dans le cas de l'interaction D2R/GluN2B, il a été montré qu'une forte dose de cocaïne induit une augmentation significative de la formation de ces complexes de récepteurs dans le striatum 30 min après l'injection. Cette augmentation est bloquée si l'on prétraite l'animal à l'éticlopride, un antagoniste compétitif des D2R (Liu et al., 2006), ce qui suggère ici aussi que la stimulation du D2R par la DA pourrait être nécessaire pour former des hétéromères D2R/NMDAR. En accord avec ces résultats, j'ai montré que, comme dans le cas des hétéromères D1R/GluN1, l'interaction D2R/GluN2B est accrue 24h après une seule injection de cocaïne (données non montrées), mais à des niveaux moindres que ceux observés dans le paradigme de sensibilisation locomotrice.

Afin de conclure de manière plus directe sur les implications respectives de la stimulation des DAR et du NMDAR dans la formation des hétéromères en réponse à la cocaïne, nous allons réaliser des injections d'antagonistes compétitifs des récepteurs D1R, D2R et NMDAR administrés ensemble ou séparément avant les injections de cocaïne dans un paradigme de sensibilisation locomotrice pour analyser par PLA les niveaux d'hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B.

d) Modification post-traductionnelles des récepteurs de la DAR et NMDAR et hétéromérisation

Enfin, les interactions DAR/NMDAR pourraient être favorisées (ou découplés) par des modifications post-traductionnelles de ces récepteurs. En effet, ces interactions sont de type électrostatique impliquant des effets d'attractions entre les résidus d'acides aminés chargés positivement et négativement. Une étude a identifié, par spectrométrie de masse réalisée avec des peptides synthétiques correspondants aux parties C-terminales de D1R et GluN1, les séquences clés pour l'interaction entre D1R et GluN1 (Figure 41). Il s'agit d'un épitope riche en arginine dans la cassette

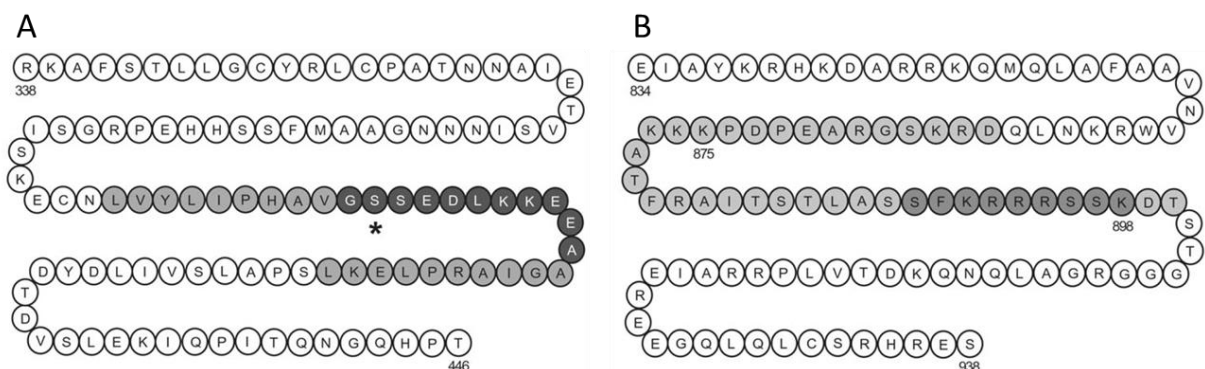


Figure 41 : Les séquences impliquées dans l'interaction D1R/GluN1.

(A) Séquences d'acides aminés de la partie C-terminale du D1R humain. En gris clair, la séquence du domaine t2 impliquée dans l'interaction avec GluN1. En gris sombre, les séquences indispensables pour la fixation à la cassette C1 de GluN1. La serine 397 (astérisque) pourrait être la cible de la caséine kinase.

(B) Séquence de la partie C-terminale de la sous-unité NMDAR GluN1. En gris clair, la séquence de la cassette C1 impliquée dans l'interaction avec le D1R. En gris sombre, les séquences indispensables pour la fixation au domaine t2 de D1R. D'après Woods et al 2005.

C1 de GluN1 qui interagit avec un épitope riche en acides aminés chargés négativement dans le domaine t2 du D1R (Woods et al., 2005b). Ces auteurs ont montré que la phosphorylation de la

serine 397 (s397) dans le domaine t2 du D1R, prédite pour être une cible de la caséine kinase-1 (CK1), favorise l'interaction D1R/GluN1. En accord avec ces résultats obtenus à partir de fragments C-terminaux des récepteurs, la mutation de s397 diminue également l'interaction entre les récepteurs D1R et GluN1 (Scott et al., 2006). Toutefois, la kinase responsable de cette phosphorylation de la s397 du D1R n'a pas été identifiée à ce jour. En ce qui concerne les hétéromères D2R/GluN2B, les séquences d'interactions du côté de GluN2B n'ont pas encore été identifiées. Toutefois, la troisième boucle intracellulaire du D2R, qui interagit avec GluN2B, est un site majeur de régulation du D2R qui possède également des sites de phosphorylation dont certains ciblés par les kinases des récepteurs couplés aux protéine G (GRK) joueraient un rôle dans le recyclage et l'adressage du récepteur (Cho et al. 2010) et qui pourraient participer à la formation des complexes D2R/GluN2B. Nous pourrions tester cette hypothèse en surexprimant viralement une version du D2R mutée pour ces sites de phosphorylations et en réalisant des PLA en conditions contrôle et en réponse à la cocaïne.

Comme nous l'avons vu, il existe de nombreux mécanismes par lesquels la cocaïne pourrait induire la formation d'hétéromères DAR/NMDAR. Il est important de comprendre chacun de ces mécanismes pour pouvoir développer des stratégies interférentes plus précises et plus efficaces.

B. Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans les adaptations à long-terme induites par la cocaïne

1. Validation d'une approche permettant d'étudier les fonctions des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B *in vivo*

Afin d'étudier les rôles des hétéromères DAR/NMDAR, nous avons développé une stratégie basée sur l'utilisation d'un virus adéno-associé de serotype 9 (AAV9) qui permet, sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la doxycycline, l'expression bicistronique de la protéine reportrice fluorescente rouge (RFP) et la cassette C1 de la partie C-terminale de GluN1, (AAV-Tet-On-GluN1C1 qu'on abrègera en « C1 » pour la suite) (Figure 42) pour empêcher l'interaction entre D1R et GluN1. Des études antérieures menées au laboratoire ont permis de montrer que le peptide C1 permet de bloquer les hétéromères *in vitro*, tout en préservant les fonctions du D1R (production d'AMPc et activation de la PKA) ou du NMDAR (flux calciques) indépendamment de leur hétéromérisation (Cahill et al. 2014). Le virus contrôle correspondant contient une séquence qui code pour la cassette C1 tronquée des 9 acides aminés basiques (nommée C1Δ), correspondants au motif riche en arginine de C1 qui est indispensable pour l'interaction de GluN1 avec le D1R (Woods et al. 2005). Le laboratoire a précédemment établi, *in vitro*, que cette séquence C1Δ ne bloque pas l'interaction D1R/GluN1 et ne présente aucun effet sur la signalisation en aval du D1R et du NMDAR (Cahill et al. 2014).

Pour découpler le D2R de GluN2B, nous avons développé un AAV de structure similaire à celle précédemment décrite mais la séquence interférente correspond, dans ce cas, à un fragment dans la troisième boucle intracellulaire du D2R, le peptide D2R-IL3 (AAV-Tet-On-D2R-IL3 qu'on abrégera en « IL3 » pour la suite ; Figure 42). En effet, une étude antérieure a mis en évidence l'importance du segment IL3 de D2R pour son interaction avec GluN2B (Liu et al. 2006). Par recoupement entre

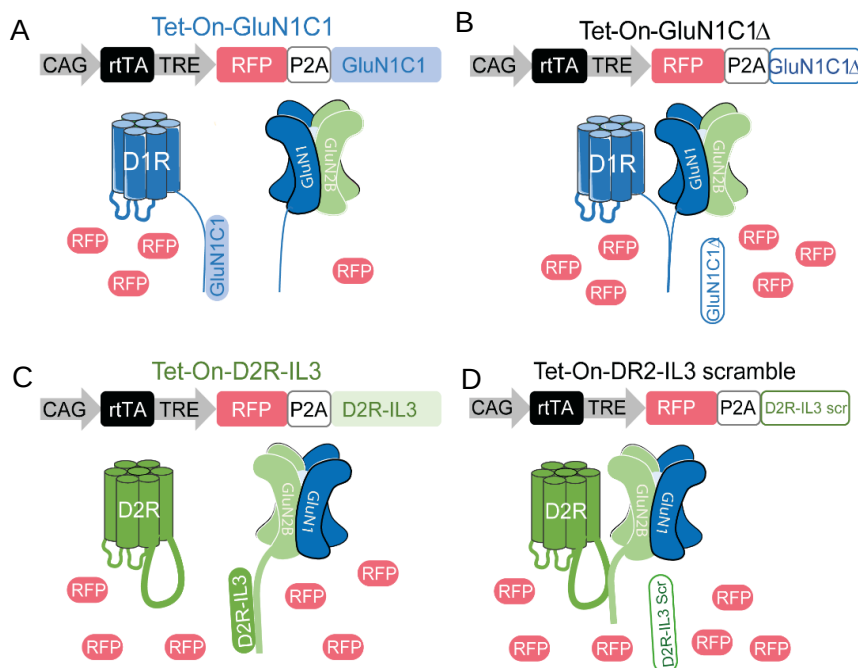


Figure 42 : Illustration schématique des constructions virales utilisées dans l'étude.

(A) L'AAV-Tet-On-GluN1-C1 exprime la RFP et la cassette C1 de GluN1 qui bloque l'interaction D1R/GluN1, (B) l'AAV-Tet-On-GluN1-C1 Δ exprime la RFP et une version tronquée de C1 qui n'a pas d'effet, (C) l'AAV-Tet-On-D2R-IL3 exprime la RFP et une séquence dans la 3^{ème} boucle intracellulaire du D2R capable de bloquer l'interaction D2R/GluN2B, (D) l'AAV-Tet-On-D2R-scramble exprime la RFP et une séquence scramble qui n'a pas d'effet,

différentes études, nous avons raccourci la taille du fragment IL3 utilisé par Liu et ses collaborateurs qui comprenait aussi une partie du domaine IL3 impliqué dans l'interaction de D2R avec A2AR (Ciruela et al. 2004). Dans le segment IL3, les acides aminés clés pour l'interaction avec GluN2B n'ont pas été caractérisés. C'est pour cette raison que nous avons utilisé comme contrôle un peptide « scramble » correspondant à la séquence du fragment IL3 avec les séquences d'acides aminés placés dans un ordre aléatoire et ne correspondant à aucune autre séquence protéique chez la souris.

Cette approche virale présente deux avantages majeurs, notamment par rapport aux peptides pénétrants utilisés dans d'autres études réalisées au laboratoire (Lavaur et al. 2007 ; Besnard et al. 2011 ; Cahill et al. 2014). D'une part, la présence d'une protéine fluorescente reportrice permet de visualiser les cellules infectées et d'apprécier des paramètres importants tels que la localisation du virus injecté par stéréotaxie, l'étendue de la zone de diffusion et la proportion de cellules infectées. D'autre part, l'utilisation d'un promoteur contrôlé par la doxycycline permet d'induire l'expression du virus dans une fenêtre de temps précise durant laquelle l'expression du peptide est continue pour contrecarrer l'action des peptidases endogènes.

Le but de mon travail étant d'étudier le rôle de ces deux sous-types d'hétéromères *in vivo*, j'ai tout d'abord vérifié que les traitements à la doxycycline nécessaires à l'expression des séquences interférentes n'étaient pas toxiques pour les souris. En effet, après plusieurs tests de traitements à

la doxycycline, celui permettant une expression forte et étendue de la protéine rapportrice RFP consistait en l'utilisation combinée de doxycycline 9Ter-Butyl, une doxycycline modifiée pour être plus hydrophobe et passer plus facilement la barrière hémato-encéphalique, injectée quotidiennement pendant 4 jours et une supplémentation de l'eau de boisson des souris avec de la doxycycline sous sa forme hydrochlorique « classique » pour maintenir l'expression au cours du temps. Même si nous avons utilisé des doses communément utilisées dans la littérature et qui n'induisent pas de toxicité (Redelsperger et al., 2016), j'ai néanmoins vérifié chez des souris non injectées avec les AAV que ce traitement n'avait d'effet ni sur le poids des animaux, ni sur la locomotion basale des souris, ni même sur la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne par rapport à des souris non traitées.

Au niveau cellulaire, nous n'avons pas observé de mort neuronale induite par l'expression de ces constructions pendant plus d'une semaine dans le NAc. Nous avons étudié la cinétique d'induction de l'expression des constructions sur la base de la RFP et nous avons trouvé que 24h de traitement à la doxycycline suffisait pour avoir une expression de la RFP. Pour atteindre un plateau d'expression maximal, 5 jours de traitements sont nécessaires. Deux semaines après la fin du traitement, nous n'observons plus de cellules RFP positives.

Concernant l'efficacité de cette approche virale, nous avons observé par PLA une diminution drastique des interactions entre D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans les neurones du NAc infectés avec les virus Tet-On-C1 et Tet-On-IL3, respectivement. En accord avec les résultats précédents du laboratoire, la perturbation des hétéromères D1R/GluN1 bloque bien la phosphorylation de GluN2B et de ERK induites par une injection aigüe de cocaïne. Nous avons aussi montré que le virus IL3 n'a pas d'effet sur les fonctions du D2R et du NMDAR, indépendamment de leur hétéromérisation. En effet, l'expression de la séquence interférente IL3 n'altère pas la diminution de la production d'AMPc par un agoniste D2R ni l'amplitude et la cinétique des courants NMDA post-synaptiques évoqués par une stimulation électrique du cortex. L'ensemble de ces résultats montre donc que la stratégie que nous avons développée permet de bloquer efficacement les hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B *in vivo* de façon contrôlée dans le temps, tout en préservant les fonctions individuelles des récepteurs partenaires.

2. Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans les altérations synaptiques induites par la cocaïne au sein du striatum.

Dans le but d'étudier l'impact des hétéromères DAR/NMDAR sur les altérations de transmission glutamatergique induites par la cocaïne dans le striatum, nous avons utilisé un protocole mis au point dans le laboratoire du groupe du Dr Christian Lüscher. Selon ce paradigme, cinq injections de cocaïne quotidiennes suivies de 10 jours de sevrage sont associées à une facilitation à long terme de la transmission synaptique glutamatergique des afférences corticales projetant sur les D1R-MSN (mais pas de celles projetant sur les D2R-MSN) qui est nécessaire au développement de la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne (Pascoli et al., 2012; Terrier et al., 2016).

En collaboration avec le groupe de Jacques Barik, nous avons observé comme attendu que les D1R-MSN du NAc (visualisé grâce à une approche virale) infectés avec le virus contrôle (Tet-On-C1Δ) présentaient bien une augmentation du ratio AMPA/NMDA (A/N) après 10 jours de sevrage à la cocaïne (Terrier et al. 2016). De manière intéressante, nous avons pu montrer que le blocage des hétéromères D1R/GluN1 avec l'AAV Tet-On-C1 bloque l'augmentation du ratio des courants A/N induite par la cocaïne. Ceci est en accord avec les résultats précédents du laboratoire qui montrent que l'interaction entre D1R et GluN1 est joue un rôle central dans l'induction de la LTP striatale au niveau des D1R-MSN (E. Cahill et al., 2014). Il a également été montré que la LTP induite par la cocaïne au niveau des synapses glutamatergiques sur les D1R-MSN du NAc dépendait de l'activation de la voie ERK (Pascoli et al., 2012). A cet égard, le laboratoire a montré que les hétéromères D1R/GluN1 contrôlent la potentialisation des flux calciques par NMDAR induite par la stimulation du D1R qui déclenche l'activation de ERK par la cocaïne (Pascoli et al. 2011)(E. Cahill et al., 2014). Ainsi, l'inhibition de la voie ERK pourrait, au moins en partie, rendre compte du blocage de la LTP induite dans les D1R-MSN par la cocaïne lorsque les D1R et NMDAR sont découplés.

De manière intéressante, la modulation des hétéromères D1R/GluN1 semble être corrélée aux modifications de la plasticité glutamatergique induite par la cocaïne. En effet, les hétéromères D1R/GluN1 augmentent au 1^{er} jour d'abstinence puis diminuent pendant le sevrage et repartent à la hausse après une réexposition à la cocaïne. Kourrich et ses collègues ont observé une diminution des ratio A/N dans le NAc au premier jour d'abstinence, qui pourrait être dû, selon les auteurs, à une augmentation du nombre de NMDAR à la surface ou de leur efficacité. Une augmentation des hétéromères D1R/GluN1 24h après la dernière injection pourrait expliquer cette augmentation de l'efficacité des NMDAR. En effet, il a été montré que le blocage de l'interaction entre D1R et GluN1 bloquait la phosphorylation de GluN2B sur Tyr 1472 induite par la cocaïne (Pascoli et al. 2011 ; Cahill et al. 2014), une modification post-traductionnelle qui promeut l'expression de surface des NMDAR contenant la sous-unité GluN2B (Hallett et al. 2006).

Au cours d'un sevrage prolongé, Kourrich et ses collègues, ainsi que le groupe de Christian Lüscher ont observé une augmentation du ratio A/N qui serait attribuable à une augmentation de l'efficacité et du nombre des AMPAR et/ou une diminution du nombre ou de l'efficacité des NMDAR (Terrier et al., 2016). Concernant les NMDAR, la diminution des hétéromères D1R/GluN1 observée après 7 jours de sevrage pourrait rendre compte d'une réduction de l'efficacité des NMDAR. D'autre part, le groupe de Marina Wolf a détecté une augmentation des AMPAR perméables au calcium (CP-AMPA) entre 7 et 21 jours post-cocaïne (Boudreau and Wolf, 2005), une augmentation qui a lieu dans les D1R (Terrier et al., 2016) qui renforce l'efficacité de la signalisation AMPAR. Une hypothèse serait que l'augmentation initiale des hétéromères D1R/NMDAR pourrait contribuer à l'augmentation des AMPAR calcium perméable durant le sevrage. En effet, un mécanisme possible qui expliquerait le lien entre les hétéromères D1R/GluN1 et l'insertion des CP-AMPA réside dans la capacité des hétéromères D1R/GluN1 à contrôler la facilitation des flux calciques dépendants des NMDAR dans les D1R-MSN lors d'augmentations des taux de DA. Cette entrée de calcium accrue

pourrait activer la CaMKII, une kinase capable augmenter l'expression à la membrane synaptique de GluA1 en la phosphorylant sur la serine 831, un événement clé dans le maintien de la LTP NMDAR-dépendante (Barria et al., 1997; Robison, 2014). D'autres part, l'augmentation de Ca^{2+} dépendante des hétéromères D1R/GluN1 peut promouvoir l'expression de surface des AMPAR en activant la voie ERK (Zhu et al., 2002) qui inhibe à son tour la phosphodiesterase 4. L'inhibition de la phosphodiesterase 4, va augmenter la production de l'AMPc, activer la voie PKA qui phosphoryle DARPP-32 et GluA1 et augmenter l'expression de surface de GluA1 (Song et al., 2013) (Figure 43).

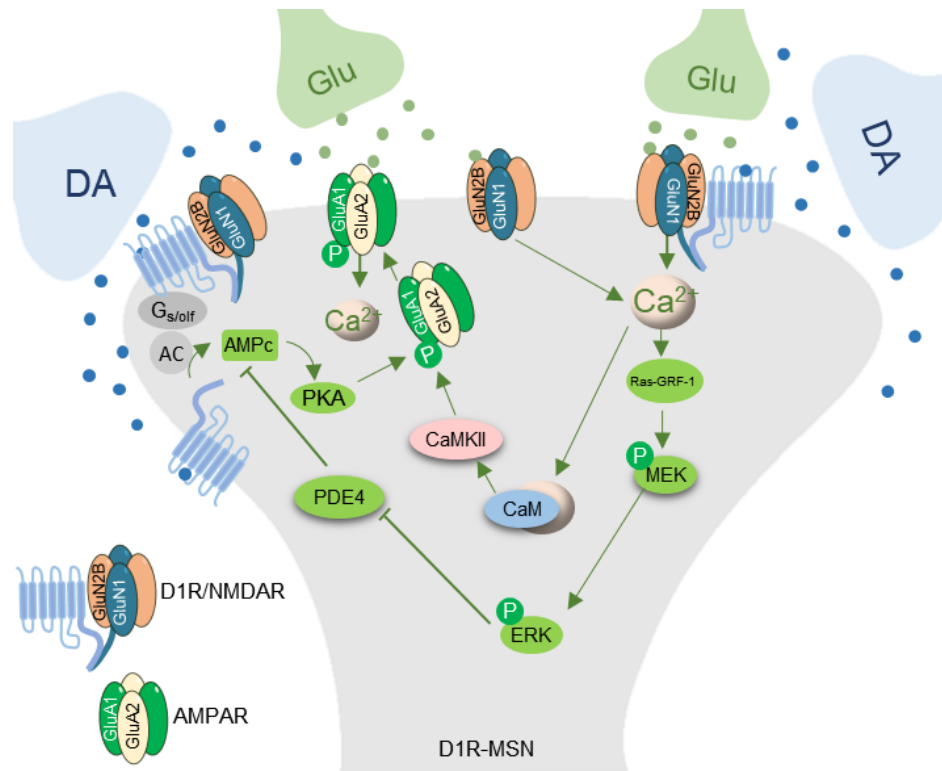


Figure 43 : Schéma hypothétique du rôle des hétéromères D1R/GluN1 dans l'insertion des AMPAR perméables au Ca^{2+} . Les hétéromères D1R/GluN1 permettent la facilitation des courant Ca^{2+} dépendants des NMDAR après stimulation du D1R. Ceci conduit à l'activation de ERK qui permet de lever l'inhibition par la phosphodiesterase 4 de la production d'AMPc. L'augmentation d'AMPc va activer la PKA qui phosphoryla la sous-unité AMPAR GluA1 et augmentent l'expression des GluA1-AMPAR à la surface membranaire. Le Ca^{2+} permet aussi d'activer la voie calcium-calmodule-CaMKII, la CaMKII en phosphorylant la sous-unité GluA1 permet d'augmenter l'adressage des GluA1-AMPAR à la membrane.

Nous avons déjà montré que les hétéromères D1R/GluN1 contrôlent l'activation de ERK. Pour tester cette hypothèse d'un lien entre insertion des CP-AMPAR et hétéromères D1R/GluN1 il faudrait détecter les CP-AMPAR chez des animaux injectés avec le virus C1 ou C1 Δ , 10 jours après une sensibilisation locomotrice. Une diminution de l'augmentation attendue de l'expression des CP-AMPAR suggérerait un rôle clé des hétéromères D1R/GluN1 dans leur régulations en réponse à la cocaïne.

Il a été montré que les hétéromères D2R/GluN2B, sont nécessaires pour l'inhibition des courants NMDAR à la suite de la stimulation du D2R (Liu et al., 2006). Dans cette étude, nous montrons dans les conditions basales que le blocage de ce complexe n'affecte pas les ratio A/N, ni l'amplitude et la cinétique des courants NMDAR. Ces résultats montrent donc que l'expression virale du fragment

IL3 choisi pour bloquer l'interaction D2R/GluN2B n'altère pas la transmission glutamatergique basale au niveau des synapses formées par les afférences corticales qui projettent sur les D2R-MSN. En réponse à des injections répétées de cocaïne suivies d'un sevrage de 10 jours il a été montré que la cocaïne n'altérerait pas la transmission glutamatergique au niveau des synapses glutamatergiques formées par les afférences corticales projetant sur les D2R-MSN (Terrier et al. 2016). C'est pour cette raison que nous n'avons pas étudié l'impact du blocage des interactions D2R/GluN2B après traitement à la cocaïne, mais uniquement dans les conditions basales. Toutefois, dans la paradigme d'auto-administration de cocaïne, lorsque les animaux ont un accès prolongé à la cocaïne, une forte augmentation de l'indice de rectification des courant AMPAR suggère une augmentation des CP-AMPA qui est observée spécifiquement au niveau des synapses de l'amygdale basolatérale (BLA) vers les D2R-MSN (Terrier et al., 2016). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des hétéromères D2R/GluN2B sur la plasticité induite au niveau de ces synapses dans ce paradigme comportemental opérant.

3. Rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans la sensibilisation locomotrice et la préférence de place conditionné à la cocaïne

Nous avons montré que les hétéromères D1R/GluN1 sont nécessaires pour le développement de la sensibilisation locomotrice et de la CPP en réponse à la cocaïne. Ce résultat est en accord notre observation d'une inhibition de la potentialisation à long terme de la transmission glutamatergique induite par la cocaïne au niveau des afférences corticales projetant sur les D1R-MSN lorsque les hétéromères D1R/GluN1 sont dissociés (voir chapitre précédent). En effet, des approches optogénétiques ont permis d'établir un lien causal entre la plasticité induite par la cocaïne sur ces synapses glutamatergiques sur les D1R-MSN et le développement de la sensibilisation comportementales à la cocaïne (Pascoli et al., 2012). Notre étude permet donc d'identifier les hétéromères D1R/GluN1 comme des cibles endogènes de choix pour bloquer la plasticité synaptique à long terme induite par la cocaïne au niveau D1R-MSN et le développement de la sensibilisation comportementales qui en résulte.

L'observation d'un rôle central des hétéromères D1R/GluN1 pour le développement des réponses comportementales induite par des injections répétées de cocaïne est également en accord avec les résultats précédents du laboratoire montrant un rôle de ces hétéromères dans le protocole « aigu » de sensibilisation locomotrice à deux injections (E. Cahill et al., 2014). Ainsi, en empêchant la facilitation des courants NMDA par la DA dans les D1R-MSN (Cahill et al. 2014), l'inhibition des hétéromères D1R/GluN1 bloquerait l'activation de ce sous-type de MSN induite par la cocaïne qui est nécessaire pour l'acquisition de la sensibilisation locomotrice et de la CPP, comme l'ont montré de nombreuses études basées sur l'utilisation d'approches optogénétique ou chémogénétique (Lobo et al., 2010b ; Ferguson et al., 2011b ; Chandra et al., 2013 ; Lobo et al., 2010b; Calipari et al., 2016). Les hétéromères D1R/GluN1 pourraient participer à l'acquisition de ces comportements en modulant l'activation de la voie ERK (et d'autres voies de signalisations calcium-dépendantes) et la mise place

des altérations de la plasticité des synapses glutamatergiques induite par la cocaïne. En effet, l'activation de ERK est nécessaire pour l'acquisition de la sensibilisation locomotrice (Emmanuel Valjent et al., 2006; Ferguson et al., 2006) et de la CPP (Valjent et al., 2000). Nous avons également montré en collaboration avec Nicolas Heck que le blocage de ces hétéromères durant la CPP bloque les adaptations morphologiques induite par la cocaïne. Les hétéromères D1R/GluN1 pourraient jouer un rôle dans la génération et/ou du maintien de nouvelles épines en régulant l'activité de la voie ERK en réponse à la cocaïne. En effet, la voie ERK contrôle à la fois la pousse de nouvelles épines dans le NAc en réponses à la cocaïne, mais également leur maintien par une voie de signalisation nécessitant la phosphorylation par ERK de la protéine cytoplasmique MNK-1 (Dos Santos et al., 2017).

D'autres part, nos résultats montrent que les hétéromères D1R/GluN1 formés en réponse à la cocaïne dans les parties dorsales et ventrales du striatum ne sont pas nécessaires au maintien de la sensibilisation locomotrice et de la CPP. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les niveaux d'hétéromères D1R/GluN1 sont diminués durant le sevrage. Ces résultats contrastent l'inhibition chimogénétique des D1R-MSN du striatum dorsal pendant une période de sevrage qui altère le maintien de la sensibilisation induite par l'amphétamine (Ferguson et al. 2011). Ceci suggère d'une part que la manipulation de l'activité des D1R-MSN n'a pas les mêmes conséquences que le blocage des hétéromères et d'autre part que les hétéromères D1R/GluN1 ont un rôle restreint aux phases initiales des altérations induites par la cocaïne.

Dans les D2R-MSN, nos résultats montrent que les hétéromères D2R/GluN2B sont nécessaires pour le développement de la CPP et mais également pour le maintien de la sensibilisation locomotrice et de la CPP. De nombreuses études ont montré que l'activation des D2R-MSN bloque les altérations comportementales en réponse à des exposition répétées à la cocaïne (Farrell et al., 2013b; Lobo et al., 2010b; Song et al., 2014). Dans notre étude, le blocage des hétéromères D2R/GluN2B pourrait lever l'inhibition des courants NMDAR par le DA dans les D2R-MSN et ainsi augmenter l'activité des D2R-MSN qui agirait comme un frein sur les réponses induites par la cocaïne. En effet, des études montrent que l'activation par optogénétique des D2R-MSN diminue la CPP induite par la cocaïne (Lobo et al., 2010b). En accord avec l'implication spécifique des hétéromères D2R/GluN2B dans le maintien de la sensibilisation locomotrice, il a été montré que l'activation optogénétique des D2R-MSN pendant les injections de cocaïne n'a pas d'effet dans le développement de la sensibilisation comportementale alors que leur inhibition pendant le sevrage altère le maintien de cette sensibilisation (Song et al., 2014).

Nous avons vérifié de manière indirecte si le blocage de ces hétéromères pouvait effectivement influencer l'activité des D2R-MSN. Pour cela nous avons analysé 24h, après la réexposition à la cocaïne, l'expression du facteur de transcription Δ FosB. Δ FosB a été choisi ici, comme indicateur indirect de l'activité neuronale. En effet, il a été montré que Δ FosB s'accumule spécifiquement dans les D1R-MSN du NAc en réponse à des administrations chroniques de cocaïne (Hope et al., 1994) (Lobo et al., 2013a) en aval de l'activation la CaMKII par le calcium (Robison et al., 2013). Nous

avons observé une induction « ectopique » de l'expression de Δ FosB, dans les D2R-MSN infectés par le virus IL3, ce qui suggère une augmentation de la signalisation calcique dans les D2R-MSN en réponse à la cocaïne lorsque les hétéromères D2R/GluN2B sont bloqués. Cette augmentation de l'activité des D2R-MSN, suite au blocage des hétéromères D2R/GluN2B, pourrait contrecarrer l'augmentation de l'activité des D1R-MSN en réponse à la cocaïne en augmentant le poids de la voie indirecte et probablement le poids des inhibitions collatérales des D2R-MSN sur les D1R-MSN (Burke et al., 2017; Cazorla et al., 2014; Dobbs et al., 2016). En effet, si nous avons quantifié une augmentation de l'expression de Δ FosB dans les D2R-MSN en réponse à la cocaïne (visualisés par une approche virale) lors du blocage des hétéromères D2R/GluN2B, nous avons également observé une tendance à la diminution de son expression dans les neurones non D2R-MSN (GFP négatifs). Ceci pourrait suggérer que l'inhibition des hétéromères D2R/GluN2B pourrait s'accompagner d'une baisse de l'activité du réseau local dans le NAc. Néanmoins ces hypothèses sont à vérifier plus amplement, notamment en mesurant l'activité des D2R-MSN infecté avec le virus IL3 ou scramble, en imagerie calcique ou en électrophysiologie en réponse à la cocaïne.

Nous ne pouvons pas exclure que les effets comportementaux observés lors du blocage de l'interaction D2R/GluN2B ne soient pas dû à un effet du peptide IL3 sur l'interaction entre le D2R et la β -arrestine. En effet, la β -arrestine interagit avec le D2R au niveau de la boucle IL3 mais les résidus clés pour cette interaction sont en amont de la séquence d'interaction du D2R avec GluN2B (Clayton et al., 2014). Il n'est pas exclu qu'en bloquant l'interaction D2R/GluN2B, nous favorisons le couplage du D2R avec la β -arrestine ce qui pourrait par exemple faciliter l'internalisation du D2R à la suite de sa stimulation par la DA. En effet chez des souris KO pour le D2R qui ne présente pas l'hyperlocomotion en réponse à la cocaïne, la surexpression d'un D2R capable de recruter l'arrestine mais pas la protéine G, restaure la réponse locomotrice aigue à la cocaïne, ce qui montre que la signalisation arrestine est nécessaire pour cette réponse (Donthamsetti et al., 2018). Mais dans notre cas, le blocage des D2R/GluN2B n'altère pas l'inhibition de la production d'AMPc induite par agoniste D2R ce qui suggère que la signalisation D2R via les protéines G est intacte. Nous pourrions réaliser des vérifications supplémentaires par exemple en réalisant des PLA pour voir si le blocage des hétéromères D2R/GluN2B peut perturber l'interaction D2R/ β -arrestine en condition base et en réponse à la cocaïne.

L'ensemble de nos résultats obtenus par manipulation des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B formés dans les D1R-MSN et D2R-MSN, respectivement, met en évidence un rôle différentiel de ces interactions de ces deux populations de MSN dans différentes phases des réponses à la cocaïne.

4. Les hétéromères DAR/NMDAR ne sont pas impliqués dans la préférence de place pour la nourriture

Parce que les effets comportementaux que nous avons observé en réponse à la cocaïne pourraient résulter de déficits d'autres fonctions comme l'intégration de récompenses naturelles ou la mémoire spatiale, nous avons regardé si le blocage de ces hétéromères DAR/NMDAR pouvait altérer la CPP

pour une nourriture palatable. Nous n'avons pas observé d'altération de ce comportement, suggérant ainsi un rôle préférentiel des hétéromères D1R/GluN1 et D2R/GluN2B dans les réponses induites par les drogues dans nos conditions. Ces résultats montrent également que le blocage de ces hétéromères n'induit pas de déficit de mémoire associative et d'intégration des récompenses naturelles.

Il existe plusieurs différences au niveau neurobiologique entre les récompenses naturelles et celles associées aux drogues. Par exemple, des stimulations répétées des structure du circuit de la récompense altère le renforcement pour la cocaïne mais pas le sucrose (Levy et al., 2007). Il a été aussi montré que les indices prédisant la disponibilité de nourriture à forte palatabilité, de nicotine ou de morphine induisent une libération de dopamine dans le PFC médial mais seuls la nicotine et la morphine provoquent un relargage de dopamine dans le NAc (Di Chiara, 2005). De manière intéressante, le stress partage des mécanismes communs avec les drogues d'abus mais pas avec les récompenses naturelles, en effet, chez des animaux entraînés à s'auto-administrer de la cocaïne, le stress suffit à induire la rechute après une période d'extinction alors que le stress n'a aucun effet chez des animaux entraînés à avoir de la nourriture (Ahmed and Koob, 1997). De manière similaire, l'auto-administration à la cocaïne ou un stress chronique induisent une LTP dans la VTA mais pas la nourriture (Chen et al., 2008) (Stelly et al., 2016). Des différences sont également observés quand on manipule l'expression des récepteurs dopaminergiques, en effet, les souris invalidés pour le D1R développent une auto-administration normale à la nourriture mais pas à la cocaïne (S. Barak Caine et al., 2007). Des différences sont également retrouvées lorsque l'activité des neurones de régions associées au renforcement sont manipulés, par exemple, dans les tâches d'auto-administration, l'inhibition des D2R-MSNs du NAcc augmente la motivation pour obtenir de la cocaïne mais pas pour la nourriture (Bock et al., 2013) et l'inhibition des D1R-MSN du DMS diminue le comportement de recherche compulsive de cocaïne mais pas de nourriture (Yager et al., 2019).

Pour aller plus loin, les projets en cours au laboratoire visent à étudier le rôle des hétéromères DAR/NMDAR dans les différentes phases de l'auto-administration à la cocaïne et ou du conditionnement opérant à la nourriture. L'implication de ces interactions entre récepteurs sera également testée dans le contexte de stimuli aversif. Par ailleurs, notre étude s'est concentrée sur le striatum mais d'autres régions du système de récompense présentent ces deux sous-types d'hétéromères (données non montrées). Il serait donc pertinent de cibler les hétéromères dans ces régions qui sont impliquées dans des phases discrètes des altérations comportementales induites par les substances addictives.

C. Modulation des hétéromères D2R/GluN2B chez les individus dépendants à la cocaïne.

Les individus souffrant d'une addiction à la cocaïne, lorsqu'ils s'engagent dans un processus d'abstinence, rencontrent fréquemment des épisodes de rechutes. La fréquence des rechutes a des conséquences désastreuses sur la vie de ces individus (Melemis, 2015). C'est pourquoi, la découverte d'une stratégie thérapeutique pouvant diminuer l'incidence des rechutes serait un grand pas dans le traitement de l'addiction à la cocaïne.

Nos résultats montrent un rôle préférentiel des hétéromères D2R/GluN2B dans le maintien des réponses comportementales à la cocaïne sans avoir d'effet dans le cas d'une récompense naturelle. Ceci suggère qu'ils pourraient être une cible thérapeutique à envisager. C'est pourquoi nous sommes intéressés aux niveaux d'hétéromères D2R/GluN2B dans des tissus post-mortem de putamen caudé humains préparés à partir de sujets sains et d'individus avec un historique de dépendance aux psychostimulants. Ces sujets, bien que polyaddicts, ont été sélectionnés car présentaient une dépendance principale à un psychostimulant et avaient des traces de psychostimulants dans le sang au moment du décès. En dépit d'une forte diminution de l'expression du totale du D2R chez les individus dépendants, nous avons montré que la proportion de D2R formant des hétéromères avec GluN2B était trois fois plus importante chez les sujets dépendants en comparaison aux contrôles.

La diminution de l'expression protéique du D2R est en accord avec les études d'imagerie chez l'homme qui montrent une diminution de la biodisponibilité du D2R chez les individus addicts aux psychostimulants (Volkow et al., 1990 ; Volkow et al., 1993; Volkow et al., 1997b; Martinez et al., 2004; Volkow et al., 2009; Trifilieff et al., 2017b). L'augmentation des hétéromères D2R/GluN2B malgré cette baisse de l'expression des D2R suggérerait que les D2R restants forment préférentiellement des hétéromères avec GluN2B. Ceci pourrait être un mécanisme de compensation qui se mettrait en place pour que, malgré la baisse de l'expression des D2R, les D2R-MSN de garder une signalisation D2R fonctionnelle ou alors résulterait d'une augmentation de l'expression de surface des GluN2B-NMDAR (non montré chez l'humain). De manière intéressante, nous avons trouvé une corrélation négative entre l'expression du D2R et les niveaux de D2R/GluN2B. Les patients ayant des expressions du D2R les plus faibles ont des niveaux de D2R/GluN2B les plus élevés. Au vu des liens entre la susceptibilité à l'addiction à la cocaïne et les polymorphismes du gène DRD2 codant pour le D2R (Sullivan et al., 2013; Levrain et al., 2015), nous pouvons nous demander si ces patients avaient des traits alléliques du DRD2 favorisant la formation d'hétéromères D2R/GluN2B. D'autre part, une information qui nous manque dans cette partie de l'étude est l'historique de l'addiction de ces patients, en effet nous ne connaissons pas la durée de l'addiction ni le moment de la dernière prise de drogue de ces individus, la forte variabilité très probable de ce paramètre semble indiquer que l'augmentation des hétéromères D2R/GluN2B est relativement stable. D'autre part, nous n'avons pas un échantillon assez large d'individus pour

réaliser des corrélations entre l'augmentation de ces hétéromères et la nature des substances addictives consommées de manière préférentielle par ces sujets. Néanmoins, les sujets avec les niveaux d'hétéromères les plus bas sont les trois individus qui consommaient régulièrement, soit de la cocaïne et un antidépresseur, soit de la cocaïne et des opioïdes ou encore de la cocaïne avec des cannabinoïdes. En revanche, les individus qui avaient de la cocaïne et de l'éthanol dans le sang montrent tous une augmentation importante des hétéromères. On peut se demander si ceci peut être en lien avec l'exposition à la cocaéthylène, un homologue de la cocaïne qui se forme durant la coadministration de ces deux substances et qui a des effets euphorisants plus élevés que la cocaïne seule (Landry, 1992; Maia et al., 2017). Enfin, le suicide est la cause de décès majoritaire dans notre échantillon et de manière intéressante, les individus morts de suicide ont tendance à avoir des niveaux d'hétéromères D2R/GluN2B plus élevés. Il aurait été intéressant de savoir si certains de ces individus sont morts d'une overdose ou présentaient des comorbidités addiction et dépression. En effet, des données préliminaires du laboratoire suggèrent une augmentation des hétéromères DAR/NMDAR chez les animaux après une défaite sociale chronique. Un projet est actuellement en cours au laboratoire qui vise à étudier le rôle de ces hétéromères à partir de modèles animaux de défaite sociale et dans le contexte d'exposition à un stress chronique et à la cocaïne. Ce projet va également s'intéresser à la modulation de ces hétéromères à partir d'extraits humains de sujets ayant présenté des épisodes dépressifs avec ou sans comorbidité avec une addiction aux psychostimulants.

Par ailleurs, notre étude s'est concentrée dans le noyau accumbens, mais nous pourrions également étudier les niveaux de ces hétéromères dans le putamen et le noyau caudé. En effet, ces régions sont impliquées dans la formation des habitudes et l'initiation des actions et ils seraient impliqués dans le comportement de recherche de drogue chez les patients addicts (Volkow et al., 2006). Il est également important de savoir s'il existe des différences liées au sexe dans la régulation de ces hétéromères.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la nature dynamique et le rôle central que joue les interactions entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les réponses aux drogues. Dans cette étude nous avons également développé des outils pour disséquer le rôle de ces interactions. Ces outils pourront par la suite être utilisés pour préciser les fonctions de ces hétéromères aussi bien dans les conditions physiologiques mais également dans le contexte d'autres pathologies neurologiques et psychiatriques impliquant une perturbation de l'équilibre entre la transmission DA et glutamatergique. Enfin cette étude montre que le ciblage des hétéromères peut être une approche thérapeutique prometteuse car contrairement aux stratégies utilisant des antagonistes des récepteurs individuels qui provoquent souvent des effets secondaires graves, cibler l'interaction entre les récepteurs offre une alternative plus sélective car elle n'affecte pas leurs fonctions individuelles et peut potentiellement limiter l'apparition d'effets secondaires délétères.

VII. Références

A

- Adams, J.U., Careri, J.M., Efferen, T.R., Rotrosen, J., 2001. Differential effects of dopamine antagonists on locomotor activity, conditioned activity and conditioned place preference induced by cocaine in rats. *Behavioural Pharmacology* 12, 603–611.
- Aguinaga, D., Casanovas, M., Rivas-Santisteban, R., Reyes-Resina, I., Navarro, G., Franco, R., 2019. The sigma-1 receptor as key common factor in cocaine and food-seeking behaviors. *Journal of Molecular Endocrinology* 63, R81–R92. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0138>
- Ahmed, S.H., 2012. The science of making drug-addicted animals. *Neuroscience* 211, 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.014>
- Ahmed, S.H., 2011. Escalation of Drug Use, in: Olmstead, M.C. (Ed.), *Animal Models of Drug Addiction, Neuromethods*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 267–292. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-934-5_10
- Ahmed, S.H., 2010. Validation crisis in animal models of drug addiction: beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.005>
- Ahmed, S.H., Koob, G.F., 1998. Transition from Moderate to Excessive Drug Intake: Change in Hedonic Set Point. *Science* 282, 298–300. <https://doi.org/10.1126/science.282.5387.298>
- Ahmed, S.H., Koob, G.F., 1997. Cocaine-but not food-seeking behavior is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology* 132, 289–295. <https://doi.org/10.1007/s002130050347>
- Ahmed, S.H., Walker, J.R., Koob, G.F., 2000. Persistent Increase in the Motivation to Take Heroin in Rats with a History of Drug Escalation. *Neuropsychopharmacology* 22, 413–421. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00133-5)
- Aigner, T.G., Balster, R.L., 1978. Choice behavior in rhesus monkeys: cocaine versus food. *Science* 201, 534–535. <https://doi.org/10.1126/science.96531>
- Allen, R.M., Carelli, R.M., Dykstra, L.A., Suchey, T.L., Everett, C.V., 2005. Effects of the Competitive N-Methyl-d-aspartate Receptor Antagonist, LY235959 [(–)-6-Phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic Acid], on Responding for Cocaine under Both Fixed and Progressive Ratio Schedules of Reinforcement. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 449–457. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.086355>
- Alonso, G., Phan, V.-L., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., Maurice, T., 2000. Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97, 155–170. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00014-2)
- Anderson, S.M., Pierce, R.C., 2005. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacology & Therapeutics* 106, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.12.004>
- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P., Vanhoutte, P., 2019. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology, Receptor Heteromers and their Allosteric Receptor-Receptor Interactions* 152, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.003>
- Ariano, M.A., Wang, J., Noblett, K.L., Larson, E.R., Sibley, D.R., 1997. Cellular distribution of the rat D1B receptor in central nervous system using anti-receptor antisera. *Brain Research* 746, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01219-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01219-X)
- Azdad, K., Gall, D., Woods, A.S., Ledent, C., Ferré, S., Schiffmann, S.N., 2009. Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors Regulate NMDA-Mediated Excitation in

Accumbens Neurons Through A2A–D2 Receptor Heteromerization. *Neuropsychopharmacol* 34, 972–986. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.144>

B

- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X.-C., Toda, S., Kalivas, P.W., 2003. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nature Neuroscience* 6, 743–749. <https://doi.org/10.1038/nn1069>
- Baker, D.A., Shen, H., Kalivas, P.W., 2002. Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids* 23, 161–162. <https://doi.org/10.1007/s00726-001-0122-6>
- Bamford, N.S., Wightman, R.M., Sulzer, D., 2018. Dopamine's Effects on Corticostriatal Synapses during Reward-Based Behaviors. *Neuron* 97, 494–510. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.006>
- Bamford, N.S., Zhang, H., Schmitz, Y., Wu, N.-P., Cepeda, C., Levine, M.S., Schmauss, C., Zakharenko, S.S., Zablow, L., Sulzer, D., 2004. Heterosynaptic Dopamine Neurotransmission Selects Sets of Corticostriatal Terminals. *Neuron* 42, 653–663. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00265-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00265-X)
- Bard, L., Sainlos, M., Bouchet, D., Cousins, S., Mikasova, L., Breillat, C., Stephenson, F.A., Imperiali, B., Choquet, D., Groc, L., 2010. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19561–19566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002690107>
- Bardo, M.T., Bevins, R.A., 2000. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153, 31–43. <https://doi.org/10.1007/s002130000569>
- Barria, A., Derkach, V., Soderling, T., 1997. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32727–32730.
- Bateup, H.S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D.J., Fisone, G., Nestler, E.J., Greengard, P., 2010. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14845–14850. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009874107>
- Bateup, H.S., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., Greengard, P., 2008. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* 11, 932–939. <https://doi.org/10.1038/nn.2153>
- Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2005. An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell* 122, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.012>
- Beaulieu, J.-M., Tirotta, E., Sotnikova, T.D., Masri, B., Salahpour, A., Gainetdinov, R.R., Borrelli, E., Caron, M.G., 2007. Regulation of Akt Signaling by D2 and D3 Dopamine Receptors In Vivo. *J. Neurosci.* 27, 881–885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5074-06.2007>
- Belin, D., Belin-Rauscent, A., Murray, J.E., Everitt, B.J., 2013. Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology* 23, 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.025>
- Belin, D., Mar, A.C., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2008. High Impulsivity Predicts the Switch to Compulsive Cocaine-Taking. *Science* 320, 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1158136>
- Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Rubinstein, M., 2011. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nn.2862>

- Bellone, C., Mameli, M., 2012. mGluR-Dependent Synaptic Plasticity in Drug-Seeking. *Front. Pharmacol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00159>
- Beninger, R.J., Miller, R., 1998. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 335–345. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00019-5](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00019-5)
- Berg, L.K., Larsson, M., Morland, C., Gundersen, V., 2013. Pre- and postsynaptic localization of NMDA receptor subunits at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuroscience* 230, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.061>
- Berridge, K.C., 2007. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191, 391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* 28, 309–369. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00019-8)
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., Aldridge, J.W., 2009. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.014>
- Bertler, A., Rosengren, E., 1959. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 10–11. <https://doi.org/10.1007/bf02157069>
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Herve, D., Valjent, E., 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>
- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pages, C., Heck, N., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2011. Alterations of Molecular and Behavioral Responses to Cocaine by Selective Inhibition of Elk-1 Phosphorylation. *Journal of Neuroscience* 31, 14296–14307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2890-11.2011>
- Beutler, L.R., Wanat, M.J., Quintana, A., Sanz, E., Bamford, N.S., Zweifel, L.S., Palmiter, R.D., 2011. Balanced NMDA receptor activity in dopamine D1 receptor (D1R)- and D2R-expressing medium spiny neurons is required for amphetamine sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4206–4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101424108>
- Bhutani, N., Sureshbabu, R., Farooqui, A.A., Behari, M., Goyal, V., Murthy, A., 2013. Queuing of concurrent movement plans by basal ganglia. *J. Neurosci.* 33, 9985–9997. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4934-12.2013>
- Bisaga, A., Aharonovich, E., Cheng, W.Y., Levin, F.R., Mariani, J.J., Raby, W.N., Nunes, E.V., 2010. A PLACEBO CONTROLLED TRIAL OF MEMANTINE FOR COCAINE DEPENDENCE WITH HIGH-VALUE VOUCHER INCENTIVES DURING A PRE-RANDOMIZATION LEAD-IN PERIOD. *Drug Alcohol Depend* 111, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.04.006>
- Bjursten, L.-M., Norrsell, K., Norrsell, U., 1976. Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy. *Exp Brain Res* 25, 115–130. <https://doi.org/10.1007/BF00234897>
- Blaschko, H., 1959. The development of current concepts of catecholamine formation. *Pharmacol. Rev.* 11, 307–316.
- Bock, R., Shin, J.H., Kaplan, A.R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P.F., Gremel, C.M., Christensen, C.H., Adrover, M.F., Alvarez, V.A., 2013. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nature Neuroscience* 16, 632–638. <https://doi.org/10.1038/nn.3369>
- Boileau, I., Payer, D., Houle, S., Behzadi, A., Rusjan, P.M., Tong, J., Wilkins, D., Selby, P., George, T.P., Zack, M., Furukawa, Y., McCluskey, T., Wilson, A.A., Kish, S.J., 2012.

Higher Binding of the Dopamine D3 Receptor-Preferring Ligand [11C]-(+)-Propyl-Hexahydro-Naphtho-Oxazin in Methamphetamine Polydrug Users: A Positron Emission Tomography Study. *J. Neurosci.* 32, 1353–1359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4371-11.2012>

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P. a. C., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy* 196, 527–542. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>

Borroto-Escuela, D.O., Carlsson, J., Ambrogini, P., Narváez, M., Wydra, K., Tarakanov, A.O., Li, X., Millón, C., Ferraro, L., Cuppini, R., Tanganelli, S., Liu, F., Filip, M., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2017a. Understanding the Role of GPCR Heteroreceptor Complexes in Modulating the Brain Networks in Health and Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00037>

Borroto-Escuela, D.O., Narváez, M., Wydra, K., Pintsuk, J., Pinton, L., Jimenez-Beristain, A., Di Palma, M., Jastrzębska, J., Filip, M., Fuxe, K., 2017b. Cocaine self-administration specifically increases A2AR-D2R and D2R-sigma1R heteroreceptor complexes in the rat nucleus accumbens shell. Relevance for cocaine use disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 155, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.03.003>

Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Li, X., Rodriguez, D., Carlsson, J., Jastrzębska, J., Filip, M., Fuxe, K., 2018. Disruption of A2AR-D2R Heteroreceptor Complexes After A2AR Transmembrane 5 Peptide Administration Enhances Cocaine Self-Administration in Rats. *Molecular Neurobiology* 55, 7038–7048. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0887-1>

Boudreau, A.C., Wolf, M.E., 2005. Behavioral Sensitization to Cocaine Is Associated with Increased AMPA Receptor Surface Expression in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 25, 9144–9151. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2252-05.2005>

Bouthenet, M.-L., Souil, E., Martres, M.-P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.-C., 1991. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Research* 564, 203–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91456-B](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91456-B)

Bozarth, M.A., Wise, R.A., 1985. Toxicity Associated With Long-term Intravenous Heroin and Cocaine Self-administration in the Rat. *JAMA* 254, 81–83. <https://doi.org/10.1001/jama.1985.03360010087032>

Brown, T.E., Lee, B.R., Mu, P., Ferguson, D., Dietz, D., Ohnishi, Y.N., Lin, Y., Suska, A., Ishikawa, M., Huang, Y.H., Shen, H., Kalivas, P.W., Sorg, B.A., Zukin, R.S., Nestler, E.J., Dong, Y., Schluter, O.M., 2011. A Silent Synapse-Based Mechanism for Cocaine-Induced Locomotor Sensitization. *Journal of Neuroscience* 31, 8163–8174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-11.2011>

Brown, T.E., Lee, B.R., Sorg, B.A., 2008. The NMDA antagonist MK-801 disrupts reconsolidation of a cocaine-associated memory for conditioned place preference but not for self-administration in rats. *Learning & Memory* 15, 857–865. <https://doi.org/10.1101/lm.1152808>

Burke, D.A., Rotstein, H.G., Alvarez, V.A., 2017. Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition. *Neuron* 96, 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.019>

C

Cagniard, B., Balsam, P.D., Brunner, D., Zhuang, X., 2006. Mice with chronically elevated dopamine exhibit enhanced motivation, but not learning, for a food reward. *Neuropsychopharmacology* 31, 1362–1370. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300966>

Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014. D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and

- glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19, 1295–1304. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.73>
- Cahill, Emma, Salery, M., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2014. Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Frontiers in Pharmacology* 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00172>
- Caine, S.B., Negus, S.S., Mello, N.K., Patel, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Vallone, D., Saiardi, A., Borrelli, E., 2002. Role of Dopamine D2-like Receptors in Cocaine Self-Administration: Studies with D2 Receptor Mutant Mice and Novel D2 Receptor Antagonists. *J. Neurosci.* 22, 2977–2988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02977.2002>
- Caine, S. B., Thomsen, M., Gabriel, K.I., Berkowitz, J.S., Gold, L.H., Koob, G.F., Tonegawa, S., Zhang, J., Xu, M., 2007. Lack of Self-Administration of Cocaine in Dopamine D1 Receptor Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience* 27, 13140–13150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-07.2007>
- Caine, S. Barak, Thomsen, M., Gabriel, K.I., Berkowitz, J.S., Gold, L.H., Koob, G.F., Tonegawa, S., Zhang, J., Xu, M., 2007. Lack of Self-Administration of Cocaine in Dopamine D1 Receptor Knock-Out Mice. *J Neurosci* 27, 13140–13150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-07.2007>
- Calipari, E.S., Bagot, R.C., Purushothaman, I., Davidson, T.J., Yorgason, J.T., Peña, C.J., Walker, D.M., Pirpinias, S.T., Guise, K.G., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Nestler, E.J., 2016. In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 2726–2731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521238113>
- Cantin, L., Lenoir, M., Augier, E., Vanhille, N., Dubreucq, S., Serre, F., Vouillac, C., Ahmed, S.H., 2010. Cocaine Is Low on the Value Ladder of Rats: Possible Evidence for Resilience to Addiction. *PLOS ONE* 5, e11592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011592>
- Cao, J., Dorris, D.M., Meitzen, J., 2018a. Electrophysiological properties of medium spiny neurons in the nucleus accumbens core of prepubertal male and female *Drd1a*-tdTomato line 6 BAC transgenic mice. *J Neurophysiol* 120, 1712–1727. <https://doi.org/10.1152/jn.00257.2018>
- Cao, J., Willett, J.A., Dorris, D.M., Meitzen, J., 2018b. Sex Differences in Medium Spiny Neuron Excitability and Glutamatergic Synaptic Input: Heterogeneity Across Striatal Regions and Evidence for Estradiol-Dependent Sexual Differentiation. *Front. Endocrinol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00173>
- Carelli, R.M., West, M.O., 1991. Representation of the body by single neurons in the dorsolateral striatum of the awake, unrestrained rat. *Journal of Comparative Neurology* 309, 231–249. <https://doi.org/10.1002/cne.903090205>
- Carey, R.J., Dai, H., Krost, M., Huston, J.P., 1995. The NMDA receptor and cocaine: Evidence that MK-801 can induce behavioral sensitization effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 51, 901–908. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00074-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00074-7)
- Carlsson, A., 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11, 490–493.
- Carlsson, A., Waldeck, B., 1958. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol. Scand.* 44, 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1958.tb01628.x>
- Carmack, S.A., Kim, J.S., Sage, J.R., Thomas, A.W., Skillicorn, K.N., Anagnostaras, S.G., 2013. The competitive NMDA receptor antagonist CPP disrupts cocaine-induced conditioned place preference, but spares behavioral sensitization. *Behavioural Brain Research* 239, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.042>

- Castillo, P.E., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1997. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182–186. <https://doi.org/10.1038/40645>
- Cazorla, M., de Carvalho, F.D., Chohan, M.O., Shegda, M., Chuhma, N., Rayport, S., Ahmari, S.E., Moore, H., Kellendonk, C., 2014. Dopamine D2 Receptors Regulate the Anatomical and Functional Balance of Basal Ganglia Circuitry. *Neuron* 81, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.041>
- Centonze, D., Usiello, A., Gubellini, P., Pisani, A., Borrelli, E., Bernardi, G., Calabresi, P., 2002. Dopamine D2 Receptor-Mediated Inhibition of Dopaminergic Neurons in Mice Lacking D2L Receptors. *Neuropsychopharmacol* 27, 723–726. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00367-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00367-6)
- Cepeda, C., André, V.M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M., Levine, M.S., 2008. Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur J Neurosci* 27, 671–682. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06038.x>
- Cepeda, C., Hurst, R.S., Altemus, K.L., Flores-Hernández, J., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Grandy, D.K., Low, M.J., Rubinstein, M., Ariano, M.A., Levine, M.S., 2001. Facilitated Glutamatergic Transmission in the Striatum of D2 Dopamine Receptor-Deficient Mice. *Journal of Neurophysiology* 85, 659–670. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.659>
- Cepeda, C., Levine, M.S., 2006. Where Do You Think You Are Going? The NMDA-D1 Receptor Trap. *Sci. Signal.* 2006, pe20–pe20. <https://doi.org/10.1126/stke.3332006pe20>
- Chakravarthy, V.S., Moustafa, A.A., 2018. Computational Neuroscience Models of the Basal Ganglia, Cognitive Science and Technology. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8494-2>
- Chandra, R., Lenz, J.D., Gancarz, A.M., Chaudhury, D., Schroeder, G.L., Han, M.-H., Cheer, J.F., Dietz, D.M., Lobo, M.K., 2013. Optogenetic inhibition of D1R containing nucleus accumbens neurons alters cocaine-mediated regulation of Tiam1. *Front. Mol. Neurosci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00013>
- Chandra, R., Lobo, M.K., 2017. Beyond Neuronal Activity Markers: Select Immediate Early Genes in Striatal Neuron Subtypes Functionally Mediate Psychostimulant Addiction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00112>
- Chen, B.T., Bowers, M.S., Martin, M., Hopf, F.W., Guillory, A.M., Carelli, R.M., Chou, J.K., Bonci, A., 2008. Cocaine but Not Natural Reward Self-Administration nor Passive Cocaine Infusion Produces Persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.024>
- Chen, R., Tilley, M.R., Wei, H., Zhou, F., Zhou, F.-M., Ching, S., Quan, N., Stephens, R.L., Hill, E.R., Nottoli, T., Han, D.D., Gu, H.H., 2006. Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9333–9338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600905103>
- Chen, X., Levy, J.M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Nicoll, R.A., Reese, T.S., 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E6983–E6992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112>
- Chergui, K., Charléty, P.J., Akaoka, H., Saunier, C.F., Brunet, J.-L., Buda, M., Svensson, T.H., Chouvet, G., 1993. Tonic Activation of NMDA Receptors Causes Spontaneous Burst Discharge of Rat Midbrain Dopamine Neurons In Vivo. *European Journal of Neuroscience* 5, 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00479.x>
- Chiamulera, C., Epping-Jordan, M.P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F., Conquet, F., 2001. Reinforcing and locomotor stimulant effects of

- cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* 4, 873–874. <https://doi.org/10.1038/nn0901-873>
- Cho, D., Zheng, M., Min, C., Ma, L., Kurose, H., Park, J.H., Kim, K.-M., 2010. Agonist-Induced Endocytosis and Receptor Phosphorylation Mediate Resensitization of Dopamine D2 Receptors. *Mol Endocrinol* 24, 574–586. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0369>
- Ciruela, F., Burgueño, J., Casadó, V., Canals, M., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Bader, M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Woods, A.S., 2004. Combining Mass Spectrometry and Pull-Down Techniques for the Study of Receptor Heteromerization. Direct Epitope–Epitope Electrostatic Interactions between Adenosine A_{2A} and Dopamine D₂ Receptors. *Analytical Chemistry* 76, 5354–5363. <https://doi.org/10.1021/ac049295f>
- Clayton, C.C., Donthamsetti, P., Lambert, N.A., Javitch, J.A., Neve, K.A., 2014. Mutation of Three Residues in the Third Intracellular Loop of the Dopamine D2 Receptor Creates an Internalization-Defective Receptor. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.605378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605378>
- Coblence, F., 2002. Freud et la cocaïne. *Revue française de psychanalyse* Vol. 66, 371–383.
- Cole, S.L., Robinson, M.J.F., Berridge, K.C., 2018. Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *PLOS ONE* 13, e0207694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207694>
- Collins, R.J., Weeks, J.R., Cooper, M.M., Good, P.I., Russell, R.R., 1984. Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 82, 6–13. <https://doi.org/10.1007/bf00426372>
- Conrad, K.L., Ford, K., Marinelli, M., Wolf, M.E., 2010. Dopamine receptor expression and distribution dynamically change in the rat nucleus accumbens after withdrawal from cocaine self-administration. *Neuroscience* 169, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.056>
- Conrad, K.L., Tseng, K.Y., Uejima, J.L., Reimers, J.M., Heng, L.-J., Shaham, Y., Marinelli, M., Wolf, M.E., 2008. Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* 454, 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature06995>
- Corbett, D., Wise, R.A., 1980. Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Res.* 185, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90666-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90666-6)
- Corrigall, W.A., Coen, K.M., 1991. Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 39, 799–802. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90168-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90168-2)
- Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A., Hervé, D., 2001. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76, 1585–1588. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00201.x>
- Cowan, R.L., Wilson, C.J., 1994. Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J. Neurophysiol.* 71, 17–32. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.1.17>
- Cragg, S.J., Greenfield, S.A., 1997. Differential Autoreceptor Control of Somatodendritic and Axon Terminal Dopamine Release in Substantia Nigra, Ventral Tegmental Area, and Striatum. *J. Neurosci.* 17, 5738–5746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05738.1997>

- Creed, M., Ntamati, N.R., Chandra, R., Lobo, M.K., Lüscher, C., 2016. Convergence of Reinforcing and Anhedonic Cocaine Effects in the Ventral Pallidum. *Neuron* 92, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.001>
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>

D

- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. b., Bach, A., Shivers, B. d., Seeburg, P. h., 1989. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *The EMBO Journal* 8, 4025–4034. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08585.x>
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., Mena-Segovia, J., 2014. A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5071-13.2014>
- David, H.N., Ansseau, M., Abaini, J.H., 2005. Dopamine–glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate–putamen and nucleus accumbens of “intact” animals. *Brain Research Reviews* 50, 336–360. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.09.002>
- David Smith, A., Paul Bolam, J., 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends in Neurosciences* 13, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90106-K](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90106-K)
- Deroche, M.A., Lassalle, O., Castell, L., Valjent, E., Manzoni, O.J., 2020. Cell-Type- and Endocannabinoid-Specific Synapse Connectivity in the Adult Nucleus Accumbens Core. *J. Neurosci.* 40, 1028–1041. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1100-19.2019>
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., Piazza, P.V., 2004. Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. *Science* 305, 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1099020>
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Bosler, O., Doucet, G., 1996. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 375, 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Desce, J.M., Godeheu, G., Artaud, F., Cheramy, A., Glowinski, J., 1992. L-Glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: Involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 47, 333–339. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90249-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90249-2)
- Di Chiara, G., 2005. Dopamine in disturbances of food and drug motivated behavior: A case of homology? *Physiology & Behavior* 86, 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.020>
- Di Chiara, G., 1999. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European Journal of Pharmacology* 375, 13–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00372-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00372-6)
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dobbs, L.K., Kaplan, A.R., Lemos, J.C., Matsui, A., Rubinstein, M., Alvarez, V.A., 2016. Dopamine Regulation of Lateral Inhibition between Striatal Neurons Gates the Stimulant Actions of Cocaine. *Neuron* 90, 1100–1113. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.031>

- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J.P., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* 30, 14610–14618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010>
- Donthamsetti, P., Gallo, E.F., Buck, D.C., Stahl, E.L., Zhu, Y., Lane, J.R., Bohn, L.M., Neve, K.A., Kellendonk, C., Javitch, J.A., 2018. Arrestin recruitment to dopamine D2 receptor mediates locomotion but not incentive motivation. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0212-4>
- Dos Santos, M., Salery, M., Forget, B., Garcia Perez, M.A., Betuing, S., Boudier, T., Vanhoutte, P., Caboche, J., Heck, N., 2017. Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biological Psychiatry* 82, 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.014>
- Dumais, A., Lesage, A. d., Alda, M., Rouleau, G., Dumont, M., Chawky, N., Roy, M., Mann, J. j., Benkelfat, C., Turecki, G., 2005. Risk Factors for Suicide Completion in Major Depression: A Case-Control Study of Impulsive and Aggressive Behaviors in Men. *AJP* 162, 2116–2124. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.11.2116>
- Durieux, P.F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., Schiffmann, S.N., d'Exaerde, A. de K., 2009. D 2 R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci* 12, 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.2286>

E

- Edwards, S., Whisler, K.N., Fuller, D.C., Orsulak, P.J., Self, D.W., 2007. Addiction-Related Alterations in D 1 and D 2 Dopamine Receptor Behavioral Responses Following Chronic Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol* 32, 354–366. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301062>
- Ehlers, M., Tingley, W., Huganir, R., 1995. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269, 1734–1737. <https://doi.org/10.1126/science.7569904>
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O., 1960. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239. <https://doi.org/10.1007/bf01485901>
- Elliot, E.E., Sibley, D.R., Katz, J.L., 2003. Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D5 receptor knockout mice. *Psychopharmacology* 169, 161–168. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1494-y>
- Epstein, D.H., Preston, K.L., 2003. The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology* 168, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1470-6>
- Esmenjaud, J.-B., Stroebel, D., Chan, K., Grand, T., David, M., Wollmuth, L.P., Taly, A., Paoletti, P., 2019. An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity. *The EMBO Journal* 38, e99894. <https://doi.org/10.15252/embj.201899894>
- Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., Malinow, R., 2003. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* 6, 136–143. <https://doi.org/10.1038/nn997>
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2013. From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of their roles in drug addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37, 1946–1954. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.010>
- Exley, R., Cragg, S.J., 2008. Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *British Journal of Pharmacology* 153, S283–S297. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707510>

- Fainsinger, R.L., Thai, V., Frank, G., Fergusson, J., 2006. What's in a Word? Addiction Versus Dependence in DSM-V. *AJP* 163, 2014–2014. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.2014a>
- Falck, B., Hillarp, N.A., 1959. On the cellular localization of catechol amines in the brain. *Acta Anat (Basel)* 38, 277–279. <https://doi.org/10.1159/000141530>
- Farrell, M.S., Pei, Y., Wan, Y., Yadav, P.N., Daigle, T.L., Urban, D.J., Lee, H.-M., Sciaky, N., Simmons, A., Nonneman, R.J., Huang, X.-P., Hufeisen, S.J., Guettier, J.-M., Moy, S.S., Wess, J., Caron, M.G., Calakos, N., Roth, B.L., 2013a. A $G\alpha_s$ DREADD Mouse for Selective Modulation of cAMP Production in Striatopallidal Neurons. *Neuropsychopharmacol* 38, 854–862. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.251>
- Farrell, M.S., Pei, Y., Wan, Y., Yadav, P.N., Daigle, T.L., Urban, D.J., Lee, H.-M., Sciaky, N., Simmons, A., Nonneman, R.J., Huang, X.-P., Hufeisen, S.J., Guettier, J.-M., Moy, S.S., Wess, J., Caron, M.G., Calakos, N., Roth, B.L., 2013b. A $G\alpha_s$ DREADD Mouse for Selective Modulation of cAMP Production in Striatopallidal Neurons. *Neuropsychopharmacol* 38, 854–862. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.251>
- Feldmann, G., 2011. Les addictions. Armand Colin.
- Ferguson, S.M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M.J., Phillips, P.E.M., Dong, Y., Roth, B.L., Neumaier, J.F., 2011a. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nature Neuroscience* 14, 22–24. <https://doi.org/10.1038/nn.2703>
- Ferguson, S.M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M.J., Phillips, P.E.M., Dong, Y., Roth, B.L., Neumaier, J.F., 2011b. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat Neurosci* 14, 22–24. <https://doi.org/10.1038/nn.2703>
- Ferguson, S.M., Fasano, S., Yang, P., Brambilla, R., Robinson, T.E., 2006. Knockout of ERK1 Enhances Cocaine-Evoked Immediate Early Gene Expression and Behavioral Plasticity. *Neuropsychopharmacology* 31, 2660–2668. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301014>
- Fernandez, L., Sztulman, H., 1997. Approche du concept d'addiction en psychopathologie. *Annales Médico-psychologiques* 4, 11.
- Ferré, S., Quiroz, C., Orru, M., Guitart, X., Navarro, G., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Lluís, C., Franco, R., 2011. Adenosine A(2A) Receptors and A(2A) Receptor Heteromers as Key Players in Striatal Function. *Front Neuroanat* 5, 36. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00036>
- Fiorentini, C., Busi, C., Spano, P., Missale, C., 2008. Role of receptor heterodimers in the development of l-dopa-induced dyskinesias in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 14, S159–S164. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.022>
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., Missale, C., 2003a. Regulation of Dopamine D₁ Receptor Trafficking and Desensitization by Oligomerization with Glutamate N-Methyl-D-aspartate Receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 20196–20202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213140200>
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Luca, M.D., Missale, C., 2003b. Regulation of Dopamine D₁ Receptor Trafficking and Desensitization by Oligomerization with Glutamate N-Methyl-D-aspartate Receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 20196–20202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213140200>
- Fiorentini, C., Rizzetti, M.C., Busi, C., Bontempi, S., Collo, G., Spano, P., Missale, C., 2006. Loss of Synaptic D₁ Dopamine/N-Methyl-d-aspartate Glutamate Receptor Complexes in l-DOPA-Induced Dyskinesia in the Rat. *Mol Pharmacol* 69, 805–812. <https://doi.org/10.1124/mol.105.016667>

- Fischman, M.W., Johanson, C.-E., 1996. Cocaine, in: Schuster, C.R., Kuhar, M.J. (Eds.), *Pharmacological Aspects of Drug Dependence: Toward an Integrated Neurobehavioral Approach*, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 159–195. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60963-3_4
- Fischman, M.W., Schuster, C.R., 1982. Cocaine self-administration in humans. *Fed. Proc.* 41, 241–246.
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P., Levine, M.S., 2002. Dopamine Enhancement of NMDA Currents in Dissociated Medium-Sized Striatal Neurons: Role of D1 Receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology* 88, 3010–3020. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Bargas, J., 1997. Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25, 185–195. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199702\)25:2<185::AID-SYN9>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199702)25:2<185::AID-SYN9>3.0.CO;2-8)
- Fontana, D., Post, R.M., Weiss, S.R., Pert, A., 1993. The role of D1 and D2 dopamine receptors in the acquisition and expression of cocaine-induced conditioned increases in locomotor behavior. *Behavioural Pharmacology* 4, 375–387. <https://doi.org/10.1097/00008877-199308000-00011>
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A., Curran, T., 1994. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13, 325–338. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90350-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90350-6)
- Franklin, T.R., Acton, P.D., Maldjian, J.A., Gray, J.D., Croft, J.R., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Childress, A.R., 2002. Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of cocaine patients. *Biol. Psychiatry* 51, 134–142. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01269-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01269-0)
- Frederick, A.L., Yano, H., Trifilieff, P., Vishwasrao, H.D., Biezonski, D., Mészáros, J., Urizar, E., Sibley, D.R., Kellendonk, C., Sonntag, K.C., Graham, D.L., Colbran, R.J., Stanwood, G.D., Javitch, J.A., 2015. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Molecular Psychiatry* 20, 1373–1385. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.166>
- Friend, D.M., Kravitz, A.V., 2014. Working together: basal ganglia pathways in action selection. *Trends in Neurosciences* 37, 301–303. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.04.004>
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Palkovits, M., Tarakanov, A.O., Ciruela, F., Agnati, L.F., 2014. Moonlighting Proteins and Protein–Protein Interactions as Neurotherapeutic Targets in the G Protein-Coupled Receptor Field. *Neuropsychopharmacology* 39, 131–155. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.242>
- G**
- Gangarossa, G., Espallergues, J., De Kerchove D'Exaerde, A., El Mestikawy, S., Gerfen, C., Hervé, D., Girault, J.-A., Valjent, E., 2013. Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Front. Neural Circuits* 7, 22. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00022>
- Gardoni, F., Bellone, C., 2015. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00025>
- Garris, P.A., Kilpatrick, M., Bunin, M.A., Michael, D., Walker, Q.D., Wightman, R.M., 1999. Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature* 398, 67–69. <https://doi.org/10.1038/18019>
- Gaspar, P., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A., Henry, J.P., 1985. Catecholaminergic innervation of the septal area in man: Immunocytochemical study using TH and DBH

- antibodies. *Journal of Comparative Neurology* 241, 12–33. <https://doi.org/10.1002/cne.902410103>
- Gawin, F.H., 1991. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 251, 1580–1586. <https://doi.org/10.1126/science.2011738>
- Gawin, F.H., Ellinwood, E.H., 1988. Cocaine and other stimulants. Actions, abuse, and treatment. *N. Engl. J. Med.* 318, 1173–1182. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805053181806>
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432. <https://doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annual Review of Neuroscience* 34, 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Gertler, T.S., Chan, C.S., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous Anatomical Properties of Adult Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci* 28, 10814–10824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2660-08.2008>
- Giros, B., el Mestikawy, S., Bertrand, L., Caron, M.G., 1991. Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett.* 295, 149–154. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81406-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81406-x)
- Goldman-Rakic, P.S., Selemon, L.D., 1986. Topography of Corticostriatal Projections in Nonhuman Primates and Implications for Functional Parcellation of the Neostriatum, in: Jones, E.G., Peters, A. (Eds.), *Sensory-Motor Areas and Aspects of Cortical Connectivity, Cerebral Cortex*. Springer US, Boston, MA, pp. 447–466. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2149-1_12
- Goldstein, R.A., DesLauriers, C., Burda, A.M., 2009. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Disease-a-Month, Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity--A Review* 55, 6–38. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.10.002>
- Goldstein, R.Z., Volkow, N.D., 2011. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 652–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3119>
- Goodall, M., 1951. Studies of adrenaline and noradrenaline in mammalian heart and suprarenals. *Acta Physiol Scand Suppl* 24, 7–51.
- Goto, Y., Otani, S., Grace, A.A., 2007. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53, 583–587. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.007>
- Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, È.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., Hanoun, N., Saurini, F., Kemel, M.-L., Gasnier, B., Giros, B., Mestikawy, S.E., 2008. The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nature Neuroscience* 11, 292–300. <https://doi.org/10.1038/nn2052>
- Graybiel, A.M., Grafton, S.T., 2015. The Striatum: Where Skills and Habits Meet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021691. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021691>
- Gregus, A.M., Tropea, T.F., Wang, Y., Hauck, S.C.R., Costa, A.C.S., Rajadhyaksha, A.M., Inturrisi, C.E., 2010. Deletion of the GluR5 subunit of kainate receptors affects cocaine sensitivity and preference. *Neurosci Lett* 468, 186. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.071>
- Grillner, S., Robertson, B., 2016. The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Current Biology* 26, R1088–R1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.041>
- Grillner, S., Robertson, B., 2015. The basal ganglia downstream control of brainstem motor centres—an evolutionarily conserved strategy. *Current Opinion in Neurobiology* 33, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.019>

- Groc, L., Gustafsson, B., Hanse, E., 2006. AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends in Neurosciences* 29, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.01.005>
- Grueter, B.A., Robison, A.J., Neve, R.L., Nestler, E.J., Malenka, R.C., 2013. Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1923–1928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221742110>
- Gu, S.M., Cha, H.J., Seo, S.W., Hong, J.T., Yun, J., 2020. Dopamine D1 receptor antagonist reduces stimulant-induced conditioned place preferences and dopamine receptor supersensitivity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 131–138. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01694-3>
- Guan, X., Hu, J., Li, S., 2008. Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase in acute cocaine-induced c-fos in nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 438, 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.035>
- Guez-Barber, D., Fanous, S., Golden, S.A., Schrama, R., Koya, E., Stern, A.L., Bossert, J.M., Harvey, B.K., Picciotto, M.R., Hope, B.T., 2011. FACS Identifies Unique Cocaine-Induced Gene Regulation in Selectively Activated Adult Striatal Neurons. *J. Neurosci.* 31, 4251–4259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6195-10.2011>

H

- Haddad, L.M., 1979. 1978: Cocaine in perspective. *JACEP* 8, 374–376. [https://doi.org/10.1016/s0361-1124\(79\)80263-4](https://doi.org/10.1016/s0361-1124(79)80263-4)
- Hayashi, T., Su, T.-P., 2001. Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *PNAS* 98, 491–496. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.491>
- Heidbreder, C.A., Newman, A.H., 2010. Current perspectives on selective dopamine D3 receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1187, 4–34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05149.x>
- Heien, M.L.A.V., Khan, A.S., Ariansen, J.L., Cheer, J.F., Phillips, P.E.M., Wassum, K.M., Wightman, R.M., 2005. Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *PNAS* 102, 10023–10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504657102>
- Hernández-López, S., Vargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., Galarraga, E., 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *Journal of Neuroscience* 17, 3334–3342.
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Vargas, J., Hamm, H., Surmeier, D.J., 2000. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel $\text{PLC}\beta 1$ –IP3–calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience* 20, 8987–8995.
- Hervé, D., Le Moine, C., Corvol, J.C., Belluscio, L., Ledent, C., Fienberg, A.A., Jaber, M., Studler, J.M., Girault, J.A., 2001. $\text{G}\alpha(\text{olf})$ levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J. Neurosci.* 21, 4390–4399.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., El Mestikawy, S., 2004. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123, 983–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.039>
- Heusner, C.L., Palmiter, R.D., 2005. Expression of Mutant NMDA Receptors in Dopamine D1 Receptor-Containing Cells Prevents Cocaine Sensitization and Decreases Cocaine Preference. *J. Neurosci.* 25, 6651–6657. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1474-05.2005>
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., Nakanishi, S., 2010. Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron* 66, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.011>

- Hintiryan, H., Foster, N.N., Bowman, I., Bay, M., Song, M.Y., Gou, L., Yamashita, S., Bienkowski, M.S., Zingg, B., Zhu, M., Yang, X.W., Shih, J.C., Toga, A.W., Dong, H.-W., 2016. The mouse cortico-striatal projectome. *Nature Neuroscience* 19, 1100–1114. <https://doi.org/10.1038/nn.4332>
- Hodos, W., 1961. Progressive Ratio as a Measure of Reward Strength. *Science* 134, 943–944. <https://doi.org/10.1126/science.134.3483.943>
- Hope, B.T., Nye, H.E., Kelz, M.B., Self, D.W., Iadarola, M.J., Nakabeppu, Y., Duman, R.S., Nestler, E.J., 1994. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13, 1235–1244. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90061-2)
- Horvitz, J.C., 2000. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96, 651–656. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00019-1)
- Hotsenpiller, G., Giorgetti, M., Wolf, M.E., 2001. Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1843–1855. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01804.x>
- Hou, L., Klann, E., 2004. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* 24, 6352–6361. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0995-04.2004>
- Huang, Q., Zhou, D., Chase, K., Gusella, J.F., Aronin, N., DiFiglia, M., 1992. Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *PNAS* 89, 11988–11992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11988>
- Huang, Y.H., Lin, Y., Mu, P., Lee, B.R., Brown, T.E., Wayman, G., Marie, H., Liu, W., Yan, Z., Sorg, B.A., Schlüter, O.M., Zukin, R.S., Dong, Y., 2009. In Vivo Cocaine Experience Generates Silent Synapses. *Neuron* 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.007>
- Hunnicutt, B.J., Jongbloets, B.C., Birdsong, W.T., Gertz, K.J., Zhong, H., Mao, T., 2016. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *eLife* 5, e19103. <https://doi.org/10.7554/eLife.19103>
- Hunnicutt, B.J., Long, B.R., Kusefoglou, D., Gertz, K.J., Zhong, H., Mao, T., 2014. A comprehensive thalamocortical projection map at the mesoscopic level. *Nature Neuroscience* 17, 1276–1285. <https://doi.org/10.1038/nn.3780>
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2006. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience* 29, 565–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Hyytiä, P., Bäckström, P., Liljequist, S., 1999. Site-specific NMDA receptor antagonists produce differential effects on cocaine self-administration in rats. *European Journal of Pharmacology* 378, 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00446-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00446-X)
- /
- Ilango, A., Kesner, A.J., Keller, K.L., Stuber, G.D., Bonci, A., Ikemoto, S., 2014. Similar Roles of Substantia Nigra and Ventral Tegmental Dopamine Neurons in Reward and Aversion. *J. Neurosci.* 34, 817–822. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1703-13.2014>
- Imperato, A., Mele, A., Scrocco, M.G., Puglisi-Allegra, S., 1992. Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. *Neurochemical basis for addiction. European Journal of Pharmacology* 212, 299–300. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90349-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90349-9)

- Isomura, Y., Takekawa, T., Harukuni, R., Handa, T., Aizawa, H., Takada, M., Fukai, T., 2013. Reward-Modulated Motor Information in Identified Striatum Neurons. *J. Neurosci.* 33, 10209–10220. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0381-13.2013>
- Ito, R., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2004. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci* 7, 389–397. <https://doi.org/10.1038/nn1217>

J

- Jin, D.-Z., Xue, B., Mao, L.-M., Wang, J.Q., 2015. Metabotropic glutamate receptor 5 upregulates surface NMDA receptor expression in striatal neurons via CaMKII. *Brain Research* 1624, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.053>
- Jin, X., Tecuapetla, F., Costa, R.M., 2014. Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat Neurosci* 17, 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.3632>
- Joffe, M.E., Turner, B.D., Delpire, E., Grueter, B.A., 2018. Genetic loss of GluN2B in D1-expressing cell types enhances long-term cocaine reward and potentiation of thalamo-accumbens synapses. *Neuropsychopharmacol* 43, 2383–2389. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0131-8>
- Joffe, M.E., Vitter, S.R., Grueter, B.A., 2017. GluN1 deletions in D1- and A2A-expressing cell types reveal distinct modes of behavioral regulation. *Neuropharmacology* 112, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.026>
- Jones, E.G., Coulter, J.D., Burton, H., Porter, R., 1977. Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *Journal of Comparative Neurology* 173, 53–80. <https://doi.org/10.1002/cne.901730105>

K

- Kaddis, F.G., Uretsky, N.J., Wallace, L.J., 1995. DNQX in the nucleus accumbens inhibits cocaine-induced conditioned place preference. *Brain Research* 697, 76–82. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00786-P](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00786-P)
- Kalivas, P., 2004. Glutamate systems in cocaine addiction. *Current Opinion in Pharmacology* 4, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2003.11.002>
- Kalivas, P., Duffy, P., 1993. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. *J. Neurosci.* 13, 276–284. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00276.1993>
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 10, 561–572. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Karasinska, J.M., George, S.R., Cheng, R., O'Dowd, B.F., 2005. Deletion of dopamine D1 and D3 receptors differentially affects spontaneous behaviour and cocaine-induced locomotor activity, reward and CREB phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1741–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04353.x>
- Karch, S.B., 2005. *A Brief History of Cocaine*, Second Edition, 2nd ed. CRC Press.
- Karler, R., Calder, L.I., Chaudhry, I.A., Turkanis, S.A., 1989. Blockade of “reverse tolerance” to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sciences* 45, 599–606. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90045-3)
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences* 18, 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C., 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10, 3421–3438.
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., Hisano, S., 2006. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons

- express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 498, 581–592. <https://doi.org/10.1002/cne.21054>
- Kebabian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96. <https://doi.org/10.1038/277093a0>
- Keiflin, R., Janak, P.H., 2015. Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron* 88, 247–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.037>
- Kelz, M.B., Chen, J., Carlezon, W.A., Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A.M., Steffen, C., Zhang, Y.-J., Marotti, L., Self, D.W., Tkatch, T., Baranaukas, G., Surmeier, D.J., Neve, R.L., Duman, R.S., Picciotto, M.R., Nestler, E.J., 1999. Expression of the transcription factor Δ FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401, 272–276. <https://doi.org/10.1038/45790>
- Khan, Z.U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A., de la Calle, A., 2000. Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100, 689–699. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00274-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00274-8)
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., Calle, A. de la, Goldman-Rakic, P.S., 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *PNAS* 95, 7731–7736. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7731>
- Kharkwal, G., Radl, D., Lewis, R., Borrelli, E., 2016. Dopamine D2 receptors in striatal output neurons enable the psychomotor effects of cocaine. *PNAS* 113, 11609–11614. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608362113>
- Kim, H.-S., Park, W.-K., Jang, C.-G., Oh, S., 1996. Inhibition by MK-801 of cocaine-induced sensitization, conditioned place preference, and dopamine-receptor supersensitivity in mice. *Brain Research Bulletin* 40, 201–207. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(96\)00006-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(96)00006-8)
- Kim, J., Park, B.-H., Lee, J.H., Park, S.K., Kim, J.-H., 2011. Cell Type-Specific Alterations in the Nucleus Accumbens by Repeated Exposures to Cocaine. *Biological Psychiatry, Nucleus Accumbens Neuroadaptations and Relapse in Addiction* 69, 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.013>
- Kincaid, A.E., Zheng, T., Wilson, C.J., 1998. Connectivity and Convergence of Single Corticostriatal Axons. *J. Neurosci.* 18, 4722–4731. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04722.1998>
- Klein, M., Pieri, I., Uhlmann, F., Pfizenmaier, K., Eisel, U., 1998. Cloning and characterization of promoter and 5'-UTR of the NMDA receptor subunit ϵ 2: evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene* 208, 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00005-5)
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1993. Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron* 10, 491–500. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90336-P)
- Kong, H., Kuang, W., Li, S., Xu, M., 2011. Activation of dopamine D3 receptors inhibits reward-related learning induced by cocaine. *Neuroscience* 176, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.008>
- Koob, G.F., Le, H.T., Creese, I., 1987. The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. *Neuroscience Letters* 79, 315–320. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90451-4)
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2006. *Neurobiology of addiction*. Elsevier [u.a.], Amsterdam.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry* 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Koob, G.F., Weiss, F., Deroche, V., Weissenborn, R., 1996. Effects of dopamine agonists and antagonists on cocaine-induced operant responding for a cocaine-associated stimulus. *Psychopharmacology* 126, 311–322. <https://doi.org/10.1007/BF02247382>

- Kopp, P., 2015. Le coût social des drogues en France 75.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737–1740. <https://doi.org/10.1126/science.7569905>
- Kotecha, S.A., Oak, J.N., Jackson, M.F., Perez, Y., Orser, B.A., Van Tol, H.H.M., MacDonald, J.F., 2002. A D2 Class Dopamine Receptor Transactivates a Receptor Tyrosine Kinase to Inhibit NMDA Receptor Transmission. *Neuron* 35, 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00859-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00859-0)
- Kourrich, S., Rothwell, P.E., Klug, J.R., Thomas, M.J., 2007. Cocaine Experience Controls Bidirectional Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience* 27, 7921–7928. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007>
- Kourrich, S., Su, T.-P., Fujimoto, M., Bonci, A., 2012. The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends in Neurosciences* 35, 762–771. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.007>
- Kozell, L., Meshul, C., 2003. Alterations in nerve terminal glutamate immunoreactivity in the nucleus accumbens and ventral tegmental area following single and repeated doses of cocaine. *Psychopharmacology* 165, 337–345. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1296-7>
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R.L., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kravitz, A.V., Tye, L.D., Kreitzer, A.C., 2012. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience* 15, 816–818. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Krebs, M.O., Desce, J.M., Kemel, M.L., Gauchy, C., Godeheu, G., Cheramy, A., Glowinski, J., 1991. Glutamatergic Control of Dopamine Release in the Rat Striatum: Evidence for Presynaptic N-Methyl-D-Aspartate Receptors on Dopaminergic Nerve Terminals. *Journal of Neurochemistry* 56, 81–85. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02565.x>
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643–647. <https://doi.org/10.1038/nature05506>
- Kulagina, N.V., Zigmond, M.J., Michael, A.C., 2001. Glutamate regulates the spontaneous and evoked release of dopamine in the rat striatum. *Neuroscience* 102, 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00480-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00480-2)
- Kupchik, Y.M., Brown, R.M., Heinsbroek, J.A., Lobo, M.K., Schwartz, D.J., Kalivas, P.W., 2015. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nature Neuroscience* 18, 1230–1232. <https://doi.org/10.1038/nn.4068>
- Kuribara, H., 1995. Dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 retards methamphetamine sensitization in both combined administration and early posttreatment schedules in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 52, 759–763. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00173-T](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00173-T)
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H., Mishina, M., 1996. Impairment of Suckling Response, Trigeminal Neuronal Pattern Formation, and Hippocampal LTD in NMDA Receptor $\epsilon 2$ Subunit Mutant Mice. *Neuron* 16, 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80051-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80051-3)

- Ladepeche, L., Yang, L., Bouchet, D., Groc, L., 2013. Regulation of Dopamine D1 Receptor Dynamics within the Postsynaptic Density of Hippocampal Glutamate Synapses. *PLOS ONE* 8, e74512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074512>
- Landry, M.J., 1992. An overview of cocaethylene, an alcohol-derived, psychoactive, cocaine metabolite. *J Psychoactive Drugs* 24, 273–276. <https://doi.org/10.1080/02791072.1992.10471648>
- Laruelle, M., 2014. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current Opinion in Pharmacology, Neurosciences* 14, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.01.001>
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 413–426. <https://doi.org/10.1038/nrn2153>
- Le Moine, C., Tison, F., Bloch, B., 1990. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience Letters* 117, 248–252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90671-U](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90671-U)
- Lee, D.K., Bian, S., Rahman, Md.A., Shim, Y.-B., Shim, I., Choe, E.S., 2008. Repeated cocaine administration increases N-methyl-d-aspartate NR1 subunit, extracellular signal-regulated kinase and cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and glutamate release in the rat dorsal striatum. *European Journal of Pharmacology* 590, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.048>
- Lee, F.J.S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X., Liu, F., 2002. Dual Regulation of NMDA Receptor Functions by Direct Protein-Protein Interactions with the Dopamine D1 Receptor. *Cell* 111, 219–230. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00962-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00962-5)
- Leshner, A.I., 1997. Addiction Is a Brain Disease, and It Matters. *Science* 278, 45–47. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.45>
- Lever, J.R., Miller, D.K., Green, C.L., Ferguson-cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Fan, K., Lever, S.Z., 2014. A selective sigma-2 receptor ligand antagonizes cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Synapse* 68, 73–84. <https://doi.org/10.1002/syn.21717>
- Lévesque, M., Bédard, A., Cossette, M., Parent, A., 2003. Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *Journal of Chemical Neuroanatomy, Special Issue on the Human Brain - The Structural Basis for understanding Human Brain function and dysfunction* 26, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.07.001>
- Levrán, O., Randesi, M., Rosa, J.C. da, Ott, J., Rotrosen, J., Adelson, M., Kreek, M.J., 2015. Overlapping Dopaminergic Pathway Genetic Susceptibility to Heroin and Cocaine Addictions in African Americans. *Annals of Human Genetics* 79, 188–198. <https://doi.org/10.1111/ahg.12104>
- Levy, D., Shabat-Simon, M., Shalev, U., Barnea-Ygael, N., Cooper, A., Zangen, A., 2007. Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not “natural” reinforcement. *J. Neurosci.* 27, 14179–14189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4477-07.2007>
- Lewis, R.G., Serra, M., Radl, D., Gori, M., Tran, C., Michalak, S.E., Vanderwal, C.D., Borrelli, E., 2020. Dopaminergic Control of Striatal Cholinergic Interneurons Underlies Cocaine-Induced Psychostimulation. *Cell Reports* 31, 107527. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107527>
- Li, Y.-C., Xi, D., Roman, J., Huang, Y.-Q., Gao, W.-J., 2009. Activation of Glycogen Synthase Kinase-3 β Is Required for Hyperdopamine and D2 Receptor-Mediated Inhibition of Synaptic NMDA Receptor Function in the Rat Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 29, 15551–15563. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3336-09.2009>

- Li, Z., Chen, Z., Fan, G., Li, A., Yuan, J., Xu, T., 2018. Cell-Type-Specific Afferent Innervation of the Nucleus Accumbens Core and Shell. *Front Neuroanat* 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00084>
- Liao, G.-Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H., Leonard, J.P., 2001. Evidence for Direct Protein Kinase-C Mediated Modulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Current. *Mol Pharmacol* 59, 960–964. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.960>
- Liao, R.M., Chang, Y.H., Wang, S.H., 1998. Influence of SCH23390 and spiperone on the expression of conditioned place preference induced by d-amphetamine or cocaine in the rat. *Chin J Physiol* 41, 85–92.
- Lieberman, D.N., Mody, I., 1994. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca²⁺-dependent phosphatase. *Nature* 369, 235–239.
- Liu, X.-Y., Chu, X.-P., Mao, L.-M., Wang, M., Lan, H.-X., Li, M.-H., Zhang, G.-C., Parekar, N.K., Fibuch, E.E., Haines, M., Neve, K.A., Liu, F., Xiong, Z.-G., Wang, J.Q., 2006. Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron* 52, 897–909. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.011>
- Liu, Z., Wu, N., Hu, R., Cheng, J., Li, L., Fan, Q., Zhuo, M., Gan, J., Song, L., Zhazhao, Z., 2016. Targeting the D1-N-methyl-D-aspartate receptor complex reduces L-dopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats. *DDDT* 547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93487>
- Lobo, M.K., Covington, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D.M., Zaman, S., Koo, J.W., Kennedy, P.J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R.L., Deisseroth, K., Han, M.-H., Nestler, E.J., 2010a. Cell Type-Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330, 385–390. <https://doi.org/10.1126/science.1188472>
- Lobo, M.K., Covington, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D.M., Zaman, S., Koo, J.W., Kennedy, P.J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R.L., Deisseroth, K., Han, M.-H., Nestler, E.J., 2010b. Cell Type-Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330, 385–390. <https://doi.org/10.1126/science.1188472>
- Lobo, M.K., Nestler, E.J., 2011. The Striatal Balancing Act in Drug Addiction: Distinct Roles of Direct and Indirect Pathway Medium Spiny Neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 5. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00041>
- Lobo, M.K., Zaman, S., Damez-Werno, D.M., Koo, J.W., Bagot, R.C., DiNieri, J.A., Nugent, A., Finkel, E., Chaudhury, D., Chandra, R., Riberio, E., Rabkin, J., Mouzon, E., Cachope, R., Cheer, J.F., Han, M.-H., Dietz, D.M., Self, D.W., Hurd, Y.L., Vialou, V., Nestler, E.J., 2013a. Δ FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *J. Neurosci.* 33, 18381–18395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>
- Lobo, M.K., Zaman, S., Damez-Werno, D.M., Koo, J.W., Bagot, R.C., DiNieri, J.A., Nugent, A., Finkel, E., Chaudhury, D., Chandra, R., Riberio, E., Rabkin, J., Mouzon, E., Cachope, R., Cheer, J.F., Han, M.-H., Dietz, D.M., Self, D.W., Hurd, Y.L., Vialou, V., Nestler, E.J., 2013b. Δ FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *J. Neurosci.* 33, 18381–18395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>
- Luo, Z., Volkow, N.D., Heintz, N., Pan, Y., Du, C., 2011. Acute Cocaine Induces Fast Activation of D1 Receptor and Progressive Deactivation of D2 Receptor Striatal Neurons: In Vivo Optical Microprobe [Ca²⁺]_i Imaging. *J Neurosci* 31, 13180–13190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2369-11.2011>
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2011. Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron* 69, 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.017>

- Ma, L., Chen, W., Yu, D., Han, Y., 2020. Brain-Wide Mapping of Afferent Inputs to Accumbens Nucleus Core Subdomains and Accumbens Nucleus Subnuclei. *Front. Syst. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.00015>
- MacAskill, A.F., Cassel, J.M., Carter, A.G., 2014. Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience* 17, 1198–1207. <https://doi.org/10.1038/nn.3783>
- Mai, J.K., Paxinos, G., Voss, T., 2008. *Atlas of the human brain*, 3. ed. ed. Elsevier, Acad. Press, Amsterdam.
- Maia, A.F. da S., Martins, F.T., Silva Neto, L. da, Alves, R.B., De Fátima, Â., 2017. Cocaethylene, the in vivo product of cocaine and ethanol, is a narcotic more potent than its precursors. *Acta Crystallogr C Struct Chem* 73, 780–783. <https://doi.org/10.1107/S2053229617012852>
- Makris, N., Gasic, G.P., Seidman, L.J., Goldstein, J.M., Gastfriend, D.R., Elman, I., Albaugh, M.D., Hodge, S.M., Ziegler, D.A., Sheahan, F.S., Caviness, V.S., Tsuang, M.T., Kennedy, D.N., Hyman, S.E., Rosen, B.R., Breiter, H.C., 2004. Decreased absolute amygdala volume in cocaine addicts. *Neuron* 44, 729–740. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.027>
- Mansouri-Guilani, N., Bernard, V., Vigneault, E., Vialou, V., Daumas, S., Mestikawy, S.E., Gangarossa, G., 2019. VGLUT3 gates psychomotor effects induced by amphetamine. *Journal of Neurochemistry* 148, 779–795. <https://doi.org/10.1111/jnc.14644>
- Manvich, D.F., Petko, A.K., Branco, R.C., Foster, S.L., Porter-Stransky, K.A., Stout, K.A., Newman, A.H., Miller, G.W., Paladini, C.A., Weinshenker, D., 2019. Selective D 2 and D 3 receptor antagonists oppositely modulate cocaine responses in mice via distinct postsynaptic mechanisms in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacol.* 44, 1445–1455. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0371-2>
- Mao, L., Wang, J.Q., 2000. Distinct inhibition of acute cocaine-stimulated motor activity following microinjection of a group III metabotropic glutamate receptor agonist into the dorsal striatum of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67, 93–101. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00307-5](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00307-5)
- Martinez, D., Broft, A., Foltin, R.W., Slifstein, M., Hwang, D.-R., Huang, Y., Perez, A., Frankel, W.G., Cooper, T., Kleber, H.D., Fischman, M.W., Laruelle, M., 2004. Cocaine Dependence and D 2 Receptor Availability in the Functional Subdivisions of the Striatum: Relationship with Cocaine-Seeking Behavior. *Neuropsychopharmacol* 29, 1190–1202. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300420>
- Matamalas, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J.-M., Valjent, E., Hervé, D., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004770>
- Matsumoto, R.R., McCracken, K.A., Pouw, B., Zhang, Y., Bowen, W.D., 2002. Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* 42, 1043–1055. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00056-4)
- McBride, W.J., Murphy, J.M., Ikemoto, S., 1999. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav. Brain Res.* 101, 129–152. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(99\)00022-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00022-4)
- McFarland, K., Lapish, C.C., Kalivas, P.W., 2003. Prefrontal Glutamate Release into the Core of the Nucleus Accumbens Mediates Cocaine-Induced Reinstatement of Drug-Seeking Behavior. *The Journal of Neuroscience* 23, 3531–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03531.2003>

- McGeorge, A.J., Faull, R.L.M., 1989. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503–537. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90128-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90128-0)
- Melemis, S.M., 2015. Relapse Prevention and the Five Rules of Recovery. *Yale J Biol Med* 88, 325–332.
- Mena-Segovia, J., Bolam, J.P., 2017. Rethinking the Pedunculopontine Nucleus: From Cellular Organization to Function. *Neuron* 94, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.027>
- Michino, M., Donthamsetti, P., Beuming, T., Banala, A., Duan, L., Roux, T., Han, Y., Trinquet, E., Newman, A.H., Javitch, J.A., Shi, L., 2013. A Single Glycine in Extracellular Loop 1 Is the Critical Determinant for Pharmacological Specificity of Dopamine D2 and D3 Receptors. *Mol Pharmacol* 84, 854–864. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087833>
- Middleton, F.A., Strick, P.L., 1996. The temporal lobe is a target of output from the basal ganglia. *PNAS* 93, 8683–8687. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8683>
- Miller, C.A., Marshall, J.F., 2005. Molecular Substrates for Retrieval and Reconsolidation of Cocaine-Associated Contextual Memory. *Neuron* 47, 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.006>
- Miller, N.S., Summers, G.L., Gold, M.S., 1993. Cocaine dependence: alcohol and other drug dependence and withdrawal characteristics. *J Addict Dis* 12, 25–35. https://doi.org/10.1300/J069v12n01_03
- Miner, L.L., Drago, J., Chamberlain, P.M., Donovan, D., Uhl, G.R., 1995. Retained cocaine conditioned place preference in D1 receptor deficient mice. *NeuroReport* 6, 2314–2316.
- Mink, J.W., 2018. Basal ganglia mechanisms in action selection, plasticity, and dystonia. *European Journal of Paediatric Neurology, Movement Disorders* 22, 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.005>
- Mink, J.W., 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00042-1)
- Mirenowicz, J., Schultz, W., 1996. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379, 449–451. <https://doi.org/10.1038/379449a0>
- Mitchell, J.A., Channell, S., Hall, G., 1985. Response–reinforcer associations after caudate-putamen lesions in the rat: Spatial discrimination and overshadowing–potentiation effects in instrumental learning. *Behavioral neuroscience* 99, 1074.
- Mitchell, J.A., Hall, G., 1988. Learning in rats with caudate-putamen lesions: unimpaired classical conditioning and beneficial effects of redundant stimulus cues on instrumental and spatial learning deficits. *Behavioral neuroscience* 102, 504.
- Moan, C., Heath, R., 1972. SEPTAL STIMULATION FOR THE INITIATION OF HETEROSEXUAL BEHAVIOR IN A HOMOSEXUAL MALE. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry* 3, 31.
- Montagu, K.A., 1957. Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals. *Nature* 180, 244–245. <https://doi.org/10.1038/180244a0>
- Morales, M., Margolis, E.B., 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18, 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., Bergman, H., 2004. Coincident but Distinct Messages of Midbrain Dopamine and Striatal Tonically Active Neurons. *Neuron* 43, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.012>

- Moss, J., Bolam, J.P., 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28, 11221–11230. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2780-08.2008>
- Moyer, R.A., Wang, D., Papp, A.C., Smith, R.M., Duque, L., Mash, D.C., Sadee, W., 2011. Intronic Polymorphisms Affecting Alternative Splicing of Human Dopamine D2 Receptor Are Associated with Cocaine Abuse. *Neuropsychopharmacol* 36, 753–762. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.208>

N

- Nai, Q., Li, S., Wang, S.-H., Liu, J., Lee, F.J.S., Frankland, P.W., Liu, F., 2010. Uncoupling the D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Complex Promotes NMDA-Dependent Long-Term Potentiation and Working Memory. *Biological Psychiatry* 67, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.011>
- Nambu, A., Tokuno, H., Takada, M., 2002. Functional significance of the cortico–subthalamo–pallidal ‘hyperdirect’ pathway. *Neuroscience Research* 43, 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00027-5)
- Natsubori, A., Tsutsui-Kimura, I., Nishida, H., Bouchekioua, Y., Sekiya, H., Uchigashima, M., Watanabe, M., d’Exaerde, A. de K., Mimura, M., Takata, N., Tanaka, K.F., 2017. Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. *J. Neurosci.* 37, 2723–2733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017>
- Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., Fuxe, K., Lluís, C., Ferré, S., Franco, R., 2010. Direct involvement of σ -1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *PNAS* 107, 18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008911107>
- Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., Ferre, S., Franco, R., Canela, E., McCormick, P.J., 2013. Cocaine Inhibits Dopamine D2 Receptor Signaling via Sigma-1-D2 Receptor Heteromers. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061245>
- Neve, K.A., Robinson, B.G., Condon, A.F., Yorgason, J.T., McLain, D.E., Asad, N., Dore, T.M., Borrelli, E., Williams, J.T., 2019. Autoreceptor Function of the Dopamine D2 Receptor Splice Variants D2S and D2L. *The FASEB Journal* 33, 502.2-502.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.502.2
- Nicola, S.M., Surmeier, D.J., Malenka, R.C., 2000. Dopaminergic Modulation of Neuronal Excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Annual Review of Neuroscience* 23, 185–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.185>
- NIDA, 2009. Principles of Effective Treatment [WWW Document]. URL <https://www.drugabuse.gov/publications/principles-drug-addiction-treatment-research-based-guide-third-edition/principles-effective-treatment> (accessed 4.4.20).
- Niemann, A., 1860. Ueber eine neue organische Base in den Cocablättern. *Archiv der Pharmazie* 153, 129–155. <https://doi.org/10.1002/ardp.18601530202>
- Nirenberg, M.J., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., Pickel, V.M., 1996. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 16, 436–447.
- Nisenbaum, E.S., Mermelstein, P.G., Wilson, C.J., Surmeier, D.J., 1998. Selective blockade of a slowly inactivating potassium current in striatal neurons by (+/-) 6-chloro-APB hydrobromide (SKF82958). *Synapse* 29, 213–224. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199807\)29:3<213::AID-SYN3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199807)29:3<213::AID-SYN3>3.0.CO;2-9)
- Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>

Nonomura, S., Nishizawa, K., Sakai, Y., Kawaguchi, Y., Kato, S., Uchigashima, M., Watanabe, M., Yamanaka, K., Enomoto, K., Chiken, S., Sano, H., Soma, S., Yoshida, J., Samejima, K., Ogawa, M., Kobayashi, K., Nambu, A., Isomura, Y., Kimura, M., 2018. Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways. *Neuron* 99, 1302-1314.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.002>

O

O'Brien, C.P., McLellan, A.T., 1996. Myths about the treatment of addiction. *Lancet* 347, 237–240. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90409-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90409-2)

Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, 2019. Rapport européen sur les drogues: Tendances et évolutions 100.

O'Donnell, P., Greene, J., Pabello, N., Lewis, B.L., Grace, A.A., 1999. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 157–175. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09267.x>

Olds, J., 1958. Self-Stimulation of the Brain: Its Use To Study Local Effects of Hunger, Sex, and Drugs. *Science* 127, 315–324. <https://doi.org/10.1126/science.127.3294.315>

Olds, J., Milner, P., 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 47, 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>

Olds, M.E., Fobes, J.L., 1981. The Central Basis of Motivation: Intracranial Self-Stimulation Studies. *Annu. Rev. Psychol.* 32, 523–574. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.32.020181.002515>

Omkumar, R.V., Kiely, M.J., Rosenstein, A.J., Min, K.-T., Kennedy, M.B., 1996. Identification of a Phosphorylation Site for Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II in the NR2B Subunit of the N-Methyl-D-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 31670–31678. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31670>

OMS, 2004. Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence. *Addiction* 99, 1361–1362. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2004.00906.x>

Ortinski, P.I., 2014. Cocaine-Induced Changes in NMDA Receptor Signaling. *Molecular Neurobiology* 50, 494–506. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8636-6>

P

Pack, T.F., Orlen, M.I., Ray, C., Peterson, S.M., Caron, M.G., 2018. The dopamine D2 receptor can directly recruit and activate GRK2 without G protein activation. *J. Biol. Chem.* jbc.RA117.001300. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001300>

Page, G., Khidir, F.A.L., Pain, S., Barrier, L., Fauconneau, B., Guillard, O., Piriou, A., Hugon, J., 2006. Group I metabotropic glutamate receptors activate the p70S6 kinase via both mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling pathways in rat striatal and hippocampal synaptoneurosomes. *Neurochem. Int.* 49, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.01.020>

Panos, J.J., Rademacher, D.J., Renner, S.L., Steinpreis, R.E., 1999. The Rewarding Properties of NMDA and MK-801 (Dizocilpine) as Indexed by the Conditioned Place Preference Paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64, 591–595. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00155-0)

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>

Papp, M., 2002. Selective Blockade of Drug-induced Place Preference Conditioning by ACPC, a Functional NDMA-receptor Antagonist. *Neuropsychopharmacology* 27, 727–743. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00349-4](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00349-4)

- Pardo-Garcia, T.R., Garcia-Keller, C., Penaloza, T., Richie, C.T., Pickel, J., Hope, B.T., Harvey, B.K., Kalivas, P.W., Heinsbroek, J.A., 2019. Ventral Pallidum Is the Primary Target for Accumbens D1 Projections Driving Cocaine Seeking. *J. Neurosci.* 39, 2041–2051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2822-18.2018>
- Park, W.-K., Bari, A.A., Jey, A.R., Anderson, S.M., Spealman, R.D., Rowlett, J.K., Pierce, R.C., 2002. Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 22, 2916–2925. <https://doi.org/20026235>
- Parsons, L.H., Smith, A.D., Justice, J.B., 1991. Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 9, 60–65. <https://doi.org/10.1002/syn.890090109>
- Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.-A., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2011. Cyclic Adenosine Monophosphate–Independent Tyrosine Phosphorylation of NR2B Mediates Cocaine-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Biological Psychiatry* 69, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.031>
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014a. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 Activation by Addictive Drugs: A Signal Toward Pathological Adaptation. *Biological Psychiatry* 76, 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.005>
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014b. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 Activation by Addictive Drugs: A Signal Toward Pathological Adaptation. *Biological Psychiatry* 76, 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.005>
- Pascoli, V., Hiver, A., Zessen, R.V., Loureiro, M., Achargui, R., Harada, M., Flakowski, J., Lüscher, C., 2018. Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* 564, 366–371. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0789-4>
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'Connor, E.C., Lüscher, C., 2014c. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509, 459–464. <https://doi.org/10.1038/nature13257>
- Pascoli, V., Turiault, M., Lüscher, C., 2012. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71–75. <https://doi.org/10.1038/nature10709>
- Pauls, D.L., Abramovitch, A., Rauch, S.L., Geller, D.A., 2014. Obsessive–compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci* 15, 410–424. <https://doi.org/10.1038/nrn3746>
- Paulson, P.E., Camp, D.M., Robinson, T.E., 1991. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology* 103, 480–492. <https://doi.org/10.1007/BF02244248>
- Paulson, P.E., Robinson, T.E., 1991. Sensitization to systemic amphetamine produces an enhanced locomotor response to a subsequent intra-accumbens amphetamine challenge in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 140–141.
- Peciña, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W., Zhuang, X., 2003. Hyperdopaminergic mutant mice have higher “wanting” but not “liking” for sweet rewards. *J. Neurosci.* 23, 9395–9402.
- Pei, L., 2004. Regulation of Dopamine D1 Receptor Function by Physical Interaction with the NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience* 24, 1149–1158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3922-03.2004>

- Phillips, A.G., Blaha, C.D., Fibiger, H.C., 1989. Neurochemical correlates of brain-stimulation reward measured by ex vivo and in vivo analyses. *Neurosci Biobehav Rev* 13, 99–104. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(89\)80017-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(89)80017-x)
- Phillips, P.E.M., Stuber, G.D., Heien, M.L.A.V., Wightman, R.M., Carelli, R.M., 2003. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature* 422, 614–618. <https://doi.org/10.1038/nature01476>
- Pierce, R.C., Bell, K., Duffy, P., Kalivas, P.W., 1996. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J. Neurosci.* 16, 1550–1560. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-04-01550.1996>
- Pivonello, R., Ferone, D., de Herder, W.W., Faggiano, A., Bodei, L., de Krijger, R.R., Lombardi, G., Colao, A., Lamberts, S.W.J., Hofland, L.J., 2007. Dopamine Receptor Expression and Function in Corticotroph Ectopic Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 65–69. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0728>
- Prasad, A.A., Xie, C., Chaichim, C., Nguyen, J.H., McClusky, H.E., Killcross, S., Power, J.M., McNally, G.P., 2020. Complementary Roles for Ventral Pallidum Cell Types and Their Projections in Relapse. *J. Neurosci.* 40, 880–893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0262-19.2019>
- Price, K.L., Baker, N.L., McRae-Clark, A.L., Saladin, M.E., DeSantis, S.M., Ana, E.J.S., Brady, K.T., 2013. A Randomized, Placebo-controlled Laboratory Study of the Effects of D-cycloserine on Craving in Cocaine-dependent Individuals. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2592-x>
- Ptáček, R., Kuželová, H., Stefano, G.B., 2011. Dopamine D4 receptor gene DRD4 and its association with psychiatric disorders. *Med Sci Monit* 17, RA215–RA220. <https://doi.org/10.12659/MSM.881925>
- Pulido, R., Zúñiga, Á., Ullrich, A., 1998. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *The EMBO Journal* 17, 7337–7350. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7337>

R

- Radl, D., Chiacchiaretta, M., Lewis, R.G., Bami-Cherrier, K., Arcuri, L., Borrelli, E., 2018. Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by dopamine D2L and D2S isoforms. *PNAS* 115, 198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717194115>
- Radwanska, K., Valjent, E., Trzaskos, J., Caboche, J., Kaczmarek, L., 2006. Regulation of cocaine-induced activator protein 1 transcription factors by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroscience* 137, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.09.001>
- Redelsperger, I.M., Taldone, T., Riedel, E.R., Lepherd, M.L., Lipman, N.S., Wolf, F.R., 2016. Stability of Doxycycline in Feed and Water and Minimal Effective Doses in Tetracycline- Inducible Systems. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 55, 8.
- Redish, A.D., 2004. Addiction as a Computational Process Gone Awry. *Science* 306, 1944–1947. <https://doi.org/10.1126/science.1102384>
- Regan, M.C., Grant, T., McDaniel, M.J., Karakas, E., Zhang, J., Traynelis, S.F., Grigorieff, N., Furukawa, H., 2018. Structural Mechanism of Functional Modulation by Gene Splicing in NMDA Receptors. *Neuron* 98, 521–529.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.034>
- Reid, M.S., Hsu, K., Berger, S.P., 1997. Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: Studies on the involvement of dopamine. *Synapse* 27, 95–105. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199710\)27:2<95::AID-SYN1>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199710)27:2<95::AID-SYN1>3.0.CO;2-6)

- Rescorla, R.A., Wagner, A.R., 1972. A Theory of Pavlovian Conditioning: Variations in the Effectiveness of Reinforcement and Nonreinforcement, in: *Classical Conditioning II*. Appleton-Century-Crofts, pp. 64–99.
- Richardson, N.R., Roberts, D.C.S., 1996. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00153-0)
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237, 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>
- Robertson, M.W., Leslie, C.A., Bennett, J.P., 1991. Apparent synaptic dopamine deficiency induced by withdrawal from chronic cocaine treatment. *Brain Res.* 538, 337–339. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90451-z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90451-z)
- Robinson, S., Sandstrom, S.M., Denenberg, V.H., Palmiter, R.D., 2005. Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav. Neurosci.* 119, 5–15. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.5>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2008. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 3137–3146. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0093>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2001. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96, 103–114. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2001.9611038.x>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive–sensitization view. *Addiction* 95, 91–117. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.95.8s2.19.x>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 1993. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* 18, 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)
- Robison, A.J., 2014. Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease. *Trends in Neurosciences* 37, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.07.001>
- Robison, A.J., Nestler, E.J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12, 623–637. <https://doi.org/10.1038/nrn3111>
- Robison, A.J., Vialou, V., Mazei-Robison, M., Feng, J., Kourrich, S., Collins, M., Wee, S., Koob, G., Turecki, G., Neve, R., Thomas, M., Nestler, E.J., 2013. Behavioral and Structural Responses to Chronic Cocaine Require a Feedforward Loop Involving FosB and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in the Nucleus Accumbens Shell. *Journal of Neuroscience* 33, 4295–4307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5192-12.2013>
- Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., Franco, R., 2017. Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 54, 4537–4550. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9995-y>
- Rogers, R.D., Robbins, T.W., 2001. Investigating the neurocognitive deficits associated with chronic drug misuse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 250–257. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00204-x](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00204-x)
- Roitman, M.F., Stuber, G.D., Phillips, P.E.M., Wightman, R.M., Carelli, R.M., 2004. Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J. Neurosci.* 24, 1265–1271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3823-03.2004>
- Rolls, E.T., 1999. *The Brain and Emotion*. Oxford University Press.
- Romanelli, P., Esposito, V., Schaal, D.W., Heit, G., 2005. Somatotopy in the basal ganglia: experimental and clinical evidence for segregated sensorimotor channels. *Brain Research Reviews* 48, 112–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.008>

- Romieu, P., Phan, V.L., Martin-Fardon, R., Maurice, T., 2002. Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade. *Neuropsychopharmacology* 26, 444–455. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00391-8)
- Rosselli, M., Ardila, A., 1996. Cognitive Effects of Cocaine and Polydrug Abuse. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 18, 122–135. <https://doi.org/10.1080/01688639608408268>
- Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., Gessa, G.L., 1992. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 227–234. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90706-a](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90706-a)
- Rubinstein, M., Phillips, T.J., Bunzow, J.R., Falzone, T.L., Dziewczapolski, G., Zhang, G., Fang, Y., Larson, J.L., McDougall, J.A., Chester, J.A., Saez, C., Pugsley, T.A., Gershanik, O., Low, M.J., Grandy, D.K., 1997. Mice Lacking Dopamine D4 Receptors Are Supersensitive to Ethanol, Cocaine, and Methamphetamine. *Cell* 90, 991–1001. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80365-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80365-7)

S

- Saddoris, M.P., 2013. Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell Learning and action. *Frontiers in Bioscience E5*, 273–288. <https://doi.org/10.2741/E615>
- Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2019. From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type–Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.001>
- Santa Ana, E.J., Prisciandaro, J.J., Saladin, M.E., McRae-Clark, A.L., Shaftman, S.R., Nietert, P.J., Brady, K.T., 2015. d-Cycloserine combined with cue exposure therapy fails to attenuate subjective and physiological craving in cocaine dependence. *Am J Addict* 24, 217–224. <https://doi.org/10.1111/ajad.12191>
- Saulskaya, N., Marsden, C.A., 1995. Conditioned dopamine release: Dependence upon N-methyl-d-aspartate receptors. *Neuroscience* 67, 57–63. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00007-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00007-6)
- Saunders, A., Oldenburg, I.A., Berezovskii, V.K., Johnson, C.A., Kingery, N.D., Elliott, H.L., Xie, T., Gerfen, C.R., Sabatini, B.L., 2015. A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature* 521, 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature14179>
- Schenk, S., Valadez, A., Worley, C.M., McNamara, C., 1993. Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). *Behavioural Pharmacology* 4, 652–659.
- Schilström, B., Yaka, R., Argilli, E., Suvarna, N., Schumann, J., Chen, B.T., Carman, M., Singh, V., Mailliard, W.S., Ron, D., Bonci, A., 2006. Cocaine Enhances NMDA Receptor-Mediated Currents in Ventral Tegmental Area Cells via Dopamine D5 Receptor-Dependent Redistribution of NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 26, 8549–8558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5179-05.2006>
- Schultz, W., 2006. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57, 87–115. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070229>
- Schultz, W., Apicella, P., Ljungberg, T., 1993. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J. Neurosci.* 13, 900–913.
- Schultz, W., Dickinson, A., 2000. Neuronal Coding of Prediction Errors. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 473–500. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.473>
- Schultz, W., Tremblay, L., Hollerman, J.R., 1998. Reward prediction in primate basal ganglia and frontal cortex. *Neuropharmacology* 37, 421–429. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00071-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00071-9)
- Schumann, J., Yaka, R., 2009. Prolonged Withdrawal from Repeated Noncontingent Cocaine Exposure Increases NMDA Receptor Expression and ERK Activity in the

- Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 29, 6955–6963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1329-09.2009>
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Ehlers, M.D., 2003. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology, Post-translational modifications of protein structure and synaptic function* 45, 755–767. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00250-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00250-8)
- Scott, L., Zelenin, S., Malmersjö, S., Kowalewski, J.M., Markus, E.Z., Nairn, A.C., Greengard, P., Brismar, H., Aperia, A., 2006. Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *PNAS* 103, 6.
- Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J., Wong, K., 1975. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4376–4380.
- Seeman, P., McCormick, P.N., Kapur, S., 2007. Increased dopamine D2High receptors in amphetamine-sensitized rats, measured by the agonist [3H](+)PHNO. *Synapse* 61, 263–267. <https://doi.org/10.1002/syn.20367>
- Seeman, P., Talerico, T., Ko, F., 2004. Alcohol-withdrawn animals have a prolonged increase in dopamine D2High receptors, reversed by general anesthesia: Relation to relapse? *Synapse* 52, 77–83. <https://doi.org/10.1002/syn.20005>
- Seeman, P., Van Tol, H.H.M., 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 15, 264–270. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(94\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90323-9)
- Seeman, P., Weinshenker, D., Quirion, R., Srivastava, L.K., Bhardwaj, S.K., Grandy, D.K., Premont, R.T., Sotnikova, T.D., Boksa, P., El-Ghundi, M., O'Dowd, B.F., George, S.R., Perreault, M.L., Männistö, P.T., Robinson, S., Palmiter, R.D., Talerico, T., 2005. Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *PNAS* 102, 3513–3518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409766102>
- Self, D.W., Barnhart, W.J., Lehman, D.A., Nestler, E.J., 1996. Opposite Modulation of Cocaine-Seeking Behavior by D1- and D2-Like Dopamine Receptor Agonists. *Science* 271, 1586–1589. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1586>
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., de Wit, H., Stewart, J., 2003. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology* 168, 3–20. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1224-x>
- Sharkey, J., Glen, K.A., Wolfe, S., Kuhar, M.J., 1988. Cocaine binding at σ receptors. *European Journal of Pharmacology* 149, 171–174. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90058-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90058-1)
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144–147. <https://doi.org/10.1038/368144a0>
- Shepherd, G.M.G., 2013. Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 278–291. <https://doi.org/10.1038/nrn3469>
- Shipp, S., 2017. The functional logic of corticostriatal connections. *Brain Struct Funct* 222, 669–706. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1250-9>
- Shizgal, P., 1997. Neural basis of utility estimation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 198–208. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(97\)80008-6](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80008-6)
- Skinner, B.F., 1937. Two Types of Conditioned Reflex: A Reply to Konorski and Miller. *The Journal of General Psychology* 16, 272–279. <https://doi.org/10.1080/00221309.1937.9917951>
- Smaga, I., Sanak, M., Filip, M., 2019. Cocaine-induced Changes in the Expression of NMDA Receptor Subunits. *CN* 17, 1039–1055. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190617101726>
- Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J., Goldman-Rakic, P.S., 1994. D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and

- extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5720–5724.
- Smith, A., Li, M., Becker, S., Kapur, S., 2006. Dopamine, prediction error and associative learning: a model-based account. *Network* 17, 61–84. <https://doi.org/10.1080/09548980500361624>
- Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Domingues, A.V., Vasconcelos, N., Sousa, N., Rodrigues, A.J., 2018. Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-MSN-Driven Increase in Motivation. *eNeuro* 5. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0386-18.2018>
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N.A.P., Coimbra, B., Domingues, A.V., Silva, J.M., Loureiro-Campos, E., Gaspar, R., Sotiropoulos, I., Sousa, N., Rodrigues, A.J., 2019. Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0484-3>
- Sokoloff, P., Schwartz, J.-C., 1995. Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends in Pharmacological Sciences* 16, 270–275. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89044-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89044-6)
- Song, R., Zhang, H.-Y., Li, X., Bi, G.-H., Gardner, E.L., Xi, Z.-X., 2012. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking dopamine D3 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17675–17680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205297109>
- Song, R.S., Massenburg, B., Wenderski, W., Jayaraman, V., Thompson, L., Neves, S.R., 2013. ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion. *PNAS* 110, 15437–15442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311783110>
- Song, S.S., Kang, B.J., Wen, L., Lee, H.J., Sim, H., Kim, T.H., Yoon, S., Yoon, B.-J., Augustine, G.J., Baik, J.-H., 2014. Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization. *Front. Behav. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00336>
- Spano, P.F., Govoni, S., 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.
- Sripada, S., Gaytan, O., Swann, A., Dafny, N., 2001. The role of MK-801 in sensitization to stimulants. *Brain Research Reviews* 35, 97–114. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00046-1)
- Staddon, J.E.R., Cerutti, D.T., 2003. Operant Conditioning. *Annu Rev Psychol* 54, 115–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.54.101601.145124>
- Standaert, D.G., Testa, C.M., Young, A.B., Penney, J.B., 1994. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 343, 1–16. <https://doi.org/10.1002/cne.903430102>
- Steinberg, E.E., Boivin, J.R., Saunders, B.T., Witten, I.B., Deisseroth, K., Janak, P.H., 2014. Positive Reinforcement Mediated by Midbrain Dopamine Neurons Requires D1 and D2 Receptor Activation in the Nucleus Accumbens. *PLOS ONE* 9, e94771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094771>
- Steinberg, E.E., Keiflin, R., Boivin, J.R., Witten, I.B., Deisseroth, K., Janak, P.H., 2013. A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nat Neurosci* 16, 966–973. <https://doi.org/10.1038/nn.3413>
- Steinbusch, H.W., 1981. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6, 557–618. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90146-9)
- Steiner, Tseng, 2017. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, Second Edition, Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02359-3>

- Steketee, J.D., Kalivas, P.W., 2011. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews* 63, 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Stelly, C.E., Pomrenze, M.B., Cook, J.B., Morikawa, H., 2016. Repeated social defeat stress enhances glutamatergic synaptic plasticity in the VTA and cocaine place conditioning. *eLife* 5, e15448. <https://doi.org/10.7554/eLife.15448>
- Stephenson-Jones, M., Samuelsson, E., Ericsson, J., Robertson, B., Grillner, S., 2011. Evolutionary Conservation of the Basal Ganglia as a Common Vertebrate Mechanism for Action Selection. *Current Biology* 21, 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.001>
- Stern, E.A., Jaeger, D., Wilson, C.J., 1998. Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature* 394, 475–478. <https://doi.org/10.1038/28848>
- Stoker, A.K., Markou, A., 2011. Withdrawal from chronic cocaine administration induces deficits in brain reward function in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research* 223, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.042>
- Strong, C.E., Schoepfer, K.J., Dossat, A.M., Saland, S.K., Wright, K.N., Kabbaj, M., 2017. Locomotor sensitization to intermittent ketamine administration is associated with nucleus accumbens plasticity in male and female rats. *Neuropharmacology* 121, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.003>
- Stuber, G.D., Roitman, M.F., Phillips, P.E.M., Carelli, R.M., Wightman, R.M., 2005. Rapid Dopamine Signaling in the Nucleus Accumbens during Contingent and Noncontingent Cocaine Administration. *Neuropsychopharmacol* 30, 853–863. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300619>
- Subburaju, S., Sromek, A.W., Seeman, P., Neumeyer, J.L., 2018. New Dopamine D2 Receptor Agonist, [3H]MCL-536, for Detecting Dopamine D2high Receptors in Vivo. *ACS Chem Neurosci* 9, 1283–1289. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00096>
- Sullivan, D., Pinsonneault, J.K., Papp, A.C., Zhu, H., Lemeshow, S., Mash, D.C., Sadee, W., 2013. Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene–gene–environment interaction. *Transl Psychiatry* 3, e222–e222. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.146>
- Sulzer, D., Cragg, S.J., Rice, M.E., 2016. Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. *Basal Ganglia* 6, 123–148. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2016.02.001>
- Sun, P., Wang, J., Gu, W., Cheng, W., Jin, G., Friedman, E., Zheng, J., Zhen, X., 2009a. PSD-95 regulates D1 dopamine receptor resensitization, but not receptor-mediated Gs-protein activation. *Cell Res* 19, 612–624. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.30>
- Sun, P., Wang, J., Gu, W., Cheng, W., Jin, G., Friedman, E., Zheng, J., Zhen, X., 2009b. PSD-95 regulates D 1 dopamine receptor resensitization, but not receptor-mediated Gs-protein activation. *Cell Res* 19, 612–624. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.30>
- Sun, W.-L., Zhou, L., Quinones-Jenab, V., Jenab, S., 2009. Cocaine effects on dopamine and NMDA receptors interactions in the striatum of Fischer rats. *Brain Res Bull* 80, 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.016>
- Sutton, R.S., Barto, A.G., 1981. Toward a modern theory of adaptive networks: expectation and prediction. *Psychol Rev* 88, 135–170.

T

- Tanabe, J., Tregellas, J.R., Dalwani, M., Thompson, L., Owens, E., Crowley, T., Banich, M., 2009. Medial orbitofrontal cortex gray matter is reduced in abstinent substance-dependent individuals. *Biol. Psychiatry* 65, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.07.030>
- Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 1999. Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *Journal of Neuroscience*

- Research 55, 401–410. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990215\)55:4<401::AID-JNR1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990215)55:4<401::AID-JNR1>3.0.CO;2-H)
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., Costa, R.M., 2016. Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166, 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G.P., Mainen, Z.F., Costa, R.M., 2014. Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat Commun* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Tepper, J.M., Abercrombie, E.D., Bolam, J.P., 2007. Basal ganglia macrocircuits, in: Tepper, James M., Abercrombie, Elizabeth D., Bolam, J. Paul (Eds.), *Progress in Brain Research, Gaba and the Basal Ganglia*. Elsevier, pp. 3–7. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60001-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60001-0)
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.10.003>
- Tepper, J.M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T.W., Assous, M., 2018. Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front. Neuroanat.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091>
- Tepper, J.M., Sun, B.-C., Martin, L.P., Creese, I., 1997. Functional Roles of Dopamine D2 and D3 Autoreceptors on Nigrostriatal Neurons Analyzed by Antisense Knockdown In Vivo. *J. Neurosci.* 17, 2519–2530. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02519.1997>
- Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koos, T., Ibanez-Sandoval, O., 2010. Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Front. Neuroanat.* 4. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00150>
- Terrier, J., Lüscher, C., Pascoli, V., 2016. Cell-Type Specific Insertion of GluA2-Lacking AMPARs with Cocaine Exposure Leading to Sensitization, Cue-Induced Seeking and Incubation of Craving. *Neuropsychopharmacology* 41, 1779–1789. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.345>
- Thanos, P.K., Habibi, R., Michaelides, M., Patel, U.B., Suchland, K., Anderson, B.J., Robinson, J.K., Wang, G.-J., Grandy, D.K., Volkow, Nora.D., 2010. Dopamine D4 receptor (D4R) deletion in mice does not affect operant responding for food or cocaine. *Behavioural Brain Research* 207, 508–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.020>
- Thompson, D., Martini, L., Whistler, J.L., 2010. Altered Ratio of D1 and D2 Dopamine Receptors in Mouse Striatum Is Associated with Behavioral Sensitization to Cocaine. *PLoS ONE* 5, e11038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011038>
- Thomsen, M., Caine, S.B., 2011. Psychomotor stimulant effects of cocaine in rats and 15 mouse strains. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 19, 321–341. <https://doi.org/10.1037/a0024798>
- Thorndike, E.L., 1911. *Animal intelligence: experimental studies*.
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., Huganir, R.L., 1997. Characterization of Protein Kinase A and Protein Kinase C Phosphorylation of the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Subunit Using Phosphorylation Site-specific Antibodies. *J. Biol. Chem.* 272, 5157–5166. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5157>
- Tol, H.H.M.V., Wu, C.M., Guan, H.-C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H.B., Jovanovic, V., 1992. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358, 149–152. <https://doi.org/10.1038/358149a0>
- Tong, G., Takahashi, H., Tu, S., Shin, Y., Talantova, M., Zago, W., Xia, P., Nie, Z., Goetz, T., Zhang, D., Lipton, S.A., Nakanishi, N., 2008. Modulation of NMDA Receptor

Properties and Synaptic Transmission by the NR3A Subunit in Mouse Hippocampal and Cerebrocortical Neurons. *J Neurophysiol* 99, 122–132. <https://doi.org/10.1152/jn.01044.2006>

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>

Trifilieff, P., Ducrocq, F., van der Veldt, S., Martinez, D., 2017a. Blunted Dopamine Transmission in Addiction: Potential Mechanisms and Implications for Behavior. *Semin Nucl Med* 47, 64–74. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.09.003>

Trifilieff, P., Ducrocq, F., van der Veldt, S., Martinez, D., 2017b. Blunted Dopamine Transmission in Addiction: Potential Mechanisms and Implications for Behavior. *Seminars in Nuclear Medicine, Updates in Molecular Brain Imaging* 47, 64–74. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.09.003>

Trifilieff, P., Rives, M.-L., Urizar, E., Piskorowski, R., Vishwasrao, H., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., Javitch, J., 2011. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotech*. <https://doi.org/10.2144/000113719>

Tripathi, A., Prensa, L., Mengual, E., 2013. Axonal branching patterns of ventral pallidal neurons in the rat. *Brain Struct Funct* 218, 1133–1157. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0451-0>

Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G.D., Bonci, A., Lecea, L. de, Deisseroth, K., 2009. Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science* 324, 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>

Tzschentke, T.M., 1998. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology* 56, 613–672. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00060-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00060-4)

U

United Nations, 2019. World drug report 2019.

Usiello, A., Baik, J.-H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., Borrelli, E., 2000. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199–203. <https://doi.org/10.1038/35041572>

V

Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.-A., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in neurosciences* 32, 538–547.

Valjent, E., Corbille, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Herve, D., Girault, J.-A., 2006. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 2932–2937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511030103>

Valjent, E., Corvol, J.-C., Pagès, C., Besson, M.-J., Maldonado, R., Caboche, J., 2000. Involvement of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade for Cocaine-Rewarding Properties. *The Journal of Neuroscience* 20, 8701–8709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08701.2000>

Valjent, Emmanuel, Corvol, J.-C., Trzaskos, J.M., Girault, A., Hervé, D., 2006. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neuroscience* 11.

Valjent, E., Pages, C., Herve, D., Girault, J.-A., Caboche, J., 2004. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *European Journal of Neuroscience* 19, 1826–1836. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03278.x>

- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.-C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., Greengard, P., Herve, D., Girault, J.-A., 2005. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *PNAS* 102, 491–496.
- van Huijstee, A.N., Mansvelder, H.D., 2015. Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Front. Cell. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00466>
- Vanderschuren, L.J.M.J., Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151, 99–120. <https://doi.org/10.1007/s002130000493>
- Vanhoutte, P., Bading, H., 2003. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 366–371. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00073-4)
- Vicente, A.M., Galvão-Ferreira, P., Tecuapetla, F., Costa, R.M., 2016. Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Current Biology* 26, R267–R269. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.036>
- VOGT, C., 1920. Zur Lehre der Erkrankungen des striaren Systems. *Z Psychol Neurol* 25, 627–846.
- Volkow, Fowler, Wolf, Henn, 1990. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *AJP* 147, 719–724. <https://doi.org/10.1176/ajp.147.6.719>
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Baler, R., Telang, F., 2009. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology, Frontiers in Addiction Research: Celebrating the 35th Anniversary of the National Institute on Drug Abuse* 56, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.-J., Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D.J., Dewey, S.L., Wolf, A.P., 1993. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14, 169–177. <https://doi.org/10.1002/syn.890140210>
- Volkow, N.D., Morales, M., 2015. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 162, 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., Vitkun, S., Logan, J., Gatley, S.J., Pappas, N., Hitzemann, R., Shea, C.E., 1997a. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386, 827–830. <https://doi.org/10.1038/386827a0>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Gifford, A., Hitzemann, R., Ding, Y.-S., Pappas, N., 1999. Prediction of Reinforcing Responses to Psychostimulants in Humans by Brain Dopamine D2 Receptor Levels. *AJP* 156, 1440–1443. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.9.1440>
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Hitzemann, R., Chen, A.D., Dewey, S.L., Pappas, N., 1997b. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature* 386, 830–833. <https://doi.org/10.1038/386830a0>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Tomasi, D., Telang, F., 2011. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15037–15042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Telang, F., Fowler, J.S., Logan, J., Childress, A.-R., Jayne, M., Ma, Y., Wong, C., 2006. Cocaine Cues and Dopamine in Dorsal Striatum: Mechanism of Craving in Cocaine Addiction. *J. Neurosci.* 26, 6583–6588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1544-06.2006>

- Waltereit, R., Weller, M., 2003. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.* 27, 99–106. <https://doi.org/10.1385/MN:27:1:99>
- Wang, H., Pickel, V.M., 2002. Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J. Comp. Neurol.* 442, 392–404. <https://doi.org/10.1002/cne.10086>
- Wang, J.Q., Guo, M.-L., Jin, D.-Z., Xue, B., Fibuch, E.E., Mao, L.-M., 2014. Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *Eur J Pharmacol* 728, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.019>
- Wang, M., Wong, A.H., Liu, F., 2012a. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Research* 1476, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.029>
- Wang, M., Wong, A.H., Liu, F., 2012b. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Research, Brain Integration - from Molecular to Network Level* 1476, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.029>
- Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M.-P., Sankoorikal, E.-B., 2000. Dopamine D2 Long Receptor-Deficient Mice Display Alterations in Striatum-Dependent Functions. *J. Neurosci.* 20, 8305–8314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08305.2000>
- Weddington, W.W., Brown, B.S., Haertzen, C.A., Cone, E.J., Dax, E.M., Herning, R.I., Michaelson, B.S., 1990. Changes in mood, craving, and sleep during short-term abstinence reported by male cocaine addicts. A controlled, residential study. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 861–868. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1990.01810210069010>
- Weeks, J.R., 1962. Experimental Morphine Addiction: Method for Automatic Intravenous Injections in Unrestrained Rats. *Science* 138, 143–144. <https://doi.org/10.1126/science.138.3537.143>
- Weiss, F., Markou, A., Lorang, M.T., Koob, G.F., 1992. Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res.* 593, 314–318. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91327-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91327-b)
- Welter, M., Vallone, D., Samad, T.A., Meziane, H., Usiello, A., Borrelli, E., 2007. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *PNAS* 104, 6840–6845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610790104>
- White, F., 1998. Dopamine Receptor Antagonists Fail to Prevent Induction of Cocaine Sensitization. *Neuropsychopharmacology* 18, 26–40. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00093-6)
- Willuhn, I., Burgeno, L.M., Groblewski, P.A., Phillips, P.E.M., 2014. Excessive cocaine use results from decreased phasic dopamine signaling in the striatum. *Nat Neurosci* 17, 704–709. <https://doi.org/10.1038/nn.3694>
- Wilson, C., Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *The Journal of Neuroscience* 16, 2397–2410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02397.1996>
- Wilson, C.J., 2009. Striatum: Internal Physiology, in: *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 563–572. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01301-2>
- Wise, R.A., 2005. Forebrain substrates of reward and motivation. *J. Comp. Neurol.* 493, 115–121. <https://doi.org/10.1002/cne.20689>
- Wise, R.A., 1996. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 319–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001535>

- Withers, N.W., Pulvirenti, L., Koob, G.F., Gillin, J.C., 1995. Cocaine abuse and dependence. *J Clin Psychopharmacol* 15, 63–78. <https://doi.org/10.1097/00004714-199502000-00010>
- Wolf, M.E., 1998. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in Neurobiology* 54, 679–720. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00090-7)
- Woods, A.S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., 2005a. Role of Electrostatic Interaction in Receptor–Receptor Heteromerization. *Journal of Molecular Neuroscience* 26, 125–132. <https://doi.org/10.1385/JMN:26:2-3:125>
- Woods, A.S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., 2005b. Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J Mol Neurosci* 26, 125–132. <https://doi.org/10.1385/JMN:26:2-3:125>
- Woods, J., 1977. Behavioral effects of cocaine in animals. *NIDA Res. Monogr. Series* 13, 63–95.
- Wydra, K., Golembiowska, K., Zaniewska, M., Kamińska, K., Ferraro, L., Fuxe, K., Filip, M., 2013. Accumbal and pallidal dopamine, glutamate and GABA overflow during cocaine self-administration and its extinction in rats: Cocaine reward and seeking. *Addiction Biology* 18, 307–324. <https://doi.org/10.1111/adb.12031>
- X
- Xi, Z.-X., Ramamoorthy, S., Baker, D.A., Shen, H., Samuvel, D.J., Kalivas, P.W., 2002. Modulation of Group II Metabotropic Glutamate Receptor Signaling by Chronic Cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 608–615. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.039735>
- Xu, M., Guo, Y., Vorhees, C.V., Zhang, J., 2000. Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Research* 852, 198–207. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02258-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02258-1)
- Xu, M., Hu, X.-T., Cooper, D.C., Moratalla, R., Graybiel, A.M., White, F.J., Tonegawa, S., 1994. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79, 945–955. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90026-4)
- Xu, W., 2011. PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.03.001>
- Y
- Yager, L.M., Garcia, A.F., Donckels, E.A., Ferguson, S.M., 2019. Chemogenetic inhibition of direct pathway striatal neurons normalizes pathological, cue-induced reinstatement of drug-seeking in rats. *Addiction Biology* 24, 251–264. <https://doi.org/10.1111/adb.12594>
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H., 2014. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>
- Yamaguchi, T., Sheen, W., Morales, M., 2007. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience* 25, 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
- Yamamoto, B.K., Davy, S., 1992. Dopaminergic Modulation of Glutamate Release in Striatum as Measured by Microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 58, 1736–1742. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10048.x>
- Yan, Y., Pushparaj, A., Strat, Y.L., Gamaledin, I., Barnes, C., Justinova, Z., Goldberg, S.R., Foll, B.L., 2012. Blockade of Dopamine D4 Receptors Attenuates Reinstatement of Extinguished Nicotine-Seeking Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacol* 37, 685–696. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.245>

- Yao, W.-D., Gainetdinov, R.R., Arbuckle, M.I., Sotnikova, T.D., Cyr, M., Beaulieu, J.-M., Torres, G.E., Grant, S.G.N., Caron, M.G., 2004. Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. *Neuron* 41, 625–638. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00048-0)
- Yao, W.-D., Spealman, R.D., Zhang, J., 2008. Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochemical Pharmacology* 75, 2055–2069. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.01.018>
- Yeh, S.Y., De Souza, E.B., 1991. Lack of neurochemical evidence for neurotoxic effects of repeated cocaine administration in rats on brain monoamine neurons. *Drug and Alcohol Dependence* 27, 51–61. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(91\)90086-E](https://doi.org/10.1016/0376-8716(91)90086-E)
- Yin, H.H., Zhuang, X., Balleine, B.W., 2006. Instrumental learning in hyperdopaminergic mice. *Neurobiol Learn Mem* 85, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.12.001>
- Z**
- Zahm, D.S., Heimer, L., 1990. Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *Journal of Comparative Neurology* 302, 437–446. <https://doi.org/10.1002/cne.903020302>
- Zhang, J., Vinuela, A., Neely, M.H., Hallett, P.J., Grant, S.G.N., Miller, G.M., Isacson, O., Caron, M.G., Yao, W.-D., 2007. Inhibition of the Dopamine D1 Receptor Signaling by PSD-95. *Journal of Biological Chemistry* 282, 15778–15789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611485200>
- Zhang, J., Xu, T.-X., Hallett, P.J., Watanabe, M., Grant, S.G.N., Isacson, O., Yao, W.-D., 2009. PSD-95 Uncouples Dopamine-Glutamate Interaction in the D1/PSD-95/NMDA Receptor Complex. *Journal of Neuroscience* 29, 2948–2960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4424-08.2009>
- Zhang, J., Zhang, L., Jiao, H., Zhang, Q., Zhang, D., Lou, D., Katz, J.L., Xu, M., 2006. c-Fos Facilitates the Acquisition and Extinction of Cocaine-Induced Persistent Changes. *J. Neurosci.* 26, 13287–13296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-06.2006>
- Zhang, S., Xie, C., Wang, Q., Liu, Z., 2015. Interactions of CaMKII with dopamine D2 receptors: roles in levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep06811>
- Zhang, Y., Loonam, T.M., Noailles, P.A., Angulo, J.A., 2001. Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 937, 93–120. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03560.x>
- Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., Malinow, R., 2002. Ras and Rap Control AMPA Receptor Trafficking during Synaptic Plasticity. *Cell* 110, 443–455. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00897-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00897-8)
- Zhu, Y., Dwork, A.J., Trifilieff, P., Javitch, J.A., 2020. Detection of G Protein-Coupled Receptor Complexes in Postmortem Human Brain by Proximity Ligation Assay. *Current Protocols in Neuroscience* 91, e86. <https://doi.org/10.1002/cpns.86>
- Zhu, Y., Mészáros, J., Walle, R., Fan, R., Sun, Z., Dwork, A.J., Trifilieff, P., Javitch, J.A., 2019. Detecting G protein-coupled receptor complexes in postmortem human brain with proximity ligation assay and a Bayesian classifier. *BioTechniques* 68, 122–129. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0083>

VIII. Annexes

Title: Cell type- and region-specific modulation of cocaine seeking by micro-RNA-1 in striatal projection neurons

Benoit Forget^{1,2,3,4*}, Arthur Godino^{1,2,3,4,5}, Elena Martin Garcia⁶, Laura Domingo-Rodriguez⁶, Vincent Kappes^{1,2,3,4}, Pierre Poirier^{1,2,3,4}, Andry Andrianarivelo^{1,2,3,4}, Peter Vanhoutte^{1,2,3,4}, Jean-Antoine Girault^{2,7,8}, Rafael Maldonado⁶, and Jocelyne Caboche^{1,2,3,4*}.

Affiliations

1. Neuroscience Paris Seine, Institut de Biologie Paris-Seine, Paris, France
2. Sorbonne Université, Faculty of Sciences, Paris, France
3. CNRS UMR8246, Paris, France
4. INSERM U1130, Paris France
5. Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York 10029.
6. Laboratory of Neuropharmacology, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.
7. Institut du Fer à Moulin, Paris, France
8. INSERM UMR-S1270

* equal contribution

Corresponding author: jocelyne.caboche@upmc.fr; phone: +33 44 27 53 52; fax: +33 1 44 27 53 52;

Number of words in the abstract: 245

Number of words in the text: 4031

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Supplementary material: 1

Supplementary figures: 5

ABSTRACT

The persistent and experience-dependent nature of drug addiction may result in part from epigenetic alterations, including from non-coding micro-RNA (miRNA), which are both critical for neuronal function and modulated by cocaine in the striatum. Two major striatal cell populations – the striato-nigral and striato-pallidal projection neurons- express respectively the D1 (D1-SPN) and D2 (D2-SPN) dopamine receptor, and display distinct but complementary functions in drug-evoked responses. However, a cell-type-specific role for miRNA action has yet to be clarified. Here, we evaluated the expression of a subset of miRNAs proposed to modulate cocaine effects in the nucleus accumbens (NAc) and dorsal striatum (DS) upon sub-chronic cocaine exposure in mice and showed that selected miRNAs were preferentially up-regulated in the NAc. We then focused on miR-1 considering the important role of some of its predicted mRNA targets, such as *fosb* and *npas4*, in cocaine's effect. We validated these targets *in vitro* and *in vivo* using viral overexpression of miR-1 in either D1- or D2-SPN of the DS or NAc. We further showed that overexpression of miR-1 in D1- and D2-SPN of the NAc and DS did not impact cocaine-induced locomotor sensitization, nor the acquisition, expression or extinction of cocaine-induced conditioned place preference (CPP) or self-administration (SA). However, miR-1 overexpression specifically in DS D1-SPN reduced cocaine-induced CPP reinstatement, whereas it increased cue-induced reinstatement of cocaine-SA. Together, our results highlight a precise cell type- and region-specific control of relapse to cocaine-seeking behaviors by miR-1 and illustrate the importance of cell-specific investigations.

INTRODUCTION

Drug addiction is a clinically devastating neuropsychiatric disorder thought to result from neural adaptations at the molecular, cellular, and circuit levels following repeated drug exposure [1]. Drugs of abuse initially affect neuronal plasticity in the mesocorticolimbic system corresponding to dopamine (DA) neuron of the ventral tegmental area (VTA) projecting onto the *nucleus accumbens* (NAc), which is the ventral part of the striatum, and the prefrontal cortex [2,3]. The striatum plays crucial roles in diverse behavioral processes including as movement control and reward-dependent learning [4-6]. While the NAc underlies the primary reinforcing effects of drugs of abuse such as cocaine, the emergence of compulsive cocaine seeking habits, a hallmark of drug addiction, is associated with a shift to the dorsal striatal (DS) control over behavior [7,8].

In the DS and to a lesser extent in the NAc striatal projection neurons (SPNs) are comprised of two segregated GABAergic neuronal populations: the SPNs expressing the DA-D1 receptor subtype (D1-SPNs) that project directly to the internal segment of the *globus pallidus* (GPi) and the *substantia nigra pars reticulata* (SNr) and the SPN expressing the DA-D2 receptor subtype (D2-SPNs), which project mainly to the external segment of the *globus pallidus* (GPe). Furthermore, these two subpopulations exert distinct, albeit complementary, functions. In the DS the D1-SPN represent the “direct pathway”, which facilitates the initiation and execution of voluntary movement, while the D2-SPNs of the “indirect pathway” inhibit movement [9,10]. However, both pathways are necessary for action initiation [11]. The direct and indirect pathways are also thought to work in opposing manners in reward-based learning, with the direct pathway mediating reinforcement and the indirect pathway mediating punishment and aversion [5,12], although such a dichotomy has been recently challenged [13-15]. Several studies investigated the participation of D1- and D2-SPN in behaviors related to

cocaine exposure [16]. For example, activation of D1-SPNs in the NAc increases the formation of cocaine reward–context associations while activation of D2-SPNs in the same structure decreases cocaine reward and self-administration [17,18]. D1-SPNs in the NAc encode information related to the association between cocaine and contextual cues and drive cocaine seeking induced by those cues [19]. While most of the studies investigating the role of D1- and D2-SPNs in the behavioral effects of cocaine focused on the NAc, a recent work showed a very specific role of D1-SPNs of the dorsomedial striatum in cocaine responses, where their inhibition had no impact on loss of control over cocaine intake, motivation to obtain cocaine or compulsive cocaine self-administration, but specifically reduced cue-induced cocaine-seeking in high-risk addiction group of rats [20].

The persistent and experience-dependent aspects of the addicted phenotype have suggested a role for epigenetic modifications in drug-induced gene expression [21] as epigenetic mechanisms can register and durably maintain transcriptional states [22]. Among various epigenetic processes, attention has recently been focused on miRNAs, a subcategory of 21-25-nucleotides non-coding RNAs that modulate gene expression by binding to complementary sequences in the 3' untranslated regions (3'UTR) of many, up to hundreds, of target mRNA transcripts per miRNA, thereby inducing mRNA destabilization and subsequent degradation and/or repression of mRNA translation [23]. MiRNAs have been shown to play a role in multiple neuronal functions and to appear to be altered in several psychiatric conditions [24], including addiction [25]. Several studies have provided evidence that miRNA-mediated gene regulation plays an important role in cocaine-induced changes in neurotransmission and behavior [26], but there is so far, no direct evidence regarding cell-type-specificity of cocaine-induced miRNA in the striatum, and more specifically in D1-SPNs versus D2-SPNs. One study began to broadly address this aspect by specific ablation in D2-SPNs [27] of Ago2, a key protein in the processing and production of miRNAs [28-30]. These

mice showed loss of motivation to self-administer cocaine, along with a decrease of around one third of miRNAs induced by acute cocaine, thus indicating that miRNA induction occurs in both D1- and D2-SPN. However, the question of whether and how miRNAs regulation in D1-SPNs versus D2-SPNs controls gene expression and behaviors induced by cocaine, remains to be addressed.

Here we aimed to identify the regional pattern, i.e. DS versus NAc, of expression of a selected miRNAs, proposed to play a key role in cocaine action or neuronal plasticity after sub-chronic cocaine administrations [24,25,31]. We next focused on miR-1, based on its predicted mRNA targets, including *Fosb* and *Npas4* mRNAs. We used a validated viral strategy [32-34] in order to thoroughly evaluate miR-1 cell-type-specific roles in D1- or D2-SPNs of the NAc or DS in multiple behaviors related to cocaine addiction. We found a key role of miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS on cocaine-and cue-induced relapse to cocaine seeking, with a reduction of cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in conditioned place preference (CPP) paradigm, and an increase in cue-induced reinstatement of cocaine self-administration (SA). Altogether our data unveil a complex cell type- and region-specific regulatory role for miR-1 in different relapse behaviors, and the importance of cell-specific investigations.

MATERIALS AND METHODS

More details on the materials and methods used are given in Supplementary Methods.

Animals and drug treatments

All animal treatments and procedures were conducted in accordance with local and European directives for the care and use of laboratory animals (86/609/EEC) and approved by the institutional French Animal Care Committee (agreement N°2010/63) and by the Spanish local ethical committee (*Comitè Ètic d'Experimentació Animal-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona*, CEEA-PRBB).

Viral vectors

For the overexpression of miR-1 in D1-SPN or D2-SPN of the striatum, we used a combination of AAVs (AAV9-*PPTA*-Cre or AAV9-*PPE*-Cre, respectively; titers: 1×10^{12} in combination with AAV9-miR-1^{flox} or AAV9-miR-Scr^{flox} titers: 1×10^{12} genomic copies/mL). AAV-injected mice were used for experiments after at least three weeks for the full expression of viral-mediated miRNA expression.

Stereotaxic injections

Mice were anesthetized using ketamine and xylazine (5:1 in amount; 0.1 mL/10g), placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA), and 1 μ L in the NAc or 2 μ L in the DS was injected at a constant rate of 0.20 μ L/min by using a microinfusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA). We used the following coordinates to perform bilateral injections according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin: NAc coordinates: AP +1.4 mm; ML $\pm$ 0.7 mm; DV -4.4 mm; DS coordinates: AP +0.98 mm; ML $\pm$ 1.75 mm; DV -3.5 mm.

Quantitative PCR analysis (qPCR) of miRNA and mRNA levels

Punches of NAc and DS were performed from frozen tissues and total RNA was isolated using miRNeasy MiniKit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For mRNA levels analysis, total RNA (100 ng) isolated from each brain sample was reverse-transcribed with oligo-dT primers using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher). For miRNA levels analysis, total RNA (100 ng) was reverse-transcribed using the same kit with a combination of specific RT-primers for each miRNA of interest (0.5 pmol of each RT-primer), as previously described [35], allowing high specificity, sensitivity and homogeneity. qPCR was performed with a LightCycler 480 device (Roche) using LightCycler SYBR Green I Master Mix (Roche) and specific couples of primers; samples were run in triplicates. The primers sequences for miRNAs and mRNAs are presented in supplementary **Figure 1a and b**, respectively.

Luciferase assay to assess the interaction between miR-1 and the 3'UTR of *Bdnf*, *FosB* and *Npas4* in HEK cells

The pmirGLO-3'UTR_*Bdnf*, pmirGLO-3'UTR_*FosB* and pmirGLO-3'UTR_*Npas4* plasmids were purchased from Creative Biogene and the mimick-miR-1a-3p and mimick-miR-control from Qiagen (miScript miRNA Mimics). The protocol used is described in DOI: [10.21769/BioProtoc.420](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.420). The mean ratio of luminescence from the experimental reporter (firefly) to luminescence from the control reporter (Renilla) was calculated for each triplicate and normalized to the ratio of control wells (miRNA negative control which does not target the UTR).

Cocaine-induced locomotor sensitization

The locomotor activity was evaluated using a circular corridor (actimeter) [36].

Cocaine-induced conditioned place preference (CPP), extinction and reinstatement

The CPP was evaluated in a Plexiglas Y-shaped apparatus (Immetronic) with one arm blocked, located in a soundproof testing room with low luminosity using an unbiased

procedure. Two of the three chambers were used for the conditioning and distinguished by different floors textures and walls patterns. The device was connected to an electronic interface for data collection. Entries and time spent in each chamber were measured, as well as the locomotor activity of the mice during the experiments.

Operant self-administration of cocaine

The self-administration experiments were conducted in mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT; Med Associates Inc., Georgia, VT, USA) as previously described [37]. Nose pokes were the operant action that led to delivery of a cocaine infusion.

Immunocytochemical studies

The procedures for Cre-recombinase (anti-Cre-recombinase antibody; 1:500, mouse, MAB3120, Merck Millipore), and Fos-B (anti-FosB antibody 1:500, rabbit, Ma5-15056, Invitrogen) immunofluorescence experiments and quantification of Fos-B expression are detailed in **supplementary methods**.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism and Statview softwares. For all experiments, ANOVAs were performed followed, when appropriate, by post hoc test Bonferroni for multiple comparisons, except when data did not pass the normality test and/or when the number of individuals was too low. In those cases, non-parametric tests, such as Mann-Whitney (for 2 groups) or Kruskal-Wallis followed by post-hoc Dunn's test (for more than two groups) were used. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$. All the statistical results for principal figures are reported in **Table 1**.

RESULTS

Sub-chronic cocaine exposure differentially regulates a subset of plasticity-related miRNAs in the NAc and DS

Several miRNAs have been shown to respond to 1-week cocaine exposure in a broad miRNA-sequencing study [31]. Among those, we selected a subset of 14 miRNAs (miR-1, -16, -29b, -31, -32, -124, -125a, -128b, -132, -181a, -212, -221, -223 and Let7) based on their association either with cocaine addiction [25] or with other related brain disorders [24]. We measured the expression levels of these 14 miRNAs in the NAc and DS by RT-qPCR, after a 10-day treatment with cocaine mimicking a behavioral sensitization procedure (**Figure 1a**) known to induce modifications in miRNAs expression [31]. The sequences of all miRNA primers used are presented in **Supplementary Figure 1a**. This repeated exposure to cocaine did not significantly alter miRNA levels in the DS but induced an up-regulation of 11 of these 14 miRNAs in the NAc (**Figure 1b and c, left panels**).

The mRNA expression levels of the key players in miRNA processing, such as *Drosha*, *Dicer*, *Tar RNA Binding Protein (TRBP)* and *Ago2*, were not modulated by cocaine (**Figure 1b and c, right panels**), indicating that the observed miRNA regulation did not result from alterations in the general miRNA processing machinery at the mRNA level.

We then used a combination of databases, including miRBase, Miranda, TargetScan and Tarbase, crossed with literature data on cocaine addiction, to predict cocaine-related target genes of the selected miRNAs, and identified 9 potential interesting targets: *Bdnf*, *Fos-B*, *Npas4*, *Gria2*, *Grin2b*, *Gria3*, *Pi3K*, *Drd1a* and *Mef2c* (**Figure 1d**). We studied expression levels of these mRNAs in the DS and NAc after our 10-day protocol of cocaine administration. Among these mRNAs, we only observed a significant increase in the expression levels of *FosB*, *Npas4* and *pi3k* mRNAs in the DS, but not in the NAc (**Figure 1e**).

Validation of *fosB* and *npas4* mRNAs as targets of miR-1

In most cases, miRNAs interact with the 3' UTR of target mRNAs to induce mRNA degradation or translational repression [38]. We hypothesized that the absence of detectable up-regulation of *fosB* and *npas4* mRNAs by cocaine in the NAc may be due to a concomitant cocaine-induced up-regulation of miRNA(s) targeting these mRNAs in this region. Among the selected miRNAs, we focused on miR-1 because the “in silico” prediction indicated that it targeted both *fosB* and *npas4* mRNAs (**Figure 1d**) and we experimentally tested the validity of these potential targets (**Figure 2**). To validate direct miR-1 binding to its predicted target mRNAs, we used a luciferase reporter assay with constructs containing the target mRNA 3'UTRs (**Figure 2a left panel**), along with the *bdnf* 3'UTR as a positive control [39]. We observed a significant decrease of the luciferase activity in HEK cells expressing the pmiRGlo plasmid with the 3'UTR of *bdnf*, *fosB* and *npas4* in the presence of a mimick-miR-1 when compared to a negative miR-control (**Figure 2a, right panels**), indicating that the 3'UTR of *bdnf*, *fosB* and *npas4* are directly targeted by miR-1 *in vitro*.

We further aimed to assess whether miR-1 could repress *bdnf*, *fosB* and *npas4* mRNA levels *in vivo*. To this end, we used an AAV-mediated cell-type specific strategy allowing to overexpress miR-1 in either D1R-SPN or D2R-SPN. We used a combination of AAVs with one expressing miR-1 in a Cre recombinase-dependent manner and the other expressing Cre under a cell type-specific promoter (*PPTA::Cre* and *PPE::Cre*, expressed in D1R-SPN and D2R-SPN respectively) as previously validated [32-34] (**see also supplementary Figure 2a-b**). As compared to the control group (injected with an AAV expressing scrambled RNA, Scr) we found a marked increase (approximately 15-fold) of miR-1 levels after D1R- or D2R-overexpression of miR-1 in either the DS or the NAc, with a concomitant decrease in the expression of *fosB* and *npas4* mRNAs, which was significant in several cases (**Figure 2b-c**),

thus confirming the ability of miR-1 to repress *fosB* and *npas4* mRNAs expression *in vivo*. Consistent with the preferential expression of *bdnf* mRNA in axons from afferent excitatory cortical neurons [40], and their low levels in SPNs we failed to detect a significant effect of miR-1 overexpression on *bdnf* mRNA levels in any conditions. miR-1 overexpression did not impact on the expression levels of mRNAs involved in miRNA processing nor levels of miR-206, a miRNA from the same family than miR-1 (**Supplementary Figure 3a and b**).

Effects of miR-1 overexpression in D1- and D2R-SPN of the NAc and DS on cocaine-induced locomotor sensitization

Having established the inhibitory role of miR-1 on *fos-b* and *npas4* mRNA expression, which are key players in cocaine-induced long-term adaptations [41,42], we investigated the potential effect of miR-1 overexpression in either D1- or D2-SPN of the DS and NAc on locomotor sensitization induced by cocaine (15 mg/kg)-induced (**Supplementary Figure 4a-e**). The overexpression of miR-1 in either D1-SPN or in D2-SPN of the NAc or DS did not modify the locomotor sensitization induced by cocaine (**Supplementary Figure 4b-e**).

Cell-type-specific effects of miR-1 in D1- and D2R-SPN of the NAc and DS in cocaine-induced conditioned place preference

We then measured the effects of overexpression of miR-1 in cocaine-induced conditioned place preference (CPP), which can be used as a proxy for the rewarding properties of cocaine. Overexpression of miR-1 in D1-SPN of the DS did not alter cocaine-induced CPP (**Figure 3a, left panel**). We then extinguished the CPP by freely exposing the mice to cocaine-paired and unpaired environments after saline injection and observed that miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS did not modify CPP extinction (**Figure 3a, middle panel**). In contrast, the reinstatement of cocaine CPP induced by an acute injection of cocaine after the extinction

period (15 mg/kg) was prevented by miR-1 overexpression in DS D1-SPNs (**Figure 3a, right panel**). We measured the levels of miR-1 and its target genes in the DS of these mice 1h after the start of the reinstatement test. As expected we found, high levels of miR-1 in both saline and cocaine miR-1-injected groups, while miR-1 levels were not altered in control groups (**Figure 3b, left panel**). Cocaine-induced reinstatement of CPP increased *fosB* and *npas4* mRNA in the control scramble group, whereas these effects were blocked by miR-1 overexpression in D1-SPN (**Figure 3b, right panel**). miR-1 overexpression in D1-SPNs of the NAc did not alter either cocaine-induced CPP, its extinction or its cocaine-induced reinstatement (**Figure 3c**). As shown in **Figure 4a and b**, the overexpression of miR-1 in D2-SPN of the DS or NAc had no consequence on cocaine-induced CPP, extinction or cocaine-induced reinstatement. These results indicate that miR1-overexpression in DS D1-SPNs specifically alters cocaine-induced CPP reinstatement.

Cocaine self-administration, extinction and reinstatement after miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS of mice

We then investigated whether miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS altered cocaine self-administration. MiR-1 overexpression in DS D1-SPN did not modify the acquisition of self-administration, the motivation for cocaine under a progressive ratio of reinforcement (**Figure 5a**) nor the extinction of this behavior (**Figure 5b**). Furthermore, the number of days required for acquisition of cocaine self-administration, or for achievement of extinction was similar between groups. However, miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS induced a significant increase in cue-induced reinstatement of cocaine seeking (**Figure 5c**), a result that contrasted with the blockade of cocaine-induced reinstatement of CPP (see **Figure 3a**). Interestingly, when analyzing FosB expression after cue-induced reinstatement of cocaine seeking, we found a slight decrease in the DS and an increase in the NAc core after miR-1

overexpression in the D1-SPN of the DS (**Figure 5d**), a result that suggests the existence of crosstalk between the the DS and NAc.

DISCUSSION

Our data show that miR-1 is up-regulated in the NAc, but not the DS, by a 10-day regimen of cocaine and that at least three mRNAs encoding proteins associated with cocaine-induced neuronal plasticity, *fosB*, *npas4* and *bdnf* are targeted by miR-1. We also demonstrate that overexpression of miR-1 in D1-SPN, but not D2-SPN, in the DS, decreases cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in a CPP paradigm. In contrast, this overexpression increases cue-induced reinstatement of cocaine seeking in a self-administration protocol.

Multiple miRNAs were reported to be modulated by cocaine [26]. In a miRNA profiling study, a panel of miRNAs was either up- or down-regulated by prolonged cocaine exposure [43]. Induction of miR-132 and miR-212 occurs in the DS after extended access to cocaine self-administration, and overexpression of miR-212 reduced compulsive cocaine intake in rats through CREB, MeCP2 and BDNF signaling [44,45]. *In silico* genome-wide sequencing identified miR-495 among miRNAs whose targets are enriched in an addiction-related gene (ARG) database. Lentiviral-mediated overexpression of miR-495 in the NAc suppressed the motivation to self-administer and seek cocaine [46]. Deficiency of Ago2 in D2-SPNs greatly influenced a specific group of miRNAs, and reduced approximately by half the expression of miR-1 [27], suggesting that miR-1 is expressed in both types of SPNs in this structure.

Similarly to our study, Hollander et al. (2010) showed that overexpression of miR-1 in the DS, failed to alter cocaine intake, but cell-type-specificity and reinstatement of drug seeking were not investigated [44]. Herein, we provide here evidence that miR-1 targets the transcription factor *fosB*, the spliced version of which, Δ FosB, persistently accumulates in D1-SPN of the NAc after chronic psychostimulant exposure, and plays a key role in cocaine addiction [47]. This cell-type-specific Δ FosB expression was further confirmed in reporter lines [48,49] or using ribosomal tagging approaches [50]. Δ FosB overexpression in D1-SPN

increases locomotor activity and rewarding effects of low doses of cocaine [51], as well as cocaine self-administration [52]. Since miR-1 reduces the expression *fosb* mRNAs, which encodes both FosB and Δ FosB, it was surprising to observe that miR-1 overexpression in D1-SPNs of the NAc failed to alter cocaine-induced locomotor sensitization and CPP. However, the involvement of Δ FosB in cocaine's effect seems highly dependent on the environment, since Δ FosB is differentially regulated in rats reared in an isolated condition compared to those in an enriched condition in response to cocaine [53]. For example, chronic cocaine treatment elevates Δ FosB protein levels in the NAc of isolated rats, but not in enriched condition due to an already elevated basal accumulation of Δ FosB. In addition, overexpression of Δ FosB in the NAc shell of pair-housed rats increases operant responding for sucrose when motivated by hunger, but decreases responding in satiated animals, in cocaine self-administration and cocaine-induced relapse. The facilitating effects of Δ FosB overexpression in D1-SPN on cocaine-induced behaviors were seen in individually housed animals [52], while our mice were housed five per cage. Accordingly, we did not observe a significant increase of *FosB* mRNAs in the NAc in our conditions, as shown in rats in enriched condition [53]. The absence of effect of miR-1 overexpression in D1-SPN of the NAc on cocaine-induced locomotor sensitization and CPP might thus be due to our environmental conditions. Alternatively, we cannot exclude that Δ FosB overexpression observed so far in D1-SPNs of the NAc results from an accumulation of the stable protein rather than from de novo gene expression, or that a partial decrease induced by miR-1 overexpression may not be sufficient to prevent the behavior.

Another validated target of miR-1 was *bdnf* mRNA, which encodes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), that also plays a key role in cocaine-induced behaviors [54]. In particular, data from several labs suggest a facilitation effect of BDNF in the NAc on cocaine-induced CPP and cocaine-primed reinstatement [55,56]. However, we did not observe a

modification of these behaviors after miR-1 overexpression in the NAc. This result can be explained by the absence of modification of *bdnf* mRNA levels in our *in vivo* studies, due to its very low levels in the striatum in basal conditions, as observed in our RT-qPCR data. Indeed, cortical pyramidal afferents arising from the prefrontal cortex are the main source of BDNF within the striatum, including the NAc [57] and this source may mediate the majority of the effects of BDNF on cocaine-related behaviors [58].

We also showed that *npas4*, which encodes an activity-dependent transcription factor that plays a key role in neuronal plasticity and is induced in the NAc by cocaine [42] is a target of miR-1. Interestingly, NPAS4 expression is higher in D1- than in D2-SPN in the NAc after cocaine-induced CPP [59] and NPAS4 positive cells co-express cFos [42], another activity-related immediate early gene, which is selectively induced by cocaine in D1-SPN [60]. Furthermore, conditional deletion of *Npas4* in the NAc significantly reduced cocaine-induced CPP and delayed the acquisition of cocaine self-administration, without affecting cue-induced reinstatement of cocaine seeking [42]. In our study, miR-1 overexpression reduced but did not abolish *npas4* mRNA, a result that could explain its lack of effect in D1-SPN of the NAc on cocaine-induced CPP.

Interestingly, we found a specific, albeit apparently opposite, effect of miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS on cocaine-induced reinstatement of cocaine CPP and cue-induced reinstatement of cocaine seeking in a self-administration paradigm. Thus, while miR-1 overexpression in DS D1-SPN prevented cocaine-induced reinstatement of CPP, it potentiated cue-induced reinstatement of self-administration. These differential effects on cocaine-induced reinstatement of a cocaine-induced CPP and on cue-induced reinstatement of cocaine-induced SA could be explained by differences in cocaine doses and route of administration used in the two protocols, the time period of extinction and by the fact that the reinstatement of cocaine seeking is induced by a priming dose of cocaine for CPP and by a

cue previously associated with cocaine (thus in cocaine-free state) in SA. This differential effect may be due to differences in neuronal circuits involved in each behavior (see [61] and [62] for reviews). Indeed, the behavioral consequences and circuits involved are different when using an operant self-administration paradigm and a non-operant conditioned response [63]. Unfortunately, we were not able to evaluate the effect of miR-1 overexpression in D1-SPN on cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in the operant paradigm since cocaine priming does not induce reliable reinstatement in our strain of mice (C57Bl6) [64], such as Swiss albino mice [65]. In addition, cue-induced reinstatement is mediated by dopaminergic projections from the VTA to the basolateral amygdala (BLA) and glutamatergic projections from the prefrontal cortex to the BLA and NAc, while cocaine-induced reinstatement is independent from the BLA [61]. Thus, miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS may disinhibit neurons of the VTA, inducing an increase in activity of neurons in the NAc directly or *via* a relay in the BLA and/or the prefrontal cortex to promote cue-induced reinstatement of cocaine seeking, while reducing cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking via a different neuronal circuit.

In conclusion, our data show a specific and distinct role of miR-1 in cocaine- and cue-induced relapses of two different cocaine-dependent behaviors after an extinction period. This contributes to the dissection of the mechanisms underlying relapse behaviors, one of the major burdens of drug addiction. Our results show the cell type-specific and region-specific role of miR-1 and underlines differences between cocaine- and cue-induced reinstatement in non-operant and operant paradigms. Our study thus highlights the complexity of the control of relapse behavior and emphasizes the importance of regional cell-type specific investigations.

FUNDING

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale ([DEQ20150734352](#) to [JC](#)), Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS, B.F., A.G., V.K., P.P., P.V., J.C.), Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM; B.F., A.G., V.K., P.P., P.V., J.-A.G, J.C), Sorbonne Université, Faculté des Sciences et Ingénierie (B.F., A.G., V.K., P.P., P.V., J.-A.G, J.C) Labex Biopsy *Investissements d’Avenir*, ANR-11-IDEX-0004-02 (B.F., A.G., V.K., P.P., P.V., J.-A.G, J.C), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad-MINECO (#SAF2017-84060-R-AEI/FEDER-UE; E.M.-G., L.D.-R., R.M.), the Spanish Instituto de Salud Carlos III, RETICS-RTA (#RD12/0028/0023; E.M.-G., L.D.-R., R.M.), the Generalitat de Catalunya, AGAUR (#2017-SGR-669; E.M.-G., L.D.-R., R.M.), ICREA-Acadèmia (#2015) and the Spanish Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Plan Nacional Sobre Drogas (#PNSD-2017I068) to R.M., Fundació La Marató-TV3 (#2016/20-30) to E.M.-G., *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM#DPA20140629798) and ANR (ANR-16-CE16-0018) to J.A.G.

Financial Disclosures: The authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the participation of Marie-Charlotte Allichon for some viral injections. We would particularly like to thank the whole team of Jocelyne Caboche for its encouraging support and help to the work.

Author contributions: B.F. and J.C. designed the study and wrote the manuscript. BF performed the viral injections, cocaine-induced locomotor sensitization and conditioned place preference experiments, RT-qPCR experiments and *in vitro* experiments. A.G. performed RT-qPCR experiments and participated in the writing of the manuscript. E.M.G and L.D.R.

performed the cocaine-self-administration experiment. V.K. participated in the RT-qPCR and immunofluorescence experiments. P.P. performed most of the in vitro experiments and participated in the RT-qPCR experiments. A.A. performed viral infections and immunofluorescence experiments for tracing D1 and D2 striatal pathways. R.M. designed the cocaine self-administration experiments. P.V., J.A.G. and R.M. participated in the writing of the manuscript.

REFERENCES

- 1 Luscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011;69(4):650-63.
- 2 Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-38.
- 3 Schultz W. Multiple reward signals in the brain. *Nature reviews Neuroscience*. 2000;1(3):199-207.
- 4 Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(31):8161-5.
- 5 Kravitz AV, Kreitzer AC. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology*. 2012;27(3):167-77.
- 6 Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature neuroscience*. 2012;15(6):816-8.
- 7 Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW. Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2008;363(1507):3125-35.
- 8 Everitt BJ, Robbins TW. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2013;37(9 Pt A):1946-54.
- 9 Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences*. 1990;13(7):266-71.
- 10 Bateup HS, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier DJ, et al. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14845-50.
- 11 Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, et al. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*. 2013;494(7436):238-42.
- 12 Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. 2010;68(5):815-34.
- 13 Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature neuroscience*. 2014;17(8):1022-30.
- 14 Soares-Cunha C, Coimbra B, Sousa N, Rodrigues AJ. Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016;68:370-86.
- 15 Vicente AM, Galvao-Ferreira P, Tecuapetla F, Costa RM. Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Current biology : CB*. 2016;26(7):R267-9.
- 16 Salery M, Trifilieff P, Caboche J, Vanhoutte P. From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type-Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biological psychiatry*. 2019.

- 17 Lobo MK, Covington HE, 3rd, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, et al. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*. 2010;330(6002):385-90.
- 18 Bock R, Shin JH, Kaplan AR, Dobi A, Markey E, Kramer PF, et al. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nature neuroscience*. 2013;16(5):632-8.
- 19 Calipari ES, Bagot RC, Purushothaman I, Davidson TJ, Yorgason JT, Pena CJ, et al. In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(10):2726-31.
- 20 Yager LM, Garcia AF, Donckels EA, Ferguson SM. Chemogenetic inhibition of direct pathway striatal neurons normalizes pathological, cue-induced reinstatement of drug-seeking in rats. *Addiction biology*. 2019;24(2):251-64.
- 21 Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B:259-68.
- 22 Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396-8.
- 23 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
- 24 Im HI, Kenny PJ. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends in neurosciences*. 2012;35(5):325-34.
- 25 Heyer MP, Kenny PJ. Corticostriatal microRNAs in addiction. *Brain research*. 2015;1628(Pt A):2-16.
- 26 Smith ACW, Kenny PJ. MicroRNAs regulate synaptic plasticity underlying drug addiction. *Genes, brain, and behavior*. 2018;17(3):e12424.
- 27 Schaefer A, Im HI, Veno MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, et al. Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(9):1843-51.
- 28 Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146-50.
- 29 Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007;131(6):1097-108.
- 30 O'Carroll D, Mecklenbrauker I, Das PP, Santana A, Koenig U, Enright AJ, et al. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development*. 2007;21(16):1999-2004.
- 31 Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper BA, Graveley BR. microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs. *Rna*. 2011;17(8):1529-43.
- 32 Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S, Kasai H. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*. 2014;345(6204):1616-20.
- 33 Dos Santos M, Salery M, Forget B, Garcia Perez MA, Betuing S, Boudier T, et al. Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biological psychiatry*. 2017;82(11):806-18.

- 34 Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*. 2010;66(6):896-907.
- 35 Wang X. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *Rna*. 2009;15(4):716-23.
- 36 Lanteri C, Hernandez Vallejo SJ, Salomon L, Doucet EL, Godeheu G, Torrens Y, et al. Inhibition of monoamine oxidases desensitizes 5-HT1A autoreceptors and allows nicotine to induce a neurochemical and behavioral sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(4):987-97.
- 37 Martin-Garcia E, Bourgoin L, Cathala A, Kasanetz F, Mondesir M, Gutierrez-Rodriguez A, et al. Differential Control of Cocaine Self-Administration by GABAergic and Glutamatergic CB1 Cannabinoid Receptors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016;41(9):2192-205.
- 38 O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
- 39 Varendi K, Kumar A, Harma MA, Andressoo JO. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(22):4443-56.
- 40 Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO journal*. 1990;9(8):2459-64.
- 41 Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *The American journal on addictions*. 2001;10(3):201-17.
- 42 Taniguchi M, Carreira MB, Cooper YA, Bobadilla AC, Heinsbroek JA, Koike N, et al. HDAC5 and Its Target Gene, Npas4, Function in the Nucleus Accumbens to Regulate Cocaine-Conditioned Behaviors. *Neuron*. 2017;96(1):130-44 e6.
- 43 Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Molecular and cellular neurosciences*. 2009;42(4):350-62.
- 44 Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*. 2010;466(7303):197-202.
- 45 Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nature neuroscience*. 2010;13(9):1120-7.
- 46 Bastle RM, Oliver RJ, Gardiner AS, Pentkowski NS, Bolognani F, Allan AM, et al. In silico identification and in vivo validation of miR-495 as a novel regulator of motivation for cocaine that targets multiple addiction-related networks in the nucleus accumbens. *Molecular psychiatry*. 2018;23(2):434-43.
- 47 Nestler EJ, Barrot M, Self DW. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):11042-6.
- 48 Lee KW, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Greengard P. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3399-404.
- 49 Lobo MK, Zaman S, Damez-Werno DM, Koo JW, Bagot RC, DiNieri JA, et al. DeltaFosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic

- pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(47):18381-95.
- 50 Heiman M, Schaefer A, Gong S, Peterson JD, Day M, Ramsey KE, et al. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell*. 2008;135(4):738-48.
- 51 Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, et al. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature*. 1999;401(6750):272-6.
- 52 Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW. Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(6):2488-93.
- 53 Zhang Y, Crofton EJ, Li D, Lobo MK, Fan X, Nestler EJ, et al. Overexpression of DeltaFosB in nucleus accumbens mimics the protective addiction phenotype, but not the protective depression phenotype of environmental enrichment. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:297.
- 54 Ghitza UE, Zhai H, Wu P, Airavaara M, Shaham Y, Lu L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2010;35(2):157-71.
- 55 Graham DL, Krishnan V, Larson EB, Graham A, Edwards S, Bachtell RK, et al. Tropomyosin-related kinase B in the mesolimbic dopamine system: region-specific effects on cocaine reward. *Biological psychiatry*. 2009;65(8):696-701.
- 56 Bahi A, Boyer F, Chandrasekar V, Dreyer JL. Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology*. 2008;199(2):169-82.
- 57 Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 1997;389(6653):856-60.
- 58 McGinty JF, Whitfield TW, Jr., Berglind WJ. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain research*. 2010;1314:183-93.
- 59 Funahashi Y, Ariza A, Emi R, Xu Y, Shan W, Suzuki K, et al. Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors. *Cell reports*. 2019;29(10):3235-52 e9.
- 60 Chandra R, Lobo MK. Beyond Neuronal Activity Markers: Select Immediate Early Genes in Striatal Neuron Subtypes Functionally Mediate Psychostimulant Addiction. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2017;11:112.
- 61 Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*. 2003;168(1-2):44-56.
- 62 Farrell MR, Schoch H, Mahler SV. Modeling cocaine relapse in rodents: Behavioral considerations and circuit mechanisms. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2018;87(Pt A):33-47.
- 63 Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction biology*. 2006;11(1):2-38.
- 64 Gutierrez-Cuesta J, Burokas A, Mancino S, Kummer S, Martin-Garcia E, Maldonado R. Effects of genetic deletion of endogenous opioid system components on the reinstatement of cocaine-seeking behavior in mice. *Neuropsychopharmacology :*

- official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2014;39(13):2974-88.
- 65 Soria G, Barbano MF, Maldonado R, Valverde O. A reliable method to study cue-, priming-, and stress-induced reinstatement of cocaine self-administration in mice. *Psychopharmacology*. 2008;199(4):593-603.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: A set of miRNAs is up-regulated in the ventral (NAc), but not the dorsal (DS), striatum after sub-chronic treatment with cocaine.

a) Schematic representation of the timing of cocaine (20mg/kg) or saline administrations and brain extraction. **b) Left panel:** expression of miRNAs in the DS after the 10-day treatment with cocaine or saline. **Right panel:** expression of mRNAs involved in miRNA processing. **c) left panel:** expression of a set of miRNAs in the NAc after the 10-day treatment with cocaine or saline. **Right panel:** expression of mRNAs involved in miRNA processing. **d)** In silico analysis of cocaine-related targets of miRNAs upregulated in the NAc after the cocaine treatment indicated in (a). **e)** Expression of mRNA targets after the 10-day treatment with cocaine or saline; in the DS (upper panel) or the NAc (lower panel). **b) c) and e) :** Mean $\pm$ SEM are represented. Mann-Whitney tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when comparing saline and cocaine groups.

Figure 2: Validation of miR-1 targets.

a) Left panel: schematic representation of the pmiR-Glo plasmids used in HEK cells. **Right Panel,** up: 3'UTR sequences of *bdnf*, *fosB* and *npas4* with complementarity with the seed sequence of miR-1 (bold and underlined); lower part: normalized Luciferase/Renilla activity of pmiR-Glo plasmid with *bdnf*, *fosB* and *npas4* 3'UTRs with miRNA mimics of miR-1 (black bars) or miR- control (grey bars). **b) Upper panel:** representation of the combination of AAVs to infect D1-SPN. **Middle-lower panels:** normalized fold change in expression of miR-1 (over miR-scr condition) (left) and *bdnf*, *fos-B* or *npas4* mRNA (right) after viral injection of miR-1 or miR-scr sequences in D1-SPN of the DS of mice (**middle panels**) or the NAc of mice (**lower panels**). **c) Upper panel:** representation of the combinaison of AAVs to infect D2-SPN. **Middle-lower panels:** normalized fold change in expression of miR-1 (over

miR-scr condition) (left) and *bdnf*, *fos-B* or *npas4* mRNA (right) after viral injection of miR-1 or miR-scr sequences in D2-SPN of the DS of mice (**middle panels**) or the NAc of mice (**lower panels**). **a-c**) Mean $\pm$ SEM are represented. Mann-Whitney tests: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Figure 3: Cocaine-induced conditioned place preference (CPP) and relapse in mice after miR-1 over-expression in D1-SPNs of the DS or NAc.

a) Left panel: CPP after miR-1 over-expression in DS D1-SPNs. The CPP index is the difference of CPP score between the pretest and the test. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of treatment, no effect of AAV and no interaction. **Middle panel:** extinction sessions for cocaine/miR-Scr and cocaine/miR-1 groups. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of session but not of AAV and no interaction. **Right panel:** Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction in mice with miR-1 over-expression in D1-SPN of the dorsal striatum. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of treatment, no effect of AAV and no interaction. Post hoc tests : Bonferroni's multiple comparison tests: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

b) Left panel: expression of miR-1 during cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in mice with miR-1 or miR-Scr over-expression in D1-SPN of the DS. The Kruskal-Wallis test indicated a significant group effect ($p < 0.0001$). Dunn's multiple comparison test: *** $p < 0.0001$.

Right panel: normalized fold change of expression levels of *npas4* and *fosB* mRNA after cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in mice with miR-1 over-expression in D1-SPN of the DS. The Kruskal-Wallis test on *npas4* and *fosB* mRNAs expression levels indicated a significant group effect. The Post-hoc analysis (Dunn's multiple comparison test) indicated significant differences between the saline/miR-Scr and the cocaine/miR-Scr groups

for both *npas4* and *fosB* mRNAs: * $p < 0.05$ and between the cocaine/miR-Scr and the cocaine/miR-1 groups for both *npas4* and *fosB* mRNAs: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$.

c) left panel: CPP after miR-1 over-expression in D1-SPN of the NAc of mice. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction.

Middle panel: extinction sessions for cocaine/miR-Scr and cocaine/miR-1 groups. The two-way ANOVA indicated no effect of session or of groups and no interaction. **Right panel:**

Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction in mice with miR-1 over-expression in D1-SPN of the NAc. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of treatment but not of AAV or of interaction. Bonferroni's multiple comparison tests: * $p < 0.05$.

a-c) Mean and SEM are represented.

Figure 4: Cocaine-induced Conditioned Place Preference and relapse after miR-1 overexpression in D2-SPN of the DS or NAc of mice.

a) Left panel: CPP after miR-1 overexpression in D2-SPN of the DS of mice. The 2-way ANOVA performed on the CPP index indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction. **Middle panel:** extinction sessions for coc/ Scr and coc/miR-1 groups. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of session but not of AAV and no interaction. **Right panel:** Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction in mice with miR-1 overexpression in D2-SPN of the DS. The two-way ANOVA performed on the reinstatement index (difference of CPP score between the extinction and the reinstatement test) indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction.

b) Left panel: CPP after miR-1 overexpression in D2-SPN of the NAc of mice. The two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction. **Middle panel:** extinction sessions for coc/Scr and coc/miR-1 groups. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of session but not of AAV and no interaction. **Right panel:** Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction in mice with miR-1 overexpression in D2-SPN of the NAc. The two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction. **a-b)** Mean +/- SEM are represented. Post-hoc Bonferroni's multiple comparison tests * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 5: Cocaine Self-Administration and relapse after extinction in mice with miR-1 overexpression in D1-SPN in DS.

a: Left panel: active nose-pokes during the acquisition of cocaine (0.5 mg/kg/infusion)-induced self-administration in mice with (n=11) or without (n=11, scr) miR-1 overexpression.

The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of session) and no interaction). **Middle panel:** number of cocaine infusions received during the acquisition of cocaine -induced self-administration. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression), a significant effect of session and no interaction. **Right panel:** breaking point for cocaine (0.5mg/kg/infusion)-induced self-administration under a progressive ratio.

b) Active nose-pokes during the extinction sessions. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of session and no interaction.

c) Cue-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction. The 2-way ANOVA indicated a significant effect of miR-1 overexpression, a significant effect of cue-reinstatement and a significant interaction. Post-hoc Bonferroni's multiple comparison test ***: $p < 0.01$ (extinction vs cue-reinstatement); #: $p < 0.05$ (scr vs miR-1).

d) Quantification of expression of the Fos-B protein (number of Fos-B positive cells/mm²) 24h after cue-induced reinstatement of cocaine seeking. StrM: striatum dorsal median; StrL: striatum dorsal lateral; Shell: NAc shell; Core: NAc core; AC: anterior cingulate cortex. The Mann-Whitney tests indicated significant differences between the scr and the miR-1 groups in the lateral part of the DS (StrL) and the Core of the NAc: * $p < 0.05$. **a-d)** Mean +/- SEM are represented.

Figure 1, Forget et al.

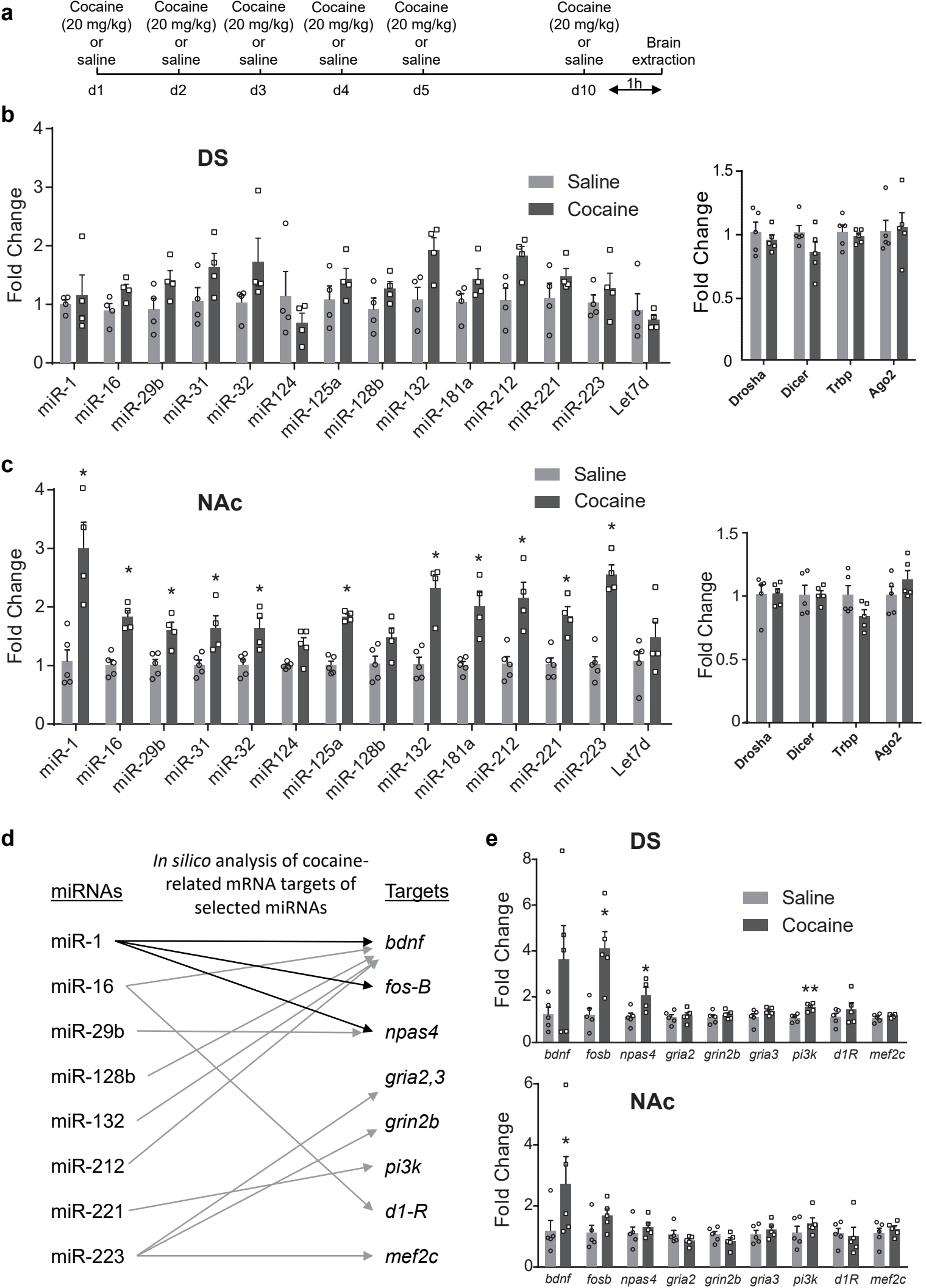
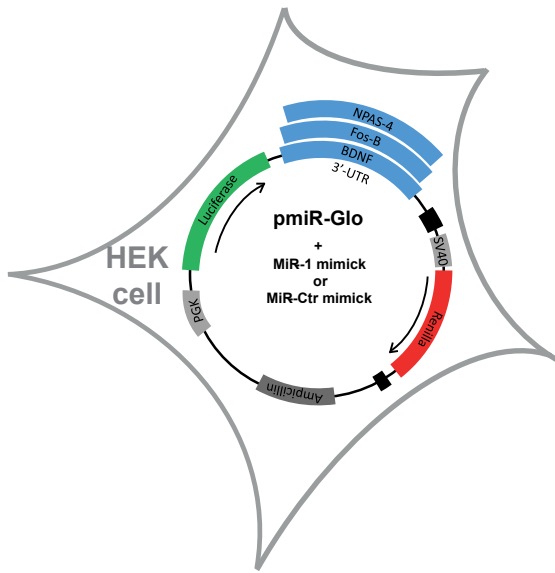


Figure 2, Forget et al.

a

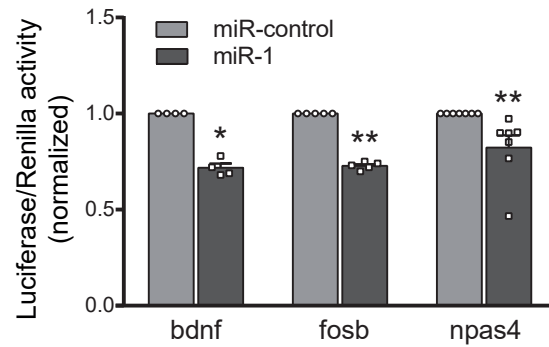


3'UTR sequence of miR-1 targets with complementarity with the seed sequence of miR-1

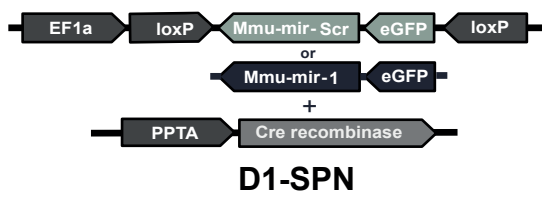
BDNF 5'...UGGACAUAUCCAGACCUGAAAGGAACAGUCAUUUGCGCACAAACUUAAAAGUCUGCAUUACAUAUCCUCGA[...JAAUUGGAACCAAAACAUAUCCGUUUACAUUUUAGAC [...JGGUACUUGAGACAUAUCCUAAAGGA...3'

Fosb 5'...CCCCGUGCUGCAUGGAACAUAUCCAUACCCUGUCCUGGGCCCUAGGUUCCAACCUAAUCC...3'

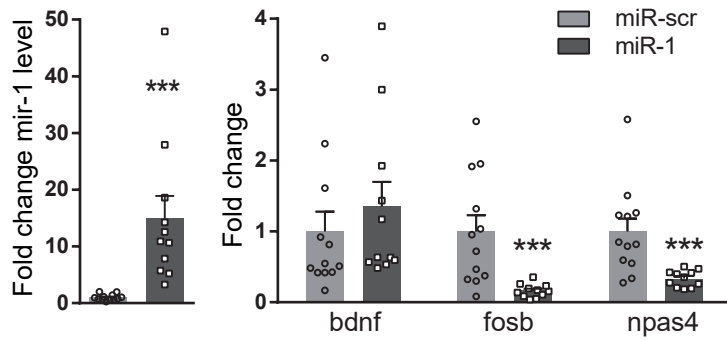
NPAS4 5'...AGACGCUACAUAUCCUUUCCGAUGGAGGAAGGCAGAUCCGCGUCACACGUG...3'



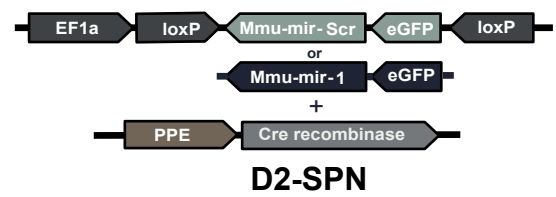
b



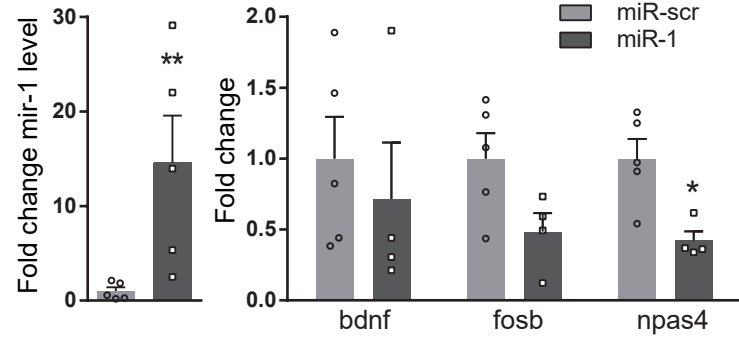
D1-SPN



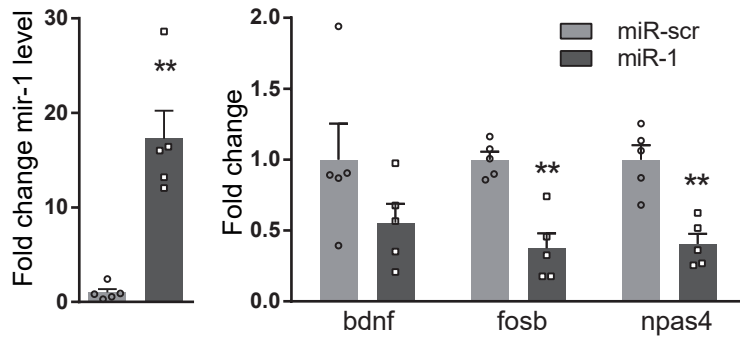
c



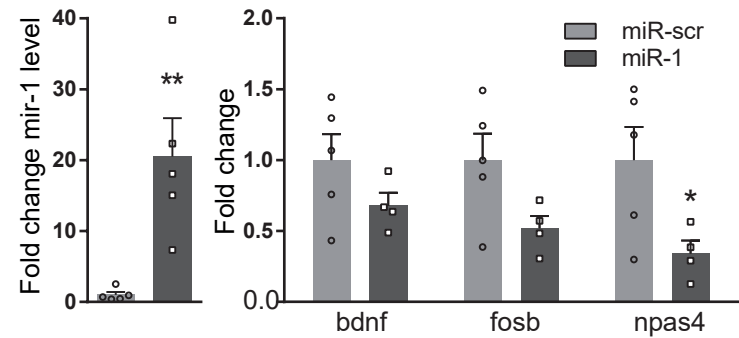
D2-SPN



D1-SPN



D2-SPN



NAC

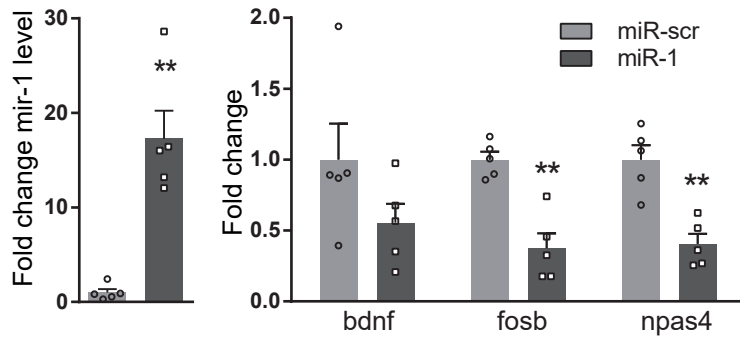


Figure 3, Forget et al.

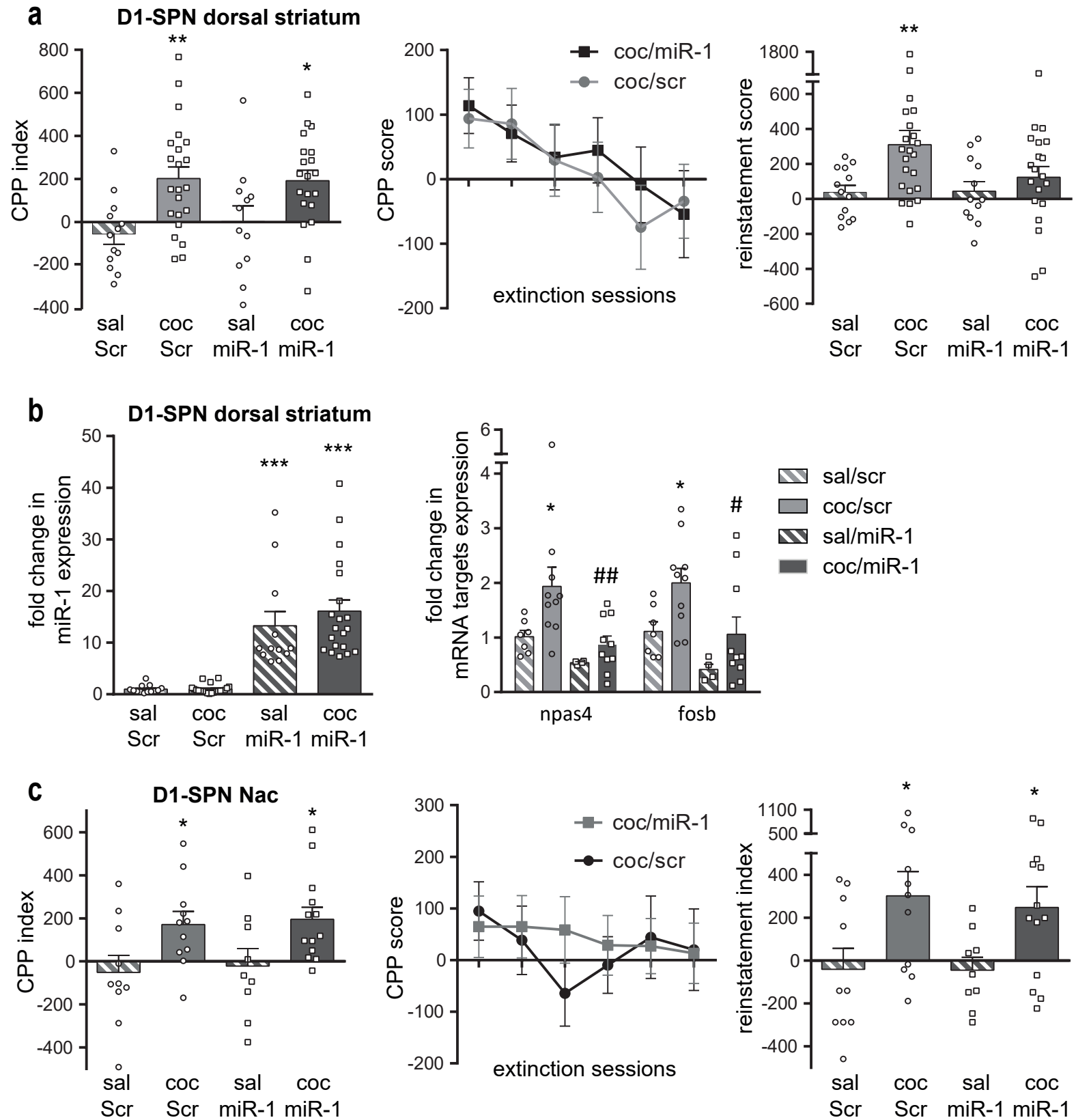


Figure 4, Forget et al.

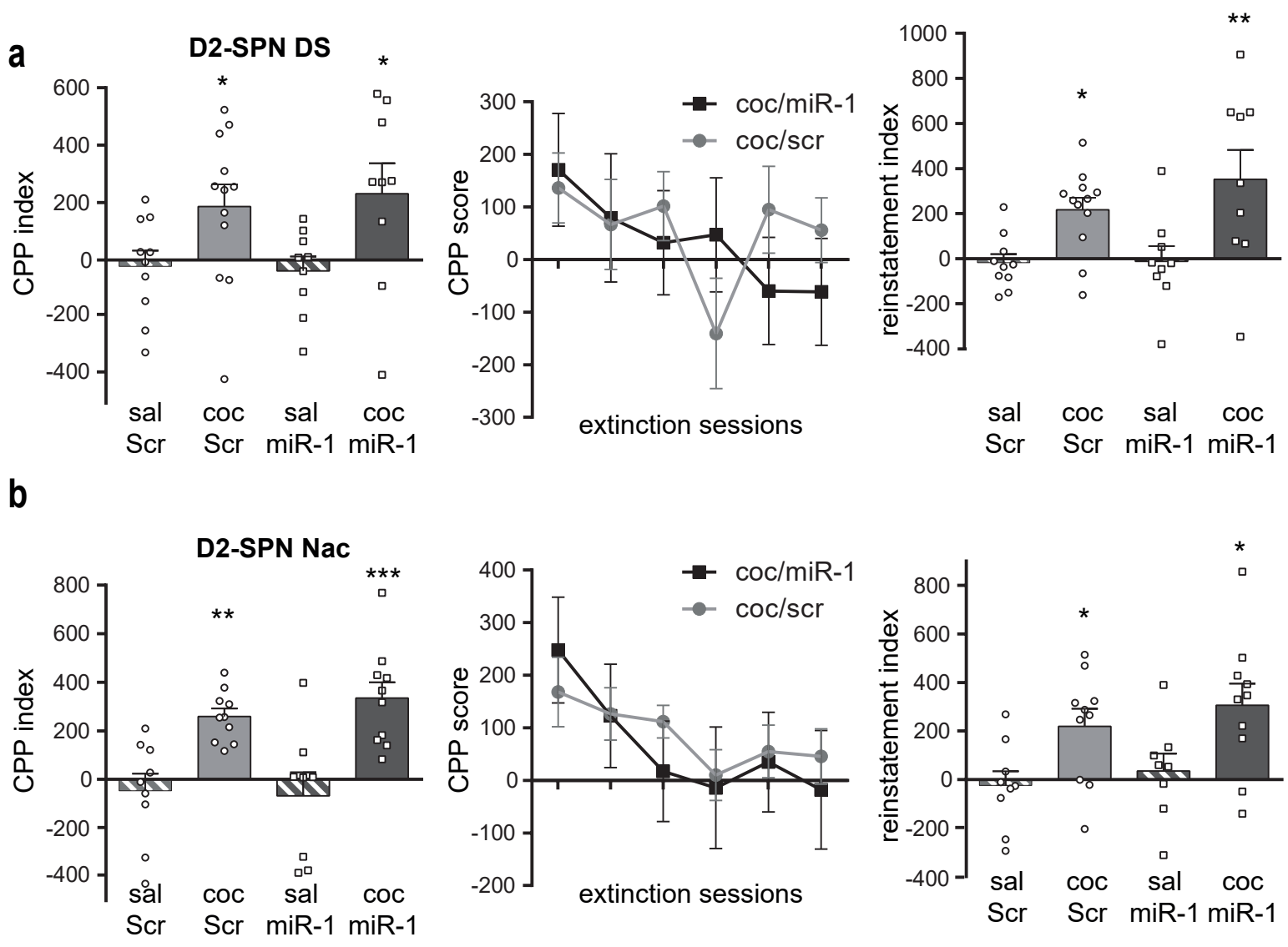
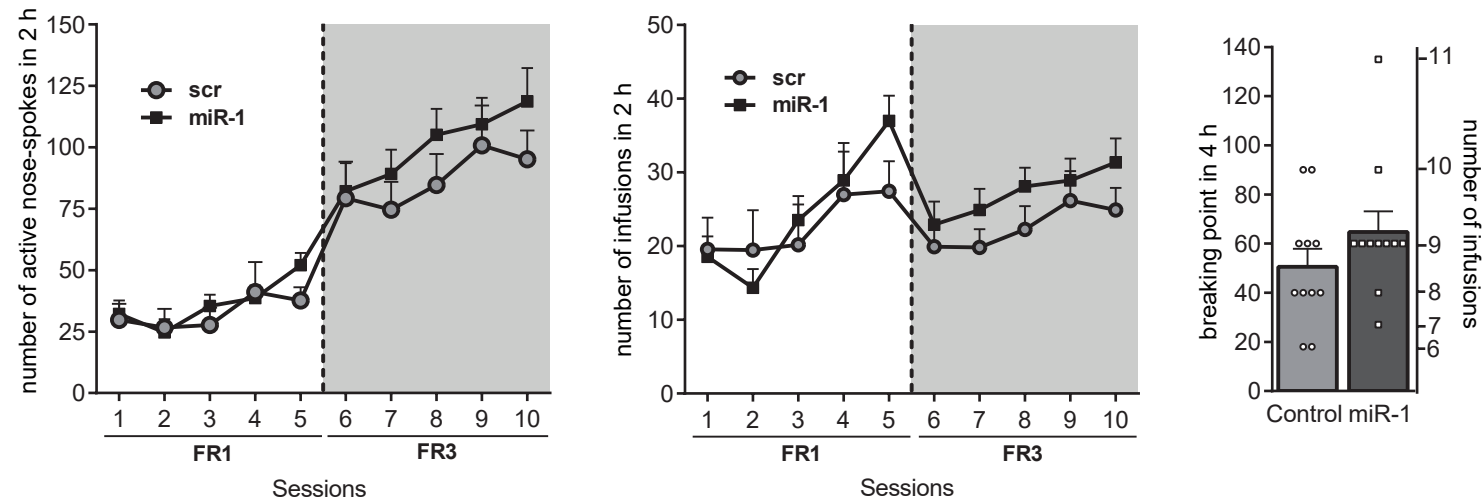
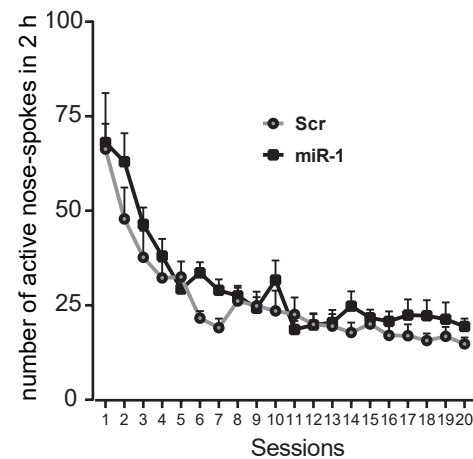


Figure 5, Forget et al.

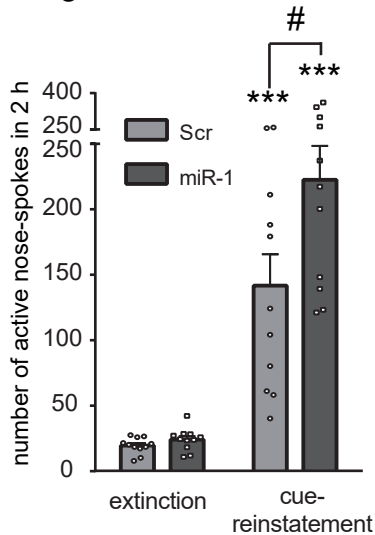
a



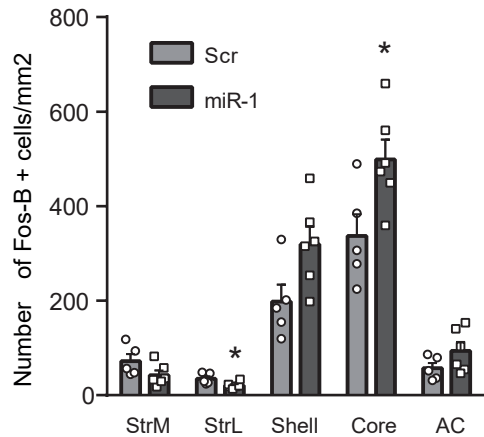
b



c



d



Supplementary Figure 1, Forget et al.

a

miRNAs	RT-primers	Forward primers	Reverse primers
SnoU6	CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCTTC	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT	CTCACACCGTGTCTTCCA
mir-1	CTCGACAAACGTCTAAATGCTTACATACTTC	CCAGTGGAGCTGGAATGTAAGAA	GCTCGACAAACGTCTAAATGCT
mir-16	CCTTTGAGGTTGGTACTACGGCGCAATAT	GTGCAGTAGCAGCACGTAAT	ACCTTTGAGGTTGGTACTACGG
mir-29b	CAAGCCCTAGTATTCTCGACAACACTGATT	AGCTCCGTATAGCACCATTGAAA	GCAAGCCCTAGTATTCTCGAC
mir-31	ACGAACGGCGTCATGTAACAGCTATGC	ACTCCGGCAAGATGCTGG	GAGTACGAACGGCGTCATGTAA
mir-32	TCTACCAACGCCAAACCTGCAACTTAG	ACGGTGGAGTATTGCATTACTA	TGTTCTACCAACGCCAAACCT
mir-124	CACCGTTCCGCGCCGTCGGTGGGCCATT	CATACCTAAGGCACGCGG	GTCGGTGGGCATTACCC
mir-125a	CCTCACAACGATTCCACAAGCACAGGTTA	GTTGATTCTCCCTGAGACCTTTA	GTCCTCACAACGATTCCACAAG
mir-128b	CATCCGGCTATGCGTATTGGAAGAGACC	TGGCGTCACAGTGAACCG	CCTCATCCGGCTATGCGTATTG
mir-132	CGGTACTGGATGACCAAGTAGCTAACGACCAT	TGGTCGATAACAGTCTACAGCC	GGTACTCGATGACCAAGTAGCCT
mir-181a	TGAACGTAACCTCGAATCCGTAACCTCCG	CGTCCAACATTCAACGCTGTC	CGTGAACGTAACCTCGAATCCGT
mir-212	GTCGGAGGAACGTAGAAGTGCCCGTG	CTCAGCTAACAGTCTCCAGTCA	ATCGTCGGAGGAACGTAGAAGT
mir-221	CCAGTCCACGATAGTCCCTTGAAACCCAG	AGTAGGAAAGCTACATTGTCTGCT	AACCAGTCCACGATAGTCCCTT
mir-223	AGGCGTCGAGCTTAATGTCGGGGTATTG	CGTAGCCCTGTCAGTTTGTCAA	TCTAGCGTCGAGCTTAATGTC
let-7d	GCTCAGACAGAAGTCACACTGAGCACTATG	GCGGGCGGAGAGGTAGT	GTCACACTGAGCACTATGCAAC
mir-206	ACGAGTTTAGAGCCGGATAGCCACACAC	GCGTTGTCTGGAATGTAAGGAAGT	TGACGAGTTTAGAGCCGGATAG

b

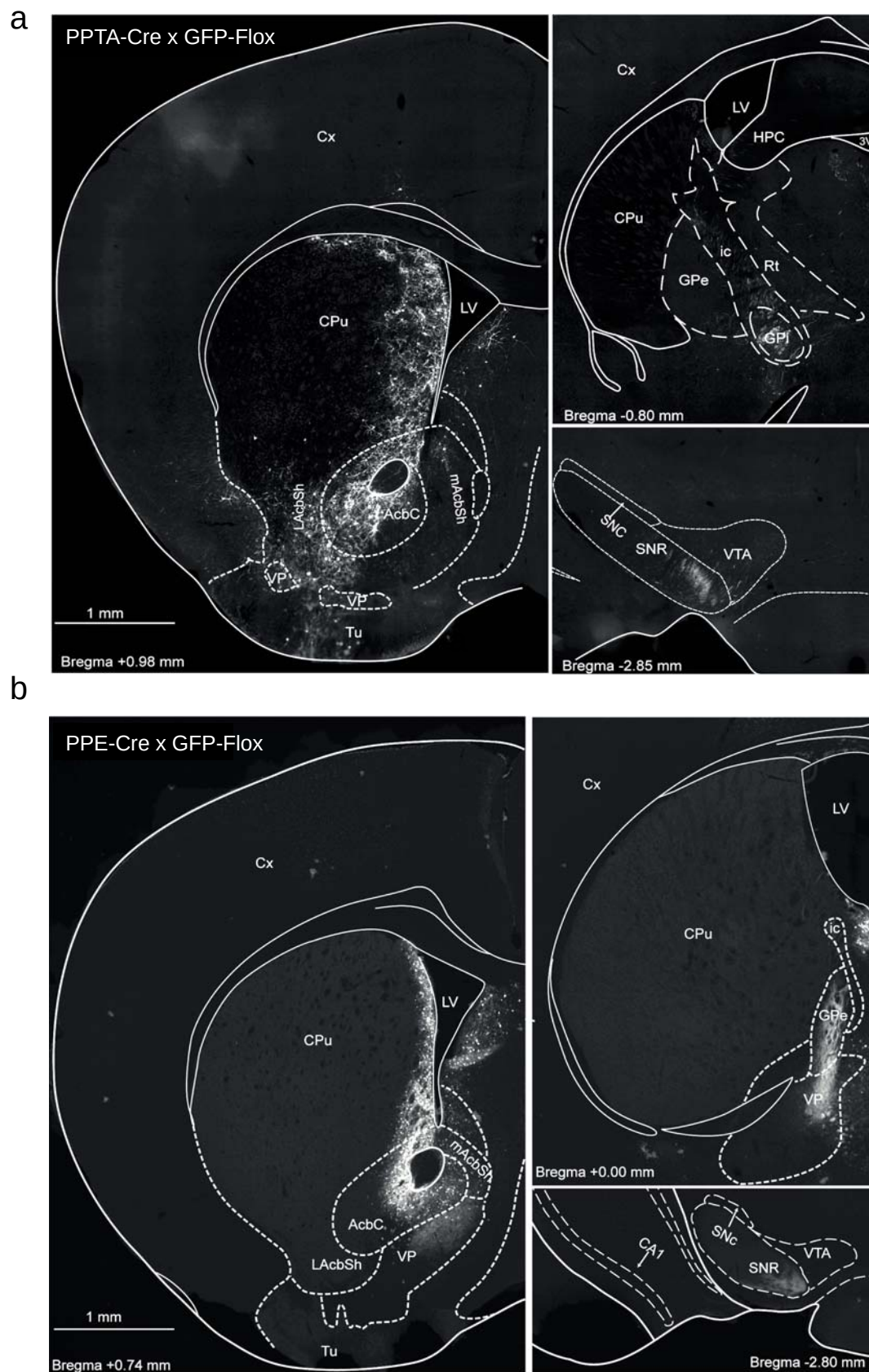
Gene	Forward primers	Reverse primers
Rpl38	AGGATGCCAAGTCTGTCAAGA	TCCTTGTCTGTGATAACCAGGG
Ppia	CAAAATGCTGGACCAACACAAACG	GTTTCATGCCTTCTTTCACCTTCCC
HPRT	CCTCACTGCTTTCCGGAGCGG	GGACTGCGGGTCCGGCATGA
TRBP	AGTCTGAGTGCAACCCCG	CTCTTGGGTACCATGTACTCT
Dicer	CCATGGCAACAAGAAGCAATTC	GCCAGTGTTCAAGCACACAAT
Ago2	AACCTGAGAAATGCCCTCGG	ATCAAACTGCGCTTCCGGT
Drosha	GCCTGTGTGGATTGCTGTGA	AATCACGGAGCCTGCTTGTG
BDNF	CAGGTGAGAAGAGTGATGACC	ATTCACGCTCTCCAGAGTCCC
FosB	GTGAGAGATTTGCCAGGGTC	AGAGAGAAGCCGTGAGTTG
NPAS4	AGGGTTTGCTGATGAGTTGC	CCCCTCCACTTCCATCTTC
Gria2	GGGAAGTAAGGAAAAGACCAGTGC	CATTGCCAAACCAAGGCCCC
Grin2b	CCTGTGTGAGAGGAAATCTCGG	GCTGGATGCCGGGGATAGAA
Gria3	CCCATGCTCTTGTGCTGCTTCTGT	AGTCCACCTATGCTGATGGTGT
PI3K	ACAGATCGACTTCAGGCGGAAAC	GGGCCACACAGGACAACTCC
DRD1	AAACCCACAAGCCCCTCTGA	GATGAATTAGCCCACCCAAAC
Mef2c	TGCTGGTCTCACCTGGTAAC	ATCCTTTGATTCACTGATGGCAT

Supplementary figure 1: sequences of the primers used for RT-QPCR analysis

a: sequences of the RT, Forward and Reverse primers used to study the expression of specific miRNAs by RT-QPCR.

b: sequences of the Forward and Reverse primers used to study the expression of specific mRNAs by RT-QPCR.

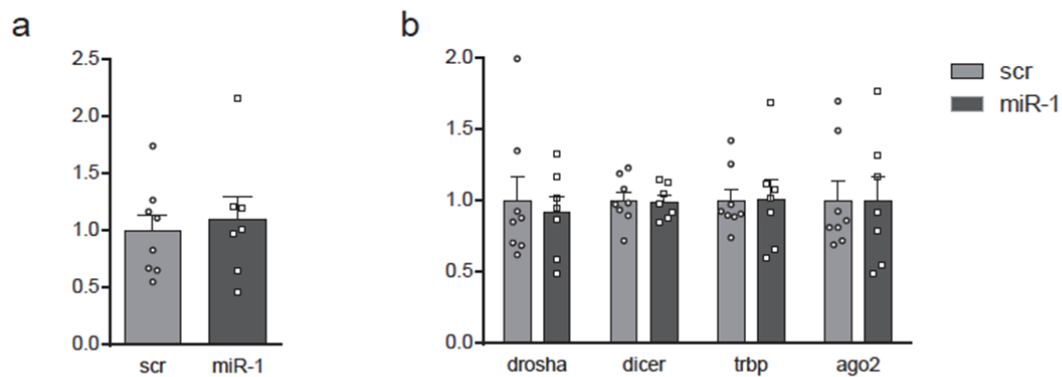
Supp Figure 2, Forget et al.



Supplementary figure 2: validation of the viral strategy for expression in D1-SPN.

C57Bl/6J mice were bilaterally injected with a combination of **a:** AAVs (AAV9-PPTA-Cre and AAV9-GFP^{flox}) that allows GFP expression in DRD1-expressing neurons. **left panel :** GFP fluorescence from AAV-infected infected neurons in the striatum. **right panel :** depicts GFP fluorescence in projection structures from the direct pathway (DRD1-expressing neurons), such as the GPi, VP, and SNR. **b)** AAVs (AAV9-PPE-Cre and AAV9-GFP^{flox}) that allows GFP expression in DRD2-expressing neurons. **left panel :** GFP fluorescence from AAV-infected infected neurons in the striatum. **right panel :** depicts GFP fluorescence in projection structures from the indirect pathway (DRD2-expressing neurons), such as the GPe, VP, and SNR. Abbreviations: LV lateral ventricle; Cx cortex; CPu *caudate putamen* (dorsal striatum); AcbC core of the *nucleus accumbens*; mAcSh medial shell of the *nucleus accumbens*; LAcbSh lateral shell of the *nucleus accumbens*; VP ventral *pallidum*; Tu olfactory tubercles; GPe external *globus pallidus*; GPi internal *globus pallidus*; ic internal capsule; RT mesencephalic reticular projection; SNR *substantia nigra pars reticulata*; SNC *substantia nigra pars compacta*; VTA ventral tegmental area. CA1 layer of the hippocampus.

Supplementary Figure 3, Forget et al.

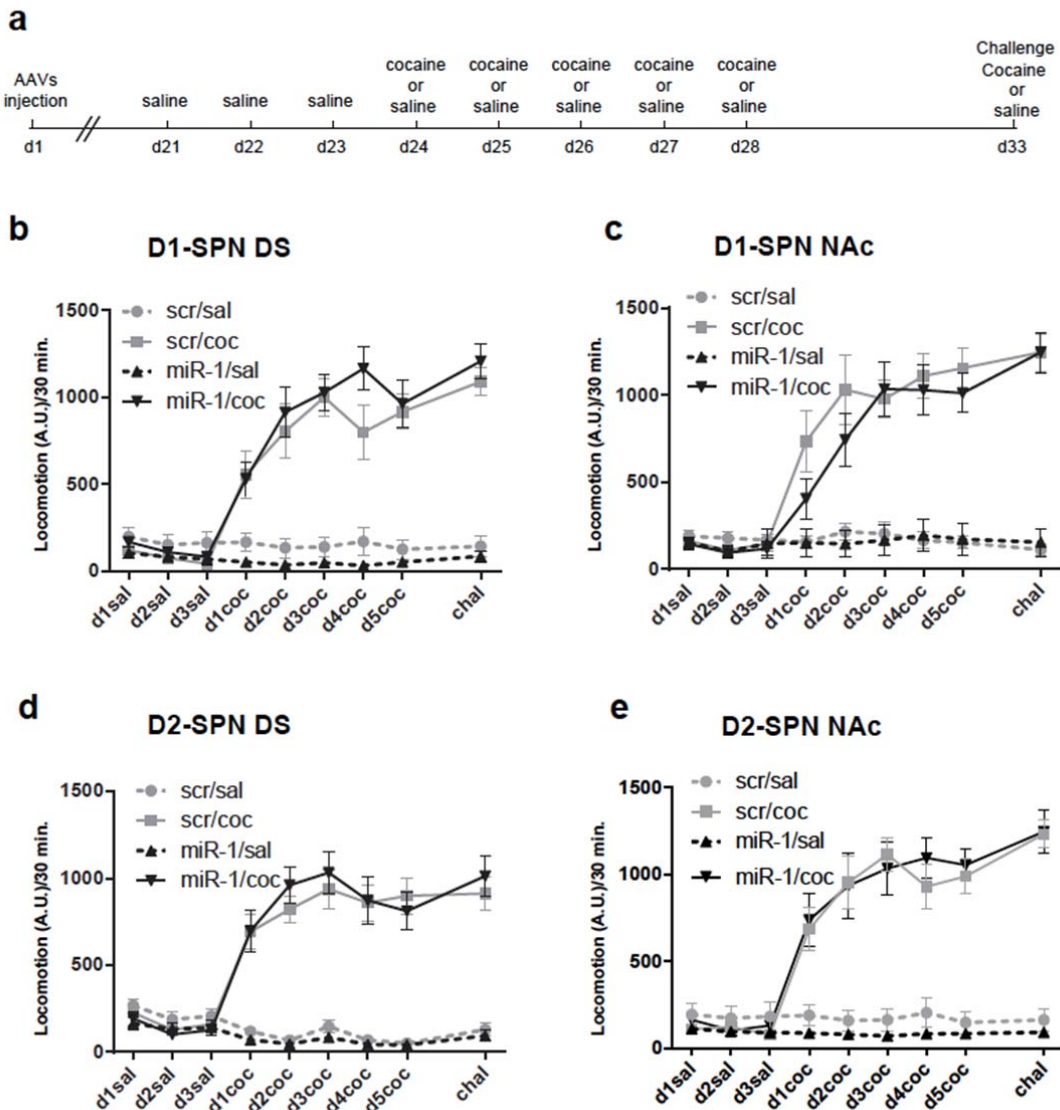


Supplementary Figure 3: miR-1 over-expression in the Dorsal Striatum did not modify the levels of miR-206 (miR-1 family) or of mRNAs involved in miRNA processing.

a: fold change in expression of miR-206 in the dorsal striatum after miR-1 or miR-Scr over-expressions in the same structure. The Mann-Whitney test revealed no significant difference between the miR-1 and scr groups (U=26.5, p=0.89, NS). Mean and SEM are represented.

b: fold change in expression of mRNAs involved in miRNA processing after miR-1 or miR-Scr over-expressions in the dorsal striatum. The Mann-Whitney tests revealed no significant effect of miR-1 overexpression (drosha: U=28, p>0.9; dicer: U=24.5, p=0.72; trbp: U=26, p=0.84; ago2: U=27, p=0.93). Mean and SEM are represented.

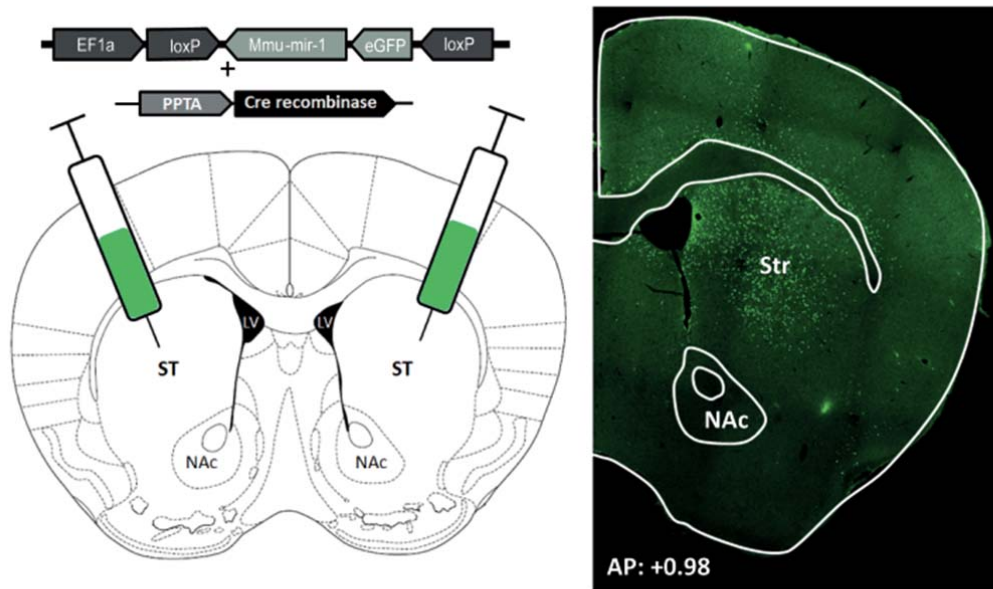
Supplementary Figure 4, Forget et al.



Supplementary Figure 4: cocaine-induced locomotor sensitization after miR-1 overexpression in D1- or D2-SPN of the DS or Nac or mice. **a)** Schematic representation of the timing of cocaine or saline administrations. **b)** cocaine-induced locomotor sensitization after miR-1 overexpression in D1-SPN of the DS. The 3-ways ANOVA performed on the locomotor activity indicated a significant effect of cocaine treatment ($F_{1,32}=116.07$, $p<0.0001$) and cocaine session ($F_{5,32}=3.27$, $p=0.0078$) but not of miR-1-overexpression ($F_{1,32}=0.05$, $p=0.94$); and no interaction ($F_{1,32}=0.28$, $p=0.6$). scr/coc: $n=10$; scr/sal: $n=8$; miR-1/coc: $n=11$; miR-1/sal: $n=7$. **c)** cocaine-induced locomotor sensitization after miR-1 overexpression in D1-SPN of the NAc. The 3-ways ANOVA performed on the locomotor activity indicated a significant effect of cocaine treatment ($F_{1,36}=55.76$, $p<0.0001$) and cocaine session ($F_{5,36}=7.6$, $p<0.0001$) but not of miR-1-overexpression ($F_{1,36}=0.38$, $p=0.54$); and no interaction ($F_{1,36}=0.34$, $p=0.56$). scr/coc: $n=12$; scr/sal: $n=8$; miR-1/coc: $n=13$; miR-1/sal: $n=7$. **d)** cocaine-induced locomotor sensitization after miR-1 overexpression in D2-SPN of the DS. The 3-ways ANOVA performed on the locomotor activity indicated a significant effect of cocaine treatment ($F_{1,30}=83.74$, $p<0.0001$) and cocaine session ($F_{5,30}=6.73$,

$p < 0.0001$) but not of miR-1-overexpression ($F_{1,30} = 0.004$, $p = 0.95$); and no interaction ($F_{1,30} = 1.29$, $p = 0.26$). scr/coc: $n = 11$; scr/sal: $n = 6$; miR-1/coc: $n = 10$; miR-1/sal: $n = 9$. **e)** cocaine-induced locomotor sensitization after miR-1 over-expression in D2-SPN of the NAc. The 3-ways ANOVA performed on the locomotor activity indicated a significant effect of cocaine treatment ($F_{1,40} = 65.4$, $p < 0.0001$) and cocaine session ($F_{5,40} = 3.2$, $p = 0.0082$) but not of miR-1-overexpression ($F_{1,40} = 0.066$, $p = 0.79$); and no interaction ($F_{1,40} = 0.32$, $p = 0.58$). scr/coc: $n = 16$; scr/sal: $n = 5$; miR-1/coc: $n = 14$; miR-1/sal: $n = 7$.

Supplementary Figure 5, Forget et al.



Supplementary Figure 5 : Schematic representation of AAVs injection for miR-1 over-expression in the DS (left panel) and representative image of a brain slice after immunostaining for Cre-recombinase (green, right panel) 24h after the test for cue-induced reinstatement of cocaine seeking (self-administration experiment).

Figures	Statistical test	results
Fig. 1b	Mann-Whitney	Left (n=4 per group): all miRNAs: U=8, p>0.99; except miR-124 (U=7, p=0.77). Right (n=5 per group): droscha (U=10, p=0.6); dicer (U=5, p=0.12); trbp (U=9, p=0.46); ago2 (U=8, p=0.35)
Fig. 1c	Mann-Whitney	Left (n=5 per group): all miRNAs: U=0, p=0.14; except miR-124 (U=4, p=0.076), miR-128b (U=2, p=0.05) and let-7d (U=10, p=0.6). Right (n=5 per group): droscha (U=8.5, p=0.71); dicer (U=9, p=0.8); trbp (U=6, p=0.33); ago2 (U=7, p=0.46).
Fig. 1e	Mann-Whitney	DS (n=5 per group): bdnf (U=8, p=0.35); fosb (U=1, p=0.016); npas4 (U=2, p=0.05); gri2 (U=9, p=0.46); grin2b (U=7, p=0.25); gri3 (U=7, p=0.25); pi3k (U=0, p=0.009); D1R (U=10, p=0.6); mef2c (U=7, p=0.46). NAc (n=5 per group): bdnf (U=2, p=0.05); fosb (U=4, p=0.14); npas4 (U=4, p=0.14); gri2 (U=4, p=0.14); grin2b (U=5, p=0.22); gri3 (U=6, p=0.32); pi3k (U=6, p=0.32); D1R (U=7, p=0.46); mef2c (U=9, p=0.8).
Fig. 2a	Mann-Whitney	Bdnf (n=4 per group; U=0, p=0.02); fosb (n=5 per group; U=0, p=0.009); npas4 (n=7 per group; U=0, p=0.0027)
Fig. 2b	Mann-Whitney	DS: mir-1 (n=11) vs mir-scr (n=12). miR-1 level: U=0, p<0.0001. bdnf: U=42.5, p=0.15; fosb: U=11, p=0.0007; npas4: U=12, p=0.0009. NAc: n=5 per group. miR-1 level: U=0, p<0.0079. bdnf: U=6, p=0.17; fosb: U=0, p=0.009; npas4: U=0, p=0.009.
Fig. 2c	Mann-Whitney	DS: n=5 per group. miR-1 level: U=0, p<0.0079. bdnf: U=6.5, p=0.39; fosb: U=3, p=0.086; npas4: U=1, p=0.027. NAc: miR-1 level (n=5 per group): U=0, p<0.0079. mir-1 (n=4) vs mir-scr (n=5): bdnf: U=5, p=0.22; fosb: U=3, p=0.086; npas4: U=2, p=0.05.
Fig. 3a	Kolmogorov Smirnov (KS) normality test	CPP index: p=0.2 for all groups, NS. Extinction: coc/scr (p=0.2, NS); coc/miR-1 (p=0.16, NS) Reinstatement index: sal/scr (p=0.2, NS) ; sal/miR-1 (p=0.2, NS) ; coc/scr (p=0.076, NS); coc/miR-1 (p=0.2, NS)
Fig. 3a	Two-way ANOVAs	CPP index: treatment ($F_{1,63} = 14.9$, $p = 0.0003$), AAV ($F_{1,63} = 0.16$, $p=0.69$, NS), interaction ($F_{1,63} = 0.34$, $p=0.56$, NS). Extinction: session ($F_{5,200}=5.43$, $p=0.0001$), AAV ($F_{5,40}=0.07$, $p=0.79$, NS), interaction ($F_{5,200}=0.41$, $p=0.84$, NS). Reinstatement index: treatment ($F_{1,63} = 6$, $p = 0.017$), AAV ($F_{1,63} = 1.57$, $p=0.21$, NS), interaction ($F_{1,63} = 1.82$, $p=0.18$, NS).
Fig. 3a	Bonferroni's multiple comparison test	CPP index: sal/scr (n=13) vs coc/scr groups (n=22): p=0.002. sal/miR-1 (n=12) vs coc/miR-1 (n=20) : p=0.026. Reinstatement index: sal/scr (n=13) vs coc/scr groups (n=22): p=0.0078. sal/miR-1 (n=12) vs coc/miR-1 (n=20) : p=0.45, NS.
Fig. 3b	KS normality test	miR-1 level: sal/scr (p=0.04), sal/miR-1 (p=0.0004), coc/scr (p=0.0024), coc/miR-1 (p=0.0082).
Fig. 3b	Kruskal-Wallis	miR-1 level: sal/scr (n=13), sal/miR-1 (n=12), coc/scr (n=22), coc/miR-1 (n=20). Group effect: p<0.0001
Fig. 3b miR-1 levels	Dunn's multiple comparison test	sal/scr vs coc/scr: p>0.99, NS; coc/scr vs coc/miR-1 : p<0.0001; sal/scr vs sal/miR-1: p=0.0007.
Fig. 3b target levels	Kruskal-Wallis	sal/scr (n=11), sal/miR-1 (n=4), coc/scr (n=10), coc/miR-1 (n=10). Npas4: group effect: p=0.001. Fosb: group effect: p=0.0063.
Fig. 3b target levels	Dunn's multiple comparison test	sal/scr vs coc/scr : npas4: p=0.0147; fosb: p=0.028. coc/scr vs coc/miR-1 : npas4: p=0.0026; fosb: p=0.012.
Fig. 3c	KS normality test	CPP index: p=0.2 for all groups, NS. Extinction: p=0.2 for all groups, NS. Reinstatement index: sal/scr (p=0.16, NS); sal/miR-1 (p=0.2, NS); coc/scr (p=0.2, NS); coc/miR-1 (p=0.2, NS).
Fig. 3c	Two-way ANOVAs	CPP index: treatment ($F_{1,39} = 10.35$, $p = 0.0026$), AAV ($F_{1,39} = 0.15$, $p=0.69$, NS), interaction ($F_{1,39} = 0.001$, $p=0.97$, NS). Extinction: session ($F_{5,110}=0.8$, NS), AAV ($F_{1,22}=0.12$, $p=0.73$, NS), interaction ($F_{5,110}=0.67$, $p=0.65$, NS). Reinstatement index: treatment ($F_{1,39} = 10.41$, $p = 0.0025$), AAV ($F_{1,39} = 0.084$, $p=0.77$, NS), interaction ($F_{1,39} = 0.066$, $p=0.8$, NS).
Fig. 3c	Bonferroni's multiple	CPP index: sal/scr (n=10) vs coc/scr groups (n=11): p=0.027. sal/miR-1 (n=9) vs coc/miR-1 (n=13) : p=0.03.

	comparison tests	Reinstatement index: sal/scr (n=10) vs coc/scr groups (n=11): p=0.019. sal/miR-1 (n=9) vs coc/miR-1 (n=13) : p=0.04.
Fig. 4a	KS normality tests	CPP index: p=0.2 for all groups, NS. Extinction: p=0.2 for all groups, NS. Reinstatement index: sal/scr (p=0.2, NS) ; sal/miR-1 (p=0.2, NS) ; coc/scr (p=0.16, NS); coc/miR-1 (p=0.2, NS).
Fig. 4a	Two-way ANOVAs	CPP index: treatment ($F_{1,36} = 9.92$, $p = 0.0033$), AAV ($F_{1,36} = 0.035$, $p=0.85$, NS), interaction ($F_{1,36} = 0.16$, $p=0.39$, NS). Extinction: session ($F_{5,95}=2.63$, $p=0.028$), AAV ($F_{1,19}=0.029$, $p=0.86$, NS), interaction ($F_{5,95}=2.07$, $p=0.075$, NS). Reinstatement index: treatment ($F_{1,36} = 15.48$, $p = 0.0004$), AAV ($F_{1,36} = 0.86$, $p=0.36$, NS), interaction ($F_{1,36} = 0.72$, $p=0.4$, NS).
Fig. 4a	Bonferroni's multiple comparison tests	CPP index: sal/scr (n=10) vs coc/scr groups (n=11): p=0.048. sal/miR-1 (n=9) vs coc/miR-1 (n=13) : p=0.022. Reinstatement index: sal/scr (n=10) vs coc/scr groups (n=11): p=0.028. sal/miR-1 (n=9) vs coc/miR-1 (n=13) : p=0.003.
Fig. 4b	KS normality tests	CPP index: p=0.2 for all groups, NS. Extinction: p=0.2 for coc/scr, NS; p=0.16 for coc/miR-1, NS. Reinstatement index: sal/scr (p=0.2, NS) ; sal/miR-1 (p=0.2, NS) ; coc/scr (p=0.085, NS); coc/miR-1 (p=0.2, NS).
Fig. 4b	Two-way ANOVAs	CPP index: treatment ($F_{1,33} = 27.8$, $p<0.0001$), AAV ($F_{1,33} = 0.17$, $p=0.68$, NS), interaction ($F_{1,33} = 0.52$, $p=0.48$, NS). Extinction: session ($F_{5,90}=4.92$, $p=0.0005$), AAV ($F_{1,18}=0.05$, $p=0.83$, NS), interaction ($F_{5,90}=0.7$, $p=0.62$, NS). Reinstatement index: treatment ($F_{1,33} = 11.658$, $p = 0.0017$), AAV ($F_{1,33} = 0.94$, $p=0.34$, NS), interaction ($F_{1,33} = 0.03$, $p=0.86$, NS).
Fig. 4b	Bonferroni's multiple comparison tests	CPP index: sal/scr (n=9) vs coc/scr groups (n=10): p=0.0025. sal/miR-1 (n=8) vs coc/miR-1 (n=10) : p=0.0002. Reinstatement index: sal/scr (n=9) vs coc/scr groups (n=10): p=0.026. sal/miR-1 (n=8) vs coc/miR-1 (n=10) : p=0.018.
Fig. 5a	KS normality tests	Active nose spikes: p=0.13 for control (n=11), NS; p=0.2 for miR-1 (n=11), NS. Infusions: p=0.2 for both groups, NS. Breaking point: p=0.19 for control, NS; p<0.0001 for miR-1.
Fig. 5a	Two-way ANOVAs	Active nose spikes: session ($F_{9,180} = 37.9$, $p<0.0001$), AAV ($F_{1,20} = 0.81$, $p=0.38$, NS), interaction ($F_{9,180} = 0.72$, $p=0.69$, NS). Infusions: session ($F_{9,180}=5.47$, $p<0.0001$), AAV ($F_{1,20}=0.72$, $p=0.4$, NS), interaction ($F_{9,180}=1.01$, $p=0.43$, NS).
Fig. 5a	Mann-Whitney	Breaking point: n=11 per group. Control vs miR-1: $U=41.5$, $p=0.19$, NS.
Fig. 5b	KS normality test	Extinction: p=0.2 for control (n=11), NS; p=0.16 for miR-1 (n=11), NS.
Fig. 5b	Two-way ANOVAs	Extinction: session ($F_{19,380} = 24.5$, $p<0.0001$), AAV ($F_{1,20} = 1.4$, $p=0.25$, NS), interaction ($F_{19,380} = 0.86$, $p=0.63$, NS).
Fig. 5c	KS normality test	Extinction: p=0.2 for control (n=11), NS; p=0.19 for miR-1 (n=11), NS. Cue-reinstatement: p=0.2 for both group, NS.
Fig. 5c	Two-way ANOVAs	Cue reinstatement ($F_{1,20} = 84.3$, $p<0.0001$), AAV ($F_{1,20} = 5.62$, $p=0.028$), interaction ($F_{1,20} = 4.78$, $p=0.04$).
Fig. 5c	Bonferroni's multiple comparison tests	Extinction vs cue: reinstatement: p=0.0003 (scr, n=11); p<0.0001 (miR-1, n=11) Control vs miR-1: p=0.17 (extinction, NS); p=0.033 (cue-reinstatement).
Fig. 5d	Mann-Whitney	Scr (n=5) vs miR-1 (n=6): StrM ($U=6$, $p=0.01$, NS); StrL ($U=3$, $p=0.028$); Shell ($U=5$, $p=0.068$, NS); Core ($U=4$, $p=0.045$); AC ($U=7$, $p=0.14$, NS).

Table 1 : summary of statistical tests in each principal figures.

Supplementary MATERIALS AND METHODS

Animals and drug treatments

Male 7-week old wild-type C57Bl/6J mice (Janvier Lab or Charles River lab for the self-administration study) were housed in a temperature- and humidity -controlled ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $55 \pm 10\%$) room with *ad-libitum* access to food and water. Cocaine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo., USA, ref: C5776) and dissolved in a saline solution (0.9% NaCl w/v). For the self-administration study, mice were tested during the dark phase of a reverse light cycle (lights off at 8.00 a.m and on at 20.00 p.m). All experimental protocols were performed in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive 2010/63/EU and approved by the local ethical committee (Comitè Ètic d'Experimentació Animal-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, CEEA-PRBB). In agreement, maximal efforts were made to reduce the suffering and the number of mice used.

For the stereotaxic and intravenous catheter implantation surgeries, ketamine hydrochloride (Imalgène; Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and medetomidine hydrochloride (Domtor; Esteve, Barcelona, Spain) were mixed and dissolved in sterile 0.9% physiological saline and administered intraperitoneally in a volume of 10 ml/kg of body weight. Atipamezole hydrochloride (Revertor; Virbac, Barcelona, Spain) and Meloxicam (Metacam; Boehringer Ingelheim, Rhein, Germany) were dissolved in sterile 0.9% physiological saline and administered subcutaneously in an injection volume of 10 ml/kg of body weight.

Gentamicine (Genta-Gobens; Laboratorios Normon, S.A., Madrid, Spain) was dissolved in sterile 0.9% physiological saline and administered intraperitoneally in an injection volume of 10 ml/kg of body weight.

Sub-chronic cocaine treatment

Before the experiment, mice ($n = 5/\text{group}$) were handled daily during 5 days and habituated to intraperitoneal (i.p.) injections with i.p. saline (NaCl 0.9%) injections for two consecutive days. Mice were then injected i.p. with saline or cocaine in their home cage (20 mg/kg, diluted in saline vehicle) once daily for five consecutive days followed by one challenge i.p. injection 5 days later, to mimic the course of a behavioral sensitization protocol. Animals were euthanized 1 h after the last injection, and brains were flash-frozen in liquid nitrogen for subsequent biochemical analyses.

Stereotaxic injections:

Mice were anesthetized using ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively). In addition, mice received an intraperitoneal injection of gentamicine (1 mg/kg) along with subcutaneous administration of the analgesic meloxicam (2 mg/kg). Mice were then placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA) under sterile conditions, with verification that the skull was horizontal. An incision was made over the skull, thus the skull was surgically exposed, the periosteum removed, and burr holes were subsequently drilled with the size of the guide cannula. All the viral injections were made through a bilateral injection cannula (33-gauge internal cannula, Plastics One, UK) connected to a polyethylene tubing (PE-20, Plastics One, UK) attached to a 10 μl microsyringe (Model 1701 N SYR, Cemented NDL, 26 ga, 2 in, pointstyle 3, Hamilton company, NV). The displacement of an air bubble inside the length of the polyethylene tubing that connected the syringe to the injection needle was used to monitor the microinjections. The target volume of 1 μl in the NAc or 2 μl in the dorsal striatum was injected at a constant rate of 0.20 $\mu\text{l}/\text{min}$ during 10 min by using a microinfusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA). After infusion, the injection cannula was left in place for an additional period of 5 min to allow the fluid to diffuse and to prevent reflux, and then it was slowly withdrawn during 5 additional min. Animals were kept on a 37 °C heating pad

during the surgery, and until recovery from anesthesia. The verification of viral vector injection site was performed by measurement of miR-1 expression or by immunofluorescence after the self-administration experiment, where the injection sites were verified under a confocal microscope by an experimenter blind to the AAV. Mice with injection location outside of the target area were excluded from the results.

Quantitative PCR analysis (qPCR) of miRNA and mRNA levels

The specificity of the reaction was verified by melt curve analysis. Individual data were normalized using a combination of three housekeeping genes (*Ppia*, *HPRT* and *Rpl38*) for mRNA levels, and using *snoU6* for miRNA levels. The results are reported as fold changes calculated as the ratios of normalized gene expression data for drug-treated groups in comparison to the control group. All mRNA primers were designed using Primer3 software and target specificity was assessed using NCBI Primer-BLAST. miRNA primers were designed according the method described in [1]. All primers were purchased from EuroGenTech.

Luciferase assay to assess the interaction between miR-1 and the 3'UTR of *bdnf*, *fosB* and *npas4* in HEK cells:

1×10^4 HEK cells per well (96-well plates) have been plated in 50 μ l culture medium (DMEM, high glucose, GutaMAX™ 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin) from a sub-confluent HEK293T cell suspension (cell density $< 1.3 \times 10^5$ cells/cm²). 3 wells have been plated for each condition to produce triplicates (conditions included a miRNA negative control which does not target the 3'UTRs). For 1 well, 300 ng of pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vectors have been diluted in 25 μ l of pure DMEM in combination

with miRNA Mimics at a final concentration of 20 nM with 0.5 µl of Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) diluted in 25 µl of pure DMEM. The transfection complexes have been incubated 20 min at room temperature and added to the well containing plated cells in 50 µl medium (after 8 h in culture). The transfected cells have been incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 48 h without medium change. After 48h, the volume of the medium left in one well has been measured by pipetting and the appropriate amount of medium has been discarded to reduce the volume to 50 µl from the well. 50 µl of Dual-Glo® Luciferase Reagent (Promega Corporation) has been added to each well (equal volumes). The Incubation lasted 10 min in the dark at room temperature. The firefly luciferase activity was then measured using the luminometer (FLUOstar Omega Microplate Reader - BMG LABTECH). 50 µl of Dual-Glo® Stop&Glo® Reagent (Promega Corporation) was then added to each well and the incubation lasted 10 min in a dark room. The Renilla luciferase activity was then measured using the luminometer.

Cocaine-induced locomotor sensitization:

The locomotor activity was evaluated using a circular corridor (4.5 cm width, 17 cm external diameter) in a low luminosity environment with four infrared beams placed at every 90° (Imetronic, Pessac, France). Mice were handled and habituated to the test apparatus and procedures for 3 consecutive days before the actual experiments. In these 60-min sessions mice received saline injection 30 min after being placed in the apparatus. For developing locomotor sensitization, mice were injected daily with saline or cocaine (15 mg/kg, I.P.) for 5 consecutive days in the actimeter. Locomotor activity was counted when animals interrupted two adjacent beams and, thus, had traveled 1/4 of the circular corridor. It was measured by 5 min intervals and cumulative counts were taken for data analysis. Locomotor activity was measured as follows: spontaneous activity during 30 min and locomotor activity after

injection of cocaine during 30 min. The maintenance of locomotor sensitization was evaluated by performing a last cocaine injection after 5 days of withdrawal (day 10).

Cocaine-induced Conditioned place preference (CPP) and relapse:

-Acquisition and expression of cocaine-induced CPP: The CPP protocol included three different phases, all sessions lasted 20 min. (1) In the preconditioning phase, mice were allowed to explore both chambers. There was no preference for one of the two compartments in any experiment. (2) In the conditioning phase the treatments were randomly assigned between chambers (unbiased procedure). Mice (two-pairing protocol, two sessions per day) were injected with saline in the morning session and cocaine (15 mg/kg, i.p.) or saline in the afternoon session. (3) The postconditioning (test) phase was conducted the day after the last conditioning session, exactly as the preconditioning phase with free access to both chambers. Data were expressed as the difference between cocaine-paired chamber minus vehicle-paired chamber during preconditioning and postconditioning.

-Extinction of the cocaine-induced CPP: Mice underwent extinction training once daily for a minimum of 6 days (8 ± 1.5 days). The extinction training was the same as the test phase but with saline injection. Data were expressed as the time spent in the cocaine-paired chamber minus the time spent in the saline-paired chamber. The criterion for extinction was two consecutive sessions without significant CPP.

-Reinstatement of the cocaine-induced CPP: After the extinction training, mice received an injection of saline (for the control groups) or cocaine (15 mg/kg, i.p.), immediately before being placed in the apparatus. Data were expressed as the difference between cocaine-paired chamber minus vehicle-paired chamber during the mean of the last 2 extinction sessions and the reinstatement test.

Self-administration study

Operant self-administration apparatus

The self-administration experiments were conducted in mouse operant chambers (Model ENV-307A-CT; Med Associates Inc., Georgia, VT, USA) equipped with two holes, one randomly selected as the active hole and the other as the inactive hole. The chambers were made of aluminum and acrylic, with grid floors and were housed in sound- and light-attenuated boxes equipped with fans to provide ventilation and white noise. Pump noise and stimuli lights (cues), one located inside the active hole and the other above it, were paired contingently with the delivery of the reinforcer. Cocaine was infused via a syringe that was mounted on a microinfusion pump (PHM-100A; Med Associates) and connected, via Tygon tubing (0.96 mm o.d., Portex Fine Bore Polythene Tubing, Portex Ltd, Kent, UK) to a single-channel liquid swivel (375/25, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) and to the mouse intravenous catheter. The swivel was mounted on a counter-balanced arm above the operant chamber.

Operant self-administration of cocaine

Mice were anesthetized with a ketamine (75 mg/kg)/medetomidine (1 mg/kg) mixture then implanted with indwelling intravenous silastic catheters. After surgery of mice, anesthesia was reversed by subcutaneous injection of the synthetic $\alpha 2$ adrenergic receptor antagonist, atipamezole (2.5 mg/kg) indicated for the reversal of the sedative and analgesic effects of medetomidine ($\alpha 2$ adrenergic receptor agonist).

Responses on the inactive hole and all responses elicited during the 10-s timeout period were also recorded. Cocaine was infused in 23.5 μ l over 2 s (0.5 mg/kg per injection,

intravenously). The criteria for self-administration behavior were achieved when all of the following conditions were met: (1) mice maintained stable, responding with 20% deviation from the mean of the total number of reinforcers earned in three consecutive sessions (80% of stability); (2) at least 75% of mice responding on the active hole; and (3) a minimum of 10 reinforcers per session. The criterion for extinction was achieved when, during 3 consecutive sessions, mice completed a mean number of nose pokes in the active hole consisting of 30% of the mean responses obtained during the 3-day period to achieve the acquisition criteria for cocaine self-administration training. The reinstatement criterion was achieved when nose pokes in the active hole were double the number of nose pokes in the active hole during the 3 consecutive days when the mice acquired the extinction criteria.

Each 2-h daily self-administration session started with a priming injection of the drug. The cue light, located above the active hole, was paired with the delivery of the reinforcer. Mice (Control $n = 11$; miR-1 $n = 11$) were trained under a fixed ratio 1 schedule of reinforcement (FR1) over 5 consecutive daily sessions and under a fixed ratio 3 (FR3) over 5 consecutive daily sessions. The timeout period after infusion delivery was 10 s. Mice were then tested under a progressive ratio (PR) schedule of reinforcement that lasted 4 h and where the response requirement to earn the cocaine escalated according to the following series: 1–2–3–5–12–18–27–40–60–90–135–200–300–450–675–1000. On day 12, mice were moved to the extinction phase where cocaine was not available and cue-light was not presented. Mice were given 2-h daily sessions until they achieved the extinction criterion. On day 32, all mice were tested under reinstatement induced by a cue during a 2-h session. The test for cue-induced reinstatement was conducted under the same conditions used in the training phase except that cocaine was not available.

Tissue preparation for immunofluorescence experiments

Mice were deeply anesthetized by i.p. injection (0.2 ml/10 g of body weight) of mixture of ketamine/medetomidine prior to intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Na₂HPO₄/ 0.1 M NaH₂PO₄ buffer (PB), pH 7.5, delivered with a peristaltic pump at 30 ml per min for 2 min. For immunofluorescence, brains were extracted and post-fixed with 4% PFA for 24 h. Coronal sections (30 µm) were performed on a vibratome.

For the immunofluorescence experiment performed after the cocaine-SA experiment (cre-recombinase), brains were extracted and post-fixed with 4% PFA for 24 h and transferred to a solution of 30% sucrose at 4 °C. Coronal frozen sections (30 µm) of the whole dorsal striatum were obtained on a freezing microtome and stored in a 5% sucrose solution at 4°C until use

„

Immunofluorescence experiments

Free-floating slices were rinsed in 0.1 M PB, blocked in a solution containing 3% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 in 0.1M PB (NGS-T-PB) at room temperature for 2 h, and incubated overnight at 4°C in the same solution with the primary antibody to anti-Cre-recombinase (1:500, mouse, MAB3120, Merck Millipore). The next day, after 3 rinses in 0.1 M PB, sections were incubated with the secondary antibody AlexaFluor-488 donkey anti-mouse (1:500, Life Technologies) at room temperature in NGS-T-PB for 2 h. After incubation, sections were rinsed and mounted immediately after onto glass slides coated with gelatine in Fluoromount mounting medium. For the analyze of Fos-B expression, free-floating brain sections were incubated 20 min at room temperature in a solution of TBS containing 0.3% Triton X-100 and then incubated 1h in a blocking solution containing 5% BSA and 0.3% Triton X-100. Brain sections were then incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-FosB antibody (Invitrogen Ma5-15056) at 1:500 dilution in TBS. The sections were incubated 2 h at room temperature with Alexa fluor 594-conjugated anti-rabbit secondary antibody

(Jackson ImmunoResearch) at 1:500 dilution and mounted using Prolong® Gold (ThermoFisher scientific).

The images for Fos-B expression were acquired using Macro-ApoTome (Zeiss) with a 80x objective. Images were saved with Zen software and the number of Fos-B positive nuclei was automatically counted with the spot detector module of ICY software (Institut Pasteur, Paris, France). This program makes possible to select and count cells automatically without experimenter bias (counts were conducted without knowledge of the group assignments). In each coronal section, we sampled both ipsi- and contralateral regions separately and then averaged the density of the spots for each structure per animal. The results were expressed as number of Fos-B positive cell per square millimeter of cerebral tissue.

Image analysis

The sections of the brain with Cre-recombinase staining were analyzed with Leica TCS SP5 CFS (fixed stage) upright confocal microscope with two non-descanned HyD detectors. The images of Cre-recombinase staining were processed using the ImageJ analysis software.

Supplementary reference

- 1 Wang X. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *Rna*. 2009;15(4):716-23.



Chapter 20

Unraveling the Functions of Endogenous Receptor Oligomers in the Brain Using Interfering Peptide: The Example of D1R/NMDAR Heteromers

Andry Andrianarivelo, Estefani Saint-Jour, Pierre Trifilieff, and Peter Vanhoutte

Abstract

Decoding signaling pathways in different brain structures is crucial to develop pharmacological strategies for neurological diseases. In this perspective, the targeting of receptors by selective ligands is one of the classical therapeutic strategies. Nonetheless, this approach often results in a decrease of efficiency over time and deleterious side effects because physiological functions can be affected. An emerging concept has been to target mechanisms that fine-tune receptor signaling, such as heteromerization, the process by which physical receptor–receptor interaction at the membrane allows the reciprocal modulation of receptors' signaling. Because of the central role of the synergistic transmission mediated by dopamine (DA) and glutamate (Glu) in brain physiology and pathophysiology, heteromerization between DA and Glu receptors has received a lot of attention. However, the study of endogenous heteromers has been challenging because of the lack of appropriate tools. Over the last years, progress has been made in the development of techniques to study their expression in the brain, regulation and function. In this chapter, we provide a methodological framework for the design and use of interfering peptides to study endogenous receptor oligomers through the example of the dopamine type 1 receptor (D1R) and the GluN1 subunit of NMDA receptor heteromers.

Key words Oligomers, Protein–protein interaction, Interfering peptide, Heteromerization, Dopamine receptor, NMDA receptor

1 Introduction

In mammals, many brain structures involved in fundamental physiological functions, ranging from motor coordination, cognition, learning and memory to goal-directed behavior, are the targets of imbricated and convergent dopamine (DA) and glutamate projections. As a witness of the crucial role played by dopamine-mediated modulation of excitatory glutamate transmission in these brain regions, an imbalance of dopamine and glutamate transmissions has been incriminated in a vast array of neurological or psychiatric disorders, such as Parkinson's and Huntington's diseases, schizo-

phrenia, depression, obsessive compulsive disorders, or addiction [1–6]. Based on these observations, current treatments for the aforementioned pathological conditions primarily aim at targeting cognate neurotransmitter receptors but the loss of therapeutic efficacy over time as well as the appearance of severe deleterious side effects calls for alternative strategies. Intracellular signaling pathways recruited downstream from individual DA and Glu receptors stimulation are imperative for physiological cell responses and normal brain functions. Therefore, the targeting of molecular mechanisms specifically involved in dopamine–glutamate interactions, rather than the targeting of the receptors themselves, appears as an alternative strategy. This approach holds great potential to pave the way for new therapeutic avenues [7–9].

DA and glutamate receptors of the NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid) subtype mutually modulate their functions. This synergy takes place through mechanisms involving the recruitment of specific signaling cascades but their direct physical interactions (i.e., heteromerization or oligomerization) progressively appear as a complementary mechanism by which these receptors can reciprocally finely tune their functions and trafficking [10–18].

Receptor oligomers in general possess pharmacological and functional properties that are distinct from individual component receptors and allow a spatiotemporal modulation of the receptors' functions. For these reasons, heteromers have been the subject of intense research and, in particular, a number of studies showed the critical role of the physical interaction between DA and NMDA receptor in vitro for the modulation of their subcellular distribution and functions [7, 11, 19–21].

Until the past few years, the existence and roles of endogenous heteromers in the brain were still under debate, mostly due to a lack of mechanistic understanding of the heteromerization process and appropriate tools. The emergence of techniques such as the proximity ligation assay (see [22, 23]) now allows the detection of endogenous receptor heteromers in their native environment from fixed tissues and confirmed their presence in the brain [7, 24–26]. To study the functional roles of receptor heteromers, one option that emerged was to develop bivalent compounds that are capable of preferentially targeting a receptor when it forms an heteromer, rather than the receptor on its own, as validated for the heteromers formed by DA type 2 (D2R) and adenosine A2 (A2R) receptors [27]. As an alternative, the precise characterization of protein–protein interaction domains required for the formation of heteromers offers the possibility of using peptidic sequences designed to interfere with endogenous receptor heteromer formation through a competition mechanism. This is particularly applicable to DA and NMDA receptors, thanks to the seminal work from Dr. Fang Liu and others, which led to the characterization of short sequences in DAR and NMDAR subunits that are essential for the interaction of

D1R with either GluN1 or GluN2A or D2R with GluN2B subunits [10, 11, 14].

Based on the knowledge of the interaction domains involved in the binding of D1R to the obligatory subunit of NMDAR GluN1 [10, 13], we developed an interfering peptide-based strategy to alter D1R/GluN1 heteromerization, while preserving the functions of individual component receptors. Using this strategy, we demonstrated that D1R/GluN1 heteromers appear as a molecular bridge linking DA to the facilitation of NMDAR-mediated currents and NMDAR-dependent targeting of the Extracellular signal-regulated kinase (ERK) downstream from D1R and NMDAR. We also demonstrate that the recruitment of D1R to NMDAR was mandatory for long-term potentiation in the striatum as well as for some adaptations induced by exposure to cocaine [18].

Through the example of D1R/GluN1 heteromers, we propose in this chapter to provide a comprehensive and generally applicable methodological framework for the use of interfering peptides, and appropriate controls, to study the specific roles of endogenous receptor oligomers in the brain.

2 Methods

2.1 Design of Cell-Penetrating Interfering Peptide Sequence to Disrupt D1R/GluN1 Heteromers, While Preserving the Functions of Individual D1R and NMDAR

As a general statement, when the interaction domains between two proteins have been characterized in both partners, two peptides can potentially disrupt their interaction. A peptide corresponding to the region of the protein A that binds a protein B or the region of protein B interacting with protein A (Fig. 1a). A priori, these two strategies should yield a disruption of the binding of both partners; however, the functional consequences on downstream signaling may be different, and even opposite.

The interaction between D1R and the GluN1 subunit of NMDAR involves identified domains located within the intracellular c-terminus ends of both receptors: the t2 domain (L³⁸⁷-L⁴¹⁶) of D1R and the C1 cassette (D⁸⁶⁴-T⁹⁰⁰) of GluN1 [10, 11] (Fig. 1b). Synthetic peptides corresponding to the t2 domain of D1R [15, 17] (Fig. 1c) or the C1 cassette of GluN1 [18] (Fig. 1d) have thus been used to study D1R/GluN1 functions in the brain.

These two strategies led to an efficient disruption of D1R/GluN1 complexes [10, 11, 18]. When using the peptide corresponding to the C1 cassette of GluN1, we observed a slight decrease of basal ERK activity and a complete blockade of ERK activation downstream from D1R and NMDAR (Fig. 2a). By contrast, we found that the interfering peptide corresponding to the t2 domain of D1R induced per se an increase of NMDAR-mediated activation of the ERK pathway and was not able to significantly diminish the increase of ERK activity induced by a co-stimulation of D1R and NMDAR of cultured neurons (Fig. 2b). These discrepancies

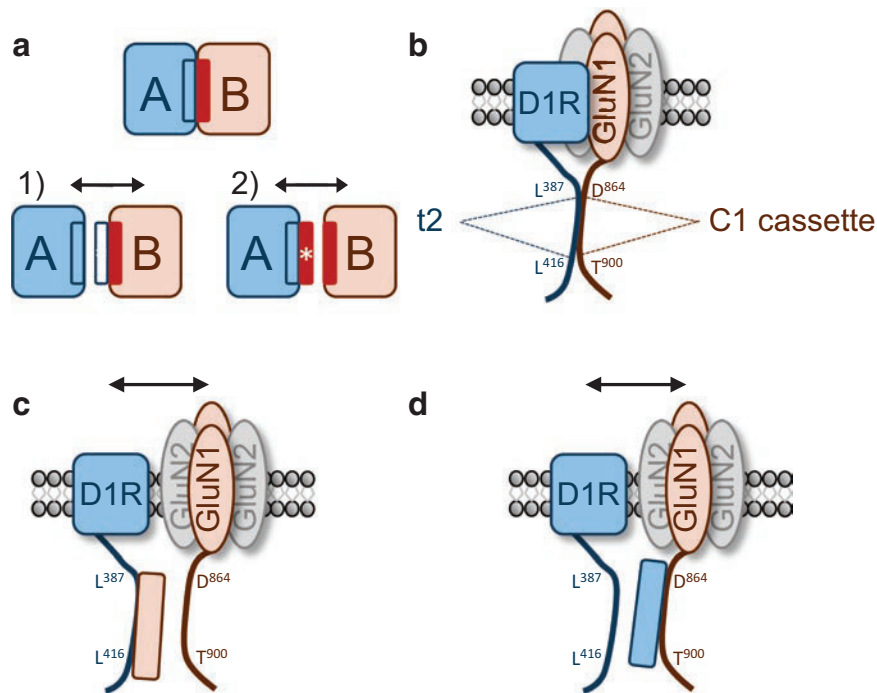


Fig. 1 Interfering peptides used to disrupt D1R/GluN1 heteromer formation (a) General diagram depicting the two strategies that can be used to disrupt the interaction between proteins A and B when the interaction domains (dark blue/red) are identified within both proteins. Panels (1) and (2) illustrate the mechanisms of action of both possible synthetic interfering peptides (*). Schematic representation of the mechanisms of action of the synthetic peptide corresponding to (c) the C1 cassette (GluN1C1*) that binds to D1R (c) [18] or (d) the t2 domain of D1R (t2*), which interacts with GluN1 (c) used in [15, 17]

between the two strategies could be attributed to the fact that the t2 peptide, and not the C1 mirror peptide, may compete with the binding of the protein Calcium Calmodulin, which constitutively inhibits NMDAR through interaction domains comprising a portion of the C1 cassette [28] (see **Note 1**). It is also possible that the binding of the t2 peptide at the receptor by itself mimics heteromerization with D1R, exerting an effect as an allosteric modulator of the NMDAR. This could explain why studies using these two strategies yielded opposing results regarding the role of D1R/GluN1 on (ERK-dependent) long-term neuronal plasticity [15, 17, 18]. Since we verified that the C1 cassette was able to disrupt heteromer formation without interfering with functions of individual D1R and NMDAR (see below), we pursued our work using the peptide GluN1C1 to selectively interfere with D1R/GluN1 formation and functions.

To achieve intracellular delivery of the GluN1C1 peptide we fused it to the trans-activating transcriptional activator sequence (TAT; sequence: GRKKRRQRRR) (see **Note 2**). A “spacer,” which is composed of two proline residues, has been added

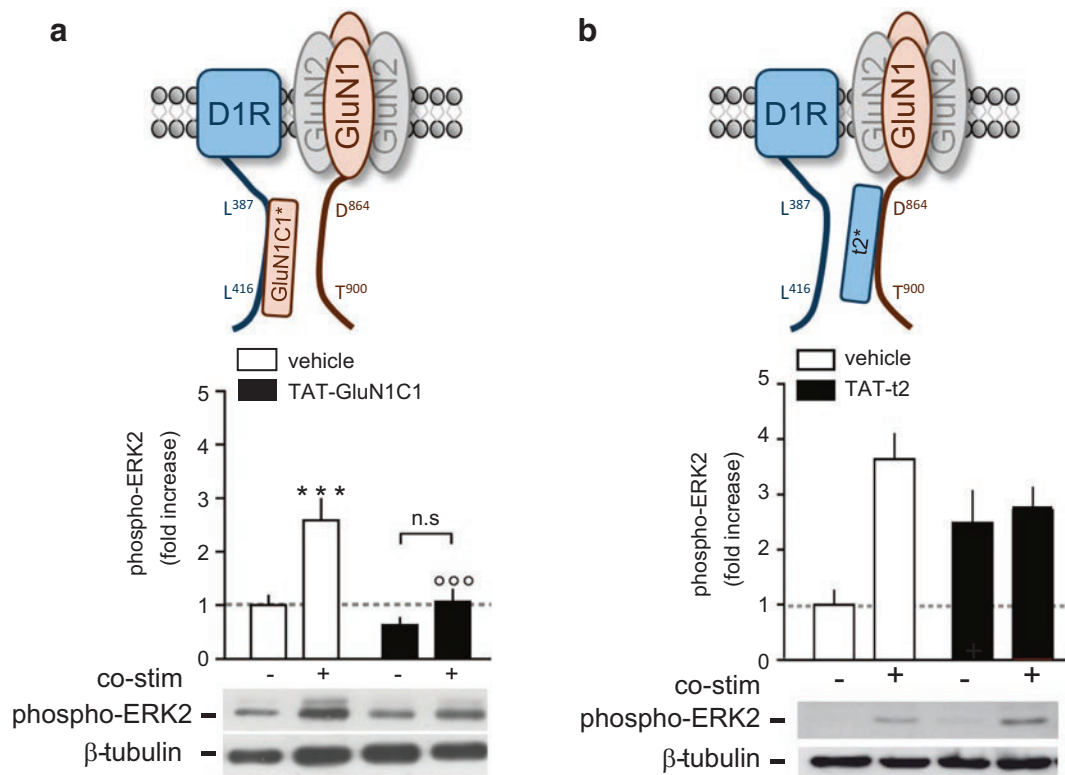


Fig. 2 Impact of D1R/GluN1 heteromer blockade with two different interfering peptides on downstream ERK signaling. Cultured striatal neurons were incubated or not with 5 μ M of TAT-GluN1C1 (**a**) or TAT-t2 (**b**) prior to a co-stimulation (co-stim) of D1R and NMDAR with 3 μ M of SKF38393 together with 0.3 μ M of glutamate for 10 min (+) or a vehicle solution (–). The activity of ERK downstream from D1R and NMDAR was assessed by western blot using an antibody that specifically recognizes the phosphorylated (i.e., activated) form of ERK1/2. Quantifications show that TAT-GluN1C1 fully blocks ERK activation induced by the co-stimulation (**a**) whereas the TAT-t2 increases by itself basal ERK activity levels and does not inhibit ERK activation induced by the co-stimulation. Two-way ANOVA; Bonferroni post-hoc test; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ (compared to control); ^{ooo} $p < 0.0001$ (compared to co-stim); *n.s* not significant. Adapted from [18]

between the TAT and the GluN1C1 sequence to increase flexibility between these two parts of the peptide.

The design of a control peptide has been inspired by the work of Woods and coworkers who established that the C1 cassette of GluN1 was containing a stretch of 9 arginine-rich amino acids (₈₉₀SKFRRRSSK₈₉₈), which plays a critical role for the electrostatic interactions mediating the interactions between D1R with GluN1 [29]. A peptide corresponding to the C1 sequence deleted of these nine amino acids (TAT-GluN1C1 Δ) has thus been used as a control and we were able to confirm its inability to alter D1R/GluN1 heteromer formation (Fig. 3a). However, alternative options should be considered to design control peptides (see Note 3).

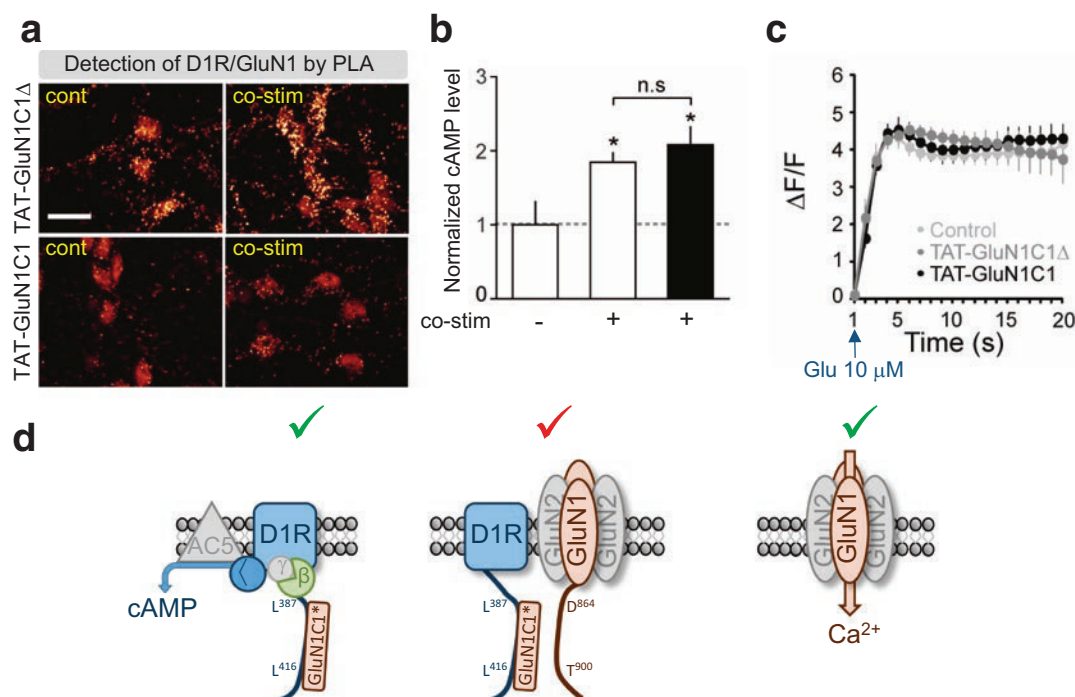


Fig. 3 The TAT-GluN1C1 peptide blocks D1R/GluN1 heteromer formation, while preserving individual D1R- and NMDAR-dependent signaling. Neurons were pre-incubated with TAT-GluN1C1Δ (top panels) or TAT-GluN1C1 (bottom panels) prior to and during an incubation with 3 μ M of SKF38393 together with 0.3 μ M of glutamate (co-stim) or a vehicle solution (cont) for 10 min. **(a)** Representative confocal images illustrating the punctate pattern of the PLA signal corresponding to D1R/GluN1 heteromers. Note that the co-stimulation favors D1R/GluN1 heteromer in the presence of the control peptide, whereas this phenomenon is fully blocked in neurons pre-incubated with the TAT-GluN1C1 peptide. **(b)** cAMP production (fold increase) in control condition and after 10 min of the co-stimulation paradigm. Note the lack of effect of TAT-GluN1C1 on D1R-mediated cAMP production. One-Way ANOVA, Newman Keuls post-hoc test; * $p < 0.05$ when compared to the control group. **(c)** Illustration of calcium profiles obtained from cultured neurons pre-treated with either a vehicle solution, the TAT-GluN1C1 or the TAT-GluN1C1Δ peptides and loaded with the calcium probe Fluo-4. Calcium influx is induced by a stimulation with glutamate 10 μ M added at the indicate time. **(d)** Diagram summarizing the results shown in (a–c). Adapted from [18]

2.2 Guideline on Storage and Use of Interfering Peptides Through the Example of D1R/GluN1 Disruption Using TAT-GluN1C1

1. Preparation and storage of peptides:

TAT-GluN1C1 and TAT-GluN1C1Δ, synthesized with a purity >98%, were diluted in sterile deionized water as stock solutions of 1 mM. Since peptides are unstable molecules by nature (see **Note 4**), it is critical to avoid freeze-thaw cycle(s). The stock solution should be aliquoted in a volume corresponding to the need for one experiment and stored at -80°C . One aliquot should be defrosted slowly on ice and used for a single experiment.

2. *Incubation of cultured neurons with TAT-interfering peptides.*

The incubation of primary cultured neurons with the TAT-GluN1C1 to D1R/GluN1 heteromers requires the following steps (see **Note 5**):

- (A) Primary cultures of striatal neurons were performed from striata dissected out from 14-day-old embryos from pregnant Swiss mice as described in [30]. Neurons were then plated at a density of 1000 cells/mm² and maintained for 6 days in vitro (DIV) in a Neurobasal A culture medium supplemented with B27, 500 nM L-glutamine, 60 µg/ml penicillin G, and 25 µM β-mercaptoethanol in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.
- (B) At DIV 6, the culture medium was replaced by fresh medium and put back to the incubator in order to avoid the presence of endogenous glutamate that may alter the response of the cell to low doses of exogenous glutamate (see steps 2–4).
- (C) At DIV 7, an aliquot of TAT-GluN1C1 and TAT-GluN1C1Δ stock solutions were defrosted on ice and added directly to the culture medium containing the neurons to reach a final concentration of 5 µM (see **Note 6**). Neurons were then put back at 37 °C in the incubator for 1 h.
- (D) Neurons incubated in the presence of interfering peptides were then stimulated with 3 µM of the D1R agonist SKF 38393 together with 0.3 µM of glutamate to stimulate concomitantly D1R and NMDAR for 10 min at 37 °C in the incubator.
- (E) At the end of the treatments, when immunostaining or PLA experiments were performed (Fig. 3a), the culture medium was removed and neurons were fixed for 20 min at room temperature with a solution of Phosphate Saline Buffer (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 4% sucrose and washed three times with PBS (see **Note 7**). To perform immunoblotting (see Fig. 2), the culture medium was removed and the culture dishes containing the neurons were placed on dry ice. Neurons were then homogenized by sonication in a boiling solution of 1% sodium dodecylsulfate (SDS) and 1 mM of the phosphatase inhibitor sodium orthovanadate diluted in water, and then placed for 5 min at 100 °C before being stored at –80 °C.

3. *Infusion of TAT-interfering peptides into the brain.*

To evaluate the functional roles of D1R/GluN1 heteromers in the brain, we performed intracerebral injection of the TAT-GluN1C1 peptide although other routes of administrations can be considered (see **Note 8**).

To deliver the TAT-GluN1C1 in the ventral part of the striatum (i.e., the nucleus accumbens), bilateral injections were performed on mice anesthetized with isoflurane. Stainless-steel guide cannulae of 22 gauge were implanted in the nucleus accumbens by using the following stereotaxic coordinates: antero-posterior: +1.5; medio-lateral: ± 1.6 ; dorso-ventral: 4.1 with an angle of 13° and then fixed to the skull with dental cement. After 1 week of recovery, 5 pmol of peptide diluted in water were infused 1 h prior to any further pharmacological treatment. At the end of the experiments, the mice were perfused by intracardiac perfusion of 4% PFA in 0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer, pH 7.5 delivered with a peristaltic pump. Brains were then removed and post-fixed overnight in the aforementioned fixative solution. The brains were then sliced in 30 μm -thick sections kept in a solution of 30% ethylene glycol, 30% glycerol, 0.1 M phosphate buffer. These sections can be used to detect receptor heteromers (and their disruption by an interfering peptide) by using techniques such as PLA [18, 22, 23]. When biochemical analyses were performed, mouse heads were immediately frozen in liquid nitrogen and punches were prepared from both hemispheres of the brain and homogenized as described in Sect. 2.4 for cultured neurons.

3 Testing of the Efficacy and Specificity of an Interfering Peptide-Based Strategy

To validate the specificity of an interfering peptide, the first step is to show the ability of the peptide to alter the interaction between the receptors of interest and confirm the absence of effect of the control peptide. In the case of D1R/GluN1 heteromers, cultured striatal neurons, which co-express both D1R and NMDAR [18], were pre-incubated with TAT-GluN1C1 or TAT-GluN1C1 Δ and co-stimulated or not with a D1R agonist together with glutamate as described in Sects. 2-3 and 2-4. After 10 min of co-stimulation, neurons were fixed as described in Sect. 2-5. Endogenous D1R/GluN1 heteromers were detected by performing a PLA according to the manufacturer's instructions. For details on the PLA procedures, see [18, 22, 31]. As illustrated in Fig. 3a, D1R/GluN1 proximity visualized by PLA appears as a punctate pattern and a concomitant stimulation of both D1R and NMDAR for 10 min triggers an increase of the PLA signal in the presence of the control TAT-GluN1C1 Δ . By contrast, in the presence of the TAT-GluN1C1, basal levels of D1R/GluN1 are decreased and their increased formation induced by the co-stimulation of both receptors is fully blocked, thus illustrating the efficacy and selectivity of the TAT-GluN1C1 as an inhibitor of D1R/GluN1 heteromers.

On a functional standpoint, the second validation step is to verify that the TAT-GluN1C1 peptide does not interfere nonspe-

cifically with the functions of D1R and NMDAR independently on heteromerization.

The D1R is a G protein-coupled receptor that is positively coupled to adenylyl cyclase and cAMP production through the G_{olf} protein [32]. As shown in Fig. 3b, an Elisa-based assay was used to measure cAMP production in cultured neurons that have been co-stimulated with a D1R agonist and glutamate to confirm that the presence of TAT-GluN1C1, which binds to the t2 domain of D1R, did not alter cognate pathway downstream from D1R (see **Note 9**). On the other side, the impact of TAT-GluN1C1 has also been tested on NMDAR-mediated calcium influx triggered by a purely glutamatergic stimulation with 10 μ M of glutamate. Live calcium imaging on cultured striatal neurons loaded with the calcium probe Fluo-4 demonstrated that the calcium dynamics and amplitude were similar when glutamate was applied on neuron pre-treated with TAT-GluN1C1, TAT-GluN1C1 Δ , or a vehicle solution (Fig. 3c).

Altogether, this series of controls showed that the TAT-GluN1C1 peptide blocks the binding of D1R to GluN1 subunits of NMDAR, while preserving the normal functioning of individual D1R and NMDAR (Fig. 3d). This interfering peptide-based strategy allowed the demonstration that D1R/GluN1 heteromers can be considered as molecular bridges by which DA facilitates both NMDAR-dependent signaling in D1R-expressing neurons and neuronal plasticity in the striatum [18].

4 Notes

1. The tethering of receptors at synaptic sites involves protein-protein interactions with numerous partners through interaction sites that may be contiguous or overlapping with the docking domains responsible for heteromer formation. Prior to the design of an interfering peptide sequence, an exhaustive literature screening is necessary to identify the location of known interaction domains of all binding partners of a given receptor of interest. This preliminary step is important in order to increase the chances to disrupt the receptor heteromer without altering the interaction between the receptors of interest and other protein partners, as it may change the function and trafficking of this receptor independently of heteromerization.
2. Alternatives to the cell-penetrating TAT sequence to deliver interfering peptides into the cell:
 - (a) The penetrating sequence can be composed of a stretch of positively charged amino acids, such as arginines, or other known plasma membrane-permeant peptide sequence such as penetratin [33].

- (b) For electrophysiological studies, the interfering peptide does not necessarily need to be coupled to a penetrating sequence as it can be filled in the patch pipet. The peptide will diffuse in the cytoplasm of the recorded cell and reach its target receptor [18].
 - (c) Virus-mediated expression of interfering peptides can be used and offers several advantages when compared to the use of synthetic peptides. The use of strong promoters such as CMV, CAG, and PKG to drive the expression of the interfering sequence allows a continuous production of the peptide that can overcome the degradation of the peptide by endonucleases and exonucleases. Virus-mediated expression should be privileged in studies where a long-lasting blockade of receptor heteromers needs to be achieved. Furthermore, the injection of viruses expressing a floxed construct encoding the interfering sequence into the brain of a mouse line that expresses the enzyme cre recombinase driven by a cell-type specific promoter enables the blockade of receptor heteromers in specific cell subpopulations of interest.
3. The most common way to test for the specificity of an interfering peptide is to use a control peptide composed of the same amino acids placed in a random order (i.e., “scramble peptide”). However, as shown for several heteromers including D1R/GluN1 [29] or D2R/A2R [34], clusters of charged amino acids are critical for the formation of heteromers through electrostatic interactions. Hence, it is important to be aware that the randomized control peptide should display a distribution of charged amino acids that has to be as much as possible different from the one of the active interfering peptide.
 4. To overcome the low stability of peptides against proteolysis, several chemical modifications of amino acids can be used. For instance, retro-inverso amino acids in which the N- and C-terminus are reversed and the natural L-conformation of the peptide is changed to the D-enantiomer form. Other modification such as introduction of *N*-alkylated amino acids or cyclization can also be considered [35].
 5. The experimental procedures described in this section relate to the disruption of D1R/GluN1 heteromers with TAT-GluN1C1 striatal cultured neurons. However, the global procedure may be generalizable to the use of any TAT-coupled peptide and any cell type [36].
 6. A dose–response curve has to be performed since the concentration of interfering peptide yielding a maximum inhibitory effect on the disruption of a receptor heteromer of interest may depend on the accessibility of the targeted receptor, its localization within the cell, and its expression level.

7. The penetration of the peptide can be confirmed by coupling the peptide to a fluorophore [36] or a molecule of biotin [18] or any kind of tag that can be detected by immunofluorescence. However, such labeled peptides may not be suitable for functional studies since the presence of the fluorophore may alter the ability of the peptide to reach the target receptor.
8. TAT peptides have the characteristic to cross the plasma membrane but they also cross the blood–brain barrier. As such, they can be injected intraperitoneally in order to reach neurons of the central nervous system [37].
9. The absence of effect of TAT-GluN1C1 on D1R-mediated cAMP production is in agreement with the fact that this peptide binds to the t2 domain of D1R, which does not overlap with the third intracellular loop of D1R that is involved in the coupling of D1R to the G protein [38].

References

1. Bastide MF, Meissner WG, Picconi B et al (2015) Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 132:96–168
2. Roze E, Cahill E, Martin E et al (2011) Huntington's disease and striatal signaling. *Front Neuroanat* 5:55
3. Laurelle M (2014) Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic intervention. *Curr Opin Pharmacol* 14:97–102
4. Pauls DL, Abramovitch A, Rauch SL et al (2014) Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurological perspective. *Nat Rev Neurosci* 15:410–424
5. Cahill E, Salery M, Vanhoutte P et al (2014) Convergence of dopamine and glutamate signalling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front Pharmacol* 4:172
6. Pascoli V, Cahill E, Bellivier F et al (2014) Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biol Psychiatry* 76:917–926
7. Wang M, Wong AH, Liu F (2012) Interaction between NMDAR and dopamine receptors: a potential therapeutic target. *Brain Res* 1476:154–163
8. Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W et al (2014) Moonlighting proteins and protein-protein interactions as neurotherapeutic targets in the G-protein-coupled receptor field. *Neuropsychopharmacology* 39:131–155
9. Borroto-Escuela DO, Carlsson J, Ambrogini P et al (2017) Understanding the role of GPCR heteroreceptor complexes in modulating the brain networks in health and disease. *Front Cell Neurosci* 1:37
10. Lee FJS, Xue S, Pei L et al (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with dopamine 1 receptor. *Cell* 111:219–230
11. Pei L, Lee FJS, Moszczynska A et al (2004) Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with NMDAR receptors. *J Neurosci* 24:1149–1158
12. Cepeda C, Levine MS (2006) Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci STKE* 2006:pe20
13. Scott L, Zeleni S, Malmersjo S et al (2006) Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:762–767
14. Liu XY, Chu XP, Mao LM et al (2006) Modulation of D2R-NR2B interactions in responses to cocaine. *Neuron* 52:897–909
15. Nai Q, Li S, Wang SH et al (2010) Uncoupling D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. *Biol Psychiatry* 67:246–254
16. Pascoli V, Besnard A, Hervé D et al (2011) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine kinase phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 69:218–227

17. Ladepeche L, Dupuis JP, Bouchet D et al (2013) Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:18005–18010
18. Cahill E, Pascoli V, Trifileff P et al (2014) D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19:1295–1304
19. Fiorentini C, Gardoni F, Spano PF et al (2003) Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 278:20196–20202
20. Fiorentini C, Busi C, Spano PF et al (2008) Role of receptor heterodimers in the development of L-dopa-induced dyskinesia in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14:S159–S164
21. Zhang J, Xu TX, Hallett PJ et al (2009) PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the DA/PSD-95/NMDA receptor complex. *J Neurosci* 29:2948–2960
22. Trifileff P, Rives ML, Urizar E et al (2011) Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2 receptor complexes in the striatum. *BioTechniques* 50:111–118
23. Borroto-Escuela DO et al (2018) Receptor-receptor interactions in the central nervous system. Chapter 19 *Neuromethods*. Springer, New York
24. Biezonski DK, Trifileff P, Meszaros J et al (2015) Evidence for limited D1 and D2 receptor coexpression and colocalization within the dorsal striatum of neonatal mouse. *J Comp Neurol* 523:1175–1189
25. Bontempi L, Savoia P, Bono F et al (2017) Dopamine D3 and acetylcholine nicotinic receptor heteromerization in midbrain dopamine neurons: relevance for neuroplasticity. *Eur Neuropsychopharmacol* 27:313–324
26. He Y, Li Y, Chen M et al (2016) Habit formation after random interval training is associated with increased adenosine A2A receptor and dopamine D2 receptor heteromers in the striatum. *Front Mol Neurosci* 9:151
27. Soriano A, Ventura R, Molero A et al (2009) Adenosine receptor-antagonist/dopamine D2-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J Med Chem* 52:5590–5602
28. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP et al (1998) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with NR1 subunit. *Cell* 84:745–755
29. Woods AS, Ciruela F, Fuxe K et al (2005) Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J Mol Neurol* 26:125–132
30. Garcia M, Charvin D, Caboche J (2004) Expanded Huntingtin activates the c-jun N terminal kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in striatal neurons in culture. *Neuroscience* 127:859–870
31. Bellucci A, Fiorentini C, Zalteri M et al (2014) The “in situ” proximity ligation assay to probe protein-protein interactions in intact tissues. In: Ivanov A (ed) *Exocytosis and endocytosis. Methods in molecular biology (Methods and protocols)*, vol 1174. Humana, New York
32. Corvol JC, Studler JM, Schonn JS et al (2001) α 1 is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem* 76:1585–1588
33. Dupont E, Prochiantz A, Joliot A (2015) Penetratin story: an overview. *Methods Mol Biol* 1324:29–37
34. Ciruela F, Burgueño J, Casadó V et al (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem* 76:5354–5363
35. Gentilucci L, De Marco R, Cerisole L (2010) Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr Pharm Des* 16:3185–3203
36. Lavour J, Bernard F, Trifileff P et al (2007) A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J Neurosci* 27:14448–14458
37. Besnard A, Bouveyron N, Kappès V et al (2011) Alteration of molecular and behavioural responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31:14296–14307
38. König B, Grätzel M (1994) Site of dopamine D1 receptor binding to Gs protein mapped with synthetic peptides. *Biochem Biophys Acta* 1223:261–266



Invited review

Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations



Andry Andrianarivelo^{a,b,c}, Estefani Saint-Jour^{a,b,c}, Roman Walle^{d,e}, Pierre Trifilieff^{d,e}, Peter Vanhoutte^{a,b,c,*}

^a INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005, Paris, France

^b CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

^c Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

^d Nutrition and Integrative Neurobiology, INRA UMR 1286, F-33076, Bordeaux, France

^e University of Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

HIGHLIGHTS

- Many DAR heteromers have been identified but their biological significance is only emerging.
- Targeting DAR heteromers has a strong therapeutic potential the field of addiction.
- The selective inhibition of receptor heteromers is a major limitation to uncover their roles *in vivo*.

ARTICLE INFO

Keywords:

Addiction
Striatum
Dopamine
Glutamate
Signaling
Receptor heteromers

ABSTRACT

Drug addiction is a chronic and relapsing disorder that leads to compulsive drug intake despite deleterious consequences. By increasing dopamine (DA) in the mesolimbic system, drugs of abuse hijack the brain reward circuitry, which is critical for the development of enduring behavioral alterations. DA mainly acts onto DA D1 (D1R) and D2 (D2R) receptor subtypes, which are positively and negatively coupled to adenylyl cyclase, respectively. Extensive research has aimed at targeting these receptors for the treatment of addiction, however this often results in unwanted side-effects due to the implication of DA receptors in numerous physiological functions. A growing body of evidence indicates that the physical interaction of DA receptors with other receptors can finely tune their function, making DA receptor heteromers promising targets for more specific treatment strategies. An increasing number of articles highlighted the ability of both D1R and D2R to form heteromers, however, most studies carried out to date stem from observations in heterologous systems and the biological significance of DA receptor heteromers *in vivo* is only emerging. We focused this review on studies that were able to provide insights into functions on D1R and D2R heteromers in drug-evoked adaptations and discuss the limitations of current approaches to study receptor heteromers *in vivo*.

This article is part of the Special Issue entitled 'Receptor heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions'.

1. Introduction

Drug addiction is a chronic and relapsing disorder that results from protracted drug consumption by vulnerable individuals, leading to

compulsive drug intake despite deleterious consequences. Drug-evoked neuronal activity changes within the so-called brain reward circuit are fundamental for the instatement of the enduring behavioral alterations that are characteristic of addiction (Lüscher and Malenka, 2011). Such

Abbreviations: A2AR, adenosine A2A receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CaMKII, Calcium Calmodulin-dependent protein kinase II; CTD, C-terminal domain; DA, dopamine; D1R, dopamine receptor type 1; D2R, dopamine receptor type 2; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GPCR, G protein-coupled receptor; IL, intracellular loop; MSN, medium sized-spiny neurons; NAcc, nucleus accumbens; NMDAR, N-methyl-D-aspartate glutamate receptor; PET, positron emission tomography; PKC, protein kinase C; PLA, proximity ligation assay; PSD, post synaptic density; TM, transmembrane domain

* Corresponding author. INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005, Paris, France.

E-mail address: peter.vanhoutte@upmc.fr (P. Vanhoutte).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.003>

Received 27 September 2018; Received in revised form 27 November 2018; Accepted 3 December 2018

Available online 04 December 2018

0028-3908/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Table 1Modulation and functions of endogenous dopamine receptor heteromers in response to drugs of abuse *in vivo*.

Psychostimulant-Animal model	Dopamine receptor heteromer modulation	Impact on drug-evoked responses	References
Rat; acute cocaine (30mg/kg i.p)	D2R/GluN2B heteromers 30 min post-cocaine in the NAcc and dStr.	D2R/GluN2B disruption with Tat-D2R-IL3 (intravenous): ● Inhibition of cocaine-induced decrease in phospho-Ser¹³⁰³ GluN2B. ● Acute hyperlocomotion & stereotypies	Liu et al. 2006
Mouse; cocaine (15mg/kg i.p) & striatal cultures	D1R/GluN1 10 min after a co-stimulation of D1R and NMDAR	D1R/GluN1 disruption with Tat-GluN1-C1 (infusion into the NAcc): ● Blockade of striatal LTP. ● Inhibition of cocaine-induced ERK1/2 activation. ● Preservation of basal locomotion & acute hyperlocomotor response to cocaine. ● Alteration of cocaine-mediated locomotor sensitization induced by 2 injections.	Cahill et al., 2014b
Rat; cocaine self-administration FR5 (0.5mg/kg per infusion i.v)	D2R/A2AR heteromers 2 hours after the last self-administration session in the NAcc shell.	D2R/A2AR disruption with SynthTM5 (infusion in the NAcc): ● Prevents the decrease in self-administration induced by i.p. administration of CGS 21680.	Borrito-Escuela et al., 2017a; 2018a
Rat; amphetamine sensitization (1.5mg/kg i.p)		Subchronic D2R/D1R disruption with Tat-D1 (i.c.v. injection): ● Enhances locomotion ● Prevents the decrease in sensitization induced by s.c. administration of SKF83959.	Shen et al., 2015b
Rat; cocaine locomotor sensitization (10mg/kg i.p); conditioned place preference (10 mg/kg i.p) cocaine self-administration (0.25 mg/infusion i.v)	Tat-D1 (i.c.v. injection) prevents the increase in D1R/D2R co-immunoprecipitation induced by SKF83959	D2R/D1R disruption with Tat-D1 (i.c.v. injection): ● Enhances the acute locomotor effect of cocaine as well as sensitization. ● Induces conditioned place-preference ● Enhances conditioned-place preference induced by cocaine administration ● Enhances reinstatement of self-administration response after extinction by a single cocaine injection. ● Enhances <i>delatFosB</i> expression after repeated (7 days) injection. ● Prevents the conditioned place aversion induced by administration of SKF83959 ● Reverses the antagonistic effect of SKF83959 on cocaine conditioned place preference	Perreault et al., 2016; Hasbi et al., 2018

modulations of synaptic efficacy are translated into specific patterns of signaling pathway activation and gene expression driving a long-lasting remodeling of neural circuits, likely involved in the transition from casual to compulsive drug intake and addiction (Nestler, 2001, 2014).

Despite their distinct targets, all drugs of abuse hijack the natural reward system by increasing dopamine (DA) concentration in the mesolimbic system, especially in the striatum (Di Chiara and Imperato, 1988), resulting in alterations in glutamate transmission-dependent plasticity (Lüscher and Malenka, 2011). The striatum is considered a key target structure of drugs of abuse within the reward circuit because it is at the crossroad of converging glutamate signals arising from limbic, thalamic and cortical regions, which encode components of drug-associated stimuli and environment, along with DA transmission that mediates reward prediction error and incentive values.

This integration of DA and glutamate inputs is mainly accomplished by the Medium-sized Spiny GABAergic Neurons (MSN), which receive glutamate axon terminals and DA afferences converging on MSN dendritic spines (Moss and Bolam, 2008; Doig et al., 2010). MSN form primarily two segregated populations based on the expression of either DA D1 (D1R) or DA D2 (D2R) receptors, which are G protein-coupled receptors (GPCR) positively and negatively coupled to adenylyl cyclase through their respective coupling to $G_{s/olf}$ and $G_{i/o}$ subtypes (Felder et al., 1991; Corvol et al., 2001), although a fraction of MSN in the ventral striatum (i.e. nucleus accumbens; NAcc) express both receptors (Bertran-Gonzalez et al., 2008).

These two sub-populations of MSN also display distinct projections within the cortico-basal ganglia network with the D1R-MSN and D2R-MSN forming the direct pathway (dMSN) and the indirect pathway (iMSN), respectively. In the dorsal part of the striatum, dMSN and iMSN

exert opposite functions regarding the control of motor behavior. Optogenetic stimulations of dorsal dMSN and iMSN has been shown to promote and inhibit locomotion, respectively (Kravitz et al., 2010).

Within the NAcc, this functional dichotomy also applies to reward-dependent learning since the activation of the direct pathway neurons promotes reward whereas the stimulation of indirect pathway neurons is associated with punishment (Hikida et al., 2010; Lobo et al., 2010; Kravitz et al., 2012).

The surge of DA induced by drugs of abuse thus triggers a stimulation of D1R that activates dMSN and promotes reinforcement, whereas the D2R-mediated inhibition iMSN opposes to aversion, explaining why a high rewarding value of a stimuli is set when both D1R and D2R are stimulated. Based on these observations, it has been proposed that the imbalance between the activity of dMSN and iMSN evoked by drugs of abuse may drive towards compulsive drug intake and addiction (Lobo and Nestler, 2011; Volkow and Morales, 2015).

We and others have started to identify the underlying cellular and molecular mechanisms (Girault et al., 2007; Cahill et al., 2014a; Pascoli et al., 2014a). We found that a single cocaine administration triggers a D1R-mediated facilitation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors (NMDAR) that activates in dMSN the extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), which controls epigenetic and genic responses that are mandatory for the development of long-term behavioral alterations (Pascoli et al., 2011a, 2014a,b).

Although the implication of DA and glutamate signaling crosstalk in drug-evoked neuronal adaptations is well acknowledged, targeting the cognate receptors to alleviate symptoms is associated with a loss of efficacy over time and the appearance of severe side effects, likely due to the involvement of these receptors in fundamental physiological

functions (Wang et al., 2012; Cahill et al., 2014a). Instead, a selective targeting of the molecular mechanisms responsible for the modulation of excitatory transmission by DA appears as a promising strategy.

Beside local intracellular cascades downstream from DA receptors, a growing body of evidence supports that the physical interaction between receptors is a powerful mechanism by which receptors can mutually modify their functions through allosteric modulations. The formation of such receptor oligomers can engage two, or more, identical (homomers) or distinct (heteromers) receptors. These receptor complexes have been the subject of intense investigation because they can fine-tune downstream signaling and binding affinity of the component receptors in a spatio-temporal manner, which makes them attractive for the development of more selective pharmacological treatments for numerous neurological and psychiatric diseases (Missale et al., 2006, 2013; Borroto-Escuela et al., 2017a, 2017b). DA receptors have been shown – mostly in heterologous systems – to form many heteromers with other GPCR, ionotropic channels and transmembrane proteins, resulting in functional changes of partner receptors, modification of binding affinity for ligands and biased signaling. The diversity and biophysical properties of DA receptor heteromers have been exhaustively reviewed elsewhere (Wang et al., 2012; Ferré et al., 2016). Moreover, numerous studies showed the critical role of the physical interaction between DA receptors and NMDAR for their reciprocal modulation (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004; Cepeda and Levine, 2006; Wang et al., 2012; Ladepeche et al., 2013), which makes them particularly relevant for drug addiction.

The current review focuses on reports that were able to provide proof of concept that endogenous DA receptor heteromers in the brain can be modulated in response to exposure to drugs of abuse and eventually participate to drug-evoked neuronal adaptations (Table 1). For each DA receptor heteromer, we start from its historical discovery in heterologous systems, the identification of the protein-protein interaction domains and associated changes in signaling, to finally discuss their modulation *in vivo* and the strategies used to establish their potential roles in drug-evoked adaptations.

2. D2R heteromers and addiction

Notably because alterations of D2R-mediated signaling have been associated with numerous pathologies, there has been extensive work to identify putative heteromers formed by the D2R. Most of them were characterized in heterologous systems by bioluminescence or fluorescence resonance transfer (BRET/FRET) analyses, co-immunoprecipitation, or indirectly through modulation of ligand binding affinity and signaling effectors. These studies led to the identification of numerous and diverse receptors that are able to form complexes with the D2R and alter downstream signaling through allosteric modulations, as extensively reviewed (see Fuxe et al., 2014; Borroto-Escuela and Fuxe, 2017). Herein, we focus on D2R heteromers for which a functional impact has been characterized *in vivo*.

2.1. D2R/A2AR heteromers

The purinergic system plays an antagonistic role onto DA transmission, an effect mainly achieved through the adenosine A2A receptor (A2AR), which expression is restricted to iMSN (Schiffman et al., 2007) where it is highly colocalized with the D2R. As suggested by proximity-ligation assay (PLA) on striatal tissue, a subset of A2AR and D2R are in close proximity, which supports the existence of A2AR/D2R heteromers *in vivo* (Trifilieff et al., 2011; Fernandez-Duenas et al., 2015; He et al., 2016; Borroto-Escuela et al., 2017a, 2018a).

Historically, the work on interactions between striatal adenosine and dopamine signaling began with the original observation that caffeine and theophyllamine, which antagonize adenosine receptors, were able to enhance the antiparkinson actions of levodopa and DAR agonists in a model of hemiparkinson rats (Fuxe and Ungerstedt, 1974).

Later on, the first indirect evidence for the existence of D2R/A2AR heteromers came from the observation that the A2AR agonist CGS 21680 was able to decrease D2R affinity for the agonist apomorphine in native membranes prepared from the rat striatum, suggesting allosteric modulations within D2R/A2AR complexes (Ferré et al., 1991). Since this discovery, extensive work, mainly by Ferré's and Fuxe's groups, characterized the biophysical and pharmacological properties of D2R/A2AR heteromers, which have become a model study of allosteric modulation between GPCR (Ferré et al., 2018; Borroto-Escuela et al., 2018a). The extensive description of the biophysical properties of D2R/A2AR heteromers is out of the scope of the current article but remarkable recent reviews can be recommended (Ferré et al., 2016, 2018). A current model developed by Ferré and collaborators propose that A2AR/A2AR and D2R/D2R homodimers, coupled to their respective G protein – $G_{s/olf}$ and $G_{i/o}$, constitute an heterotetrameric structure forming a macromolecular complex with type 5 adenylate cyclase (AC5) (Navarro et al., 2018; Ferré et al., 2018). Electrostatic interactions between transmembrane domains (TM) 6 form the homodimer interface, while heteromeric interactions involve TM 4 and 5 of one receptor within each homodimer (see Navarro et al., 2018). D2R/A2AR heteromerization results in negative allosteric interactions by which A2AR ligands – agonists and antagonists – decrease the affinity and efficacy of D2R ligands (Azdad et al., 2009; Bonaventura et al., 2015) and, reciprocally, D2R agonists inhibit A2AR-dependent activation of AC5 (Navarro et al., 2018). In terms of signaling, this antagonistic interaction would result in a switch from cyclic AMP- to PLC- and arrestin-dependent pathways, whether stimulation of A2AR or D2R, respectively, is dominant (Borroto-Escuela et al., 2011; see Ferré et al., 2018 for review).

These unique properties of D2R/A2AR heteromers have opened new routes for pharmacological strategies for pathologies related to alterations in DA transmission. For instance, even though the direct dependence to D2R/A2AR heteromers has not been demonstrated, preclinical evidence support some efficacy of A2AR antagonists to alleviate symptoms in Parkinson's disease (Salamone et al., 2013; Podurgiel et al., 2016) or apathy – i.e. loss of motivation (Mott et al., 2009; Salamone et al., 2009; Pardo et al., 2012; Nunes et al., 2013; Randall et al., 2014; Lopez-Cruz et al., 2018). Recently, Volkow and colleagues showed that the psychostimulant caffeine, a potent A2AR antagonist, enhances D2R availability in healthy control subjects measure by Positron Emission Tomography (PET) (Volkow et al., 2015). It is unclear whether this effect results from upregulation of membrane expression of D2R or change in their binding affinity for the radioligand (^{11}C)-Raclopride, but Ferré and colleagues proposed that it could directly result from the “ability of caffeine to antagonize the effect of endogenous adenosine on the binding of exogenous D2R antagonist” (Ferré et al., 2018). This hypothesis remains to be tested but these observations highlight the potential interest of D2R/A2AR heteromerization in the modulation of D2R activity and binding affinity. Yet, a decrease in striatal D2R availability in subjects suffering from drug addiction is one of the most consistent findings in PET imaging (Koo and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017). The causes for such decrease are still unclear and could be both a consequence of drug exposure and/or a vulnerability factor for drug abuse. Nevertheless, this neurobiological feature is likely to constitute a central mechanism for the development of addiction (Trifilieff and Martinez, 2014). Because the use of selective D2R ligands would impact crucial physiological functions and lead to severe unwanted side-effects, compounds that could act as allosteric modulators of D2R activity are a promising strategy in the field of addiction. In this context, D2R/A2AR heteromerization should be considered as a potential target.

Accordingly, preclinical data suggest that D2R/A2AR heteromerization could be involved in some aspects of addiction for psychostimulants. Extended cocaine self-administration resulted in an increased binding for (^3H)-ZM 241385 – an A2AR antagonist – in the NAcc of rats, which was reversed after extinction or withdrawal

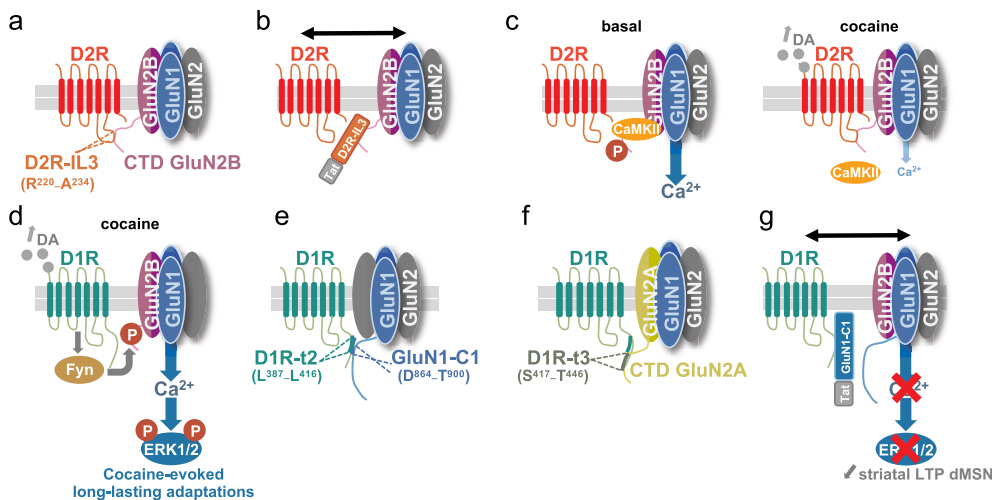


Fig. 1. Formation, regulation and functions of heteromers formed dopamine and NMDA receptors in response to drugs of abuse. (a) Diagram depicting the formation of D2R/GluN2B-NMDAR heteromers through the interaction of a fragment of the D2R-IL3 with the CTD of GluN2B. (b) Mode of action of the cell-permeable Tat-D2R-IL3 peptide, which disrupts D2R/GluN2B interaction. (c) A single cocaine administration favors D2R/GluN2B heteromerization in the striatum. Consequently, the binding of CaMKII to GluN2B is altered, which decreases GluN2B phosphorylation of Ser¹³⁰³ and inhibits NMDAR functions in D2R-MSN (see Liu et al., 2006). (d) In D1R-MSN, stimulation of D1R triggers a D1R-dependent, and Fyn-mediated, phosphorylation of GluN2B on Tyr¹⁴⁷², which triggers a downstream Ca²⁺-dependent activation of ERK1/2. (e) Schematic representation of D1R/GluN1 and D1R/GluN2A heteromerization. (f) The disruption of D1R/GluN1 heteromers with the Tat-GluN1-C1 blocks the facilitation of GluN2B-NMDAR by D1R and downstream ERK activation and striatal LTP in dMSN, while preserving the function of individual D1R and NMDAR (see Cahill et al., 2014b).

2 controlling cocaine-induced long-term adaptations (see Pascoli et al., 2011a, 2014a). Schematic representation of D1R/GluN1 (e) and D1R/GluN2A (f) heteromerization. (g) The disruption of D1R/GluN1 heteromers with the Tat-GluN1-C1 blocks the facilitation of GluN2B-NMDAR by D1R and downstream ERK activation and striatal LTP in dMSN, while preserving the function of individual D1R and NMDAR (see Cahill et al., 2014b).

(Marcellino et al., 2007; Frankowska et al., 2013). Moreover, cocaine self-administration increases D2R/A2AR complexes in the shell of the NAcc (Borrito-Escuela et al., 2017a). The functional significance of this increased D2R/A2AR heteromerization was assessed with an interfering peptide corresponding to the TM5 of A2AR, which prevents D2R/A2AR interaction in heterologous system. Local administration of this peptide in the NAcc of rats the last 2 days of cocaine self-administration prevented the decrease in self-administration induced by injection of the A2AR agonist CGS 21680. Specificity of the TM5 interfering peptide was verified by showing that administration of a peptide corresponding to the TM2 of A2AR, which preserves D2R/A2AR interaction, had no effect (Borrito-Escuela et al., 2018b). Further work is necessary to characterize the impact of alterations of D2R/A2AR heteromers on psychostimulants self-administration. However, the fact that this allosteric interaction results in an inhibition of D2R-dependent transmission suggests that preventing the formation of D2R/A2AR heteromers could be an efficient strategy to modulate D2R activity, which is blunted in substance use disorders.

Of note, the D2R/A2AR interaction could also take place within higher-order oligomers. As an example, complexes with metabotropic glutamate type 5 receptors (mGluR5) have been detected by co-immunoprecipitation from striatal tissue (Cabello et al., 2009). Pharmacological experiments suggest that, within this receptor complex, A2AR and mGluR receptors could act synergistically to inhibit D2R (Beggiato et al., 2016). The D2R has also been shown to form higher-order heteromers with the sigma-1 receptor, which is able to directly bind cocaine (Navarro et al., 2013; Beggiato et al., 2017). These complexes have been detected in the striatum (Beggiato et al., 2017) but their functional implication in cocaine-induced adaptations remain to be demonstrated.

2.2. D2R/GluN2B heteromers

The integration of DA- and glutamate-dependent signaling within the reward circuitry plays functional roles in drugs of abuse-evoked long-lasting alterations (Lüscher and Malenka, 2011; Pascoli et al., 2014a; Bellone and Gardoni, 2015). In addition to mGluR, glutamate binds to ionotropic receptors of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), kainate and NMDA subtypes, which mediate most of the excitatory neurotransmission in the brain and play key roles in synaptic plasticity (Traynelis et al., 2010).

NMDAR are voltage-gated calcium (Ca²⁺) channels playing pivotal roles in modulating synaptic transmission. Alterations of their functions

have been associated with numerous developmental, neurological and psychiatric disorders, including addiction (Lau and Zukin, 2007). NMDAR are heteromeric structures composed of two obligatory GluN1 subunits (formerly named NR1) and two regulatory GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D) and/or GluN3 subunits (GluN3A, GluN3B). Depending on the subunit composition, NMDAR fall into two main categories, the di-heteromeric (GluN1 with identical GluN2) or the tri-heteromeric ones, composed of GluN1 associated to a mixture of GluN2 and/or GluN3 subunits. Most differences between these subunits mainly reside in their intracellular C-terminal domains (CTD), which are subjected to post-translational modifications controlling NMDAR trafficking, protein interactions, Ca²⁺ dynamics and coupling to specific pathways (Paoletti et al., 2013). Among other post-translational modifications, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (Omikumar et al., 1996) and protein kinase C (PKC) (Liao et al., 2001) can phosphorylate the GluN2B CTD on Ser¹³⁰³, which enhances NMDA currents (Lieberman and Mody, 1994; Liao et al., 2001), notably by favoring NMDAR surface expression (Jin et al., 2015).

In an attempt to identify the molecular mechanisms underlying the integration of DA and NMDA-mediated signals in response to drugs of abuse, Liu and coworkers highlighted a direct physical interaction between D2R and GluN2B subunits in post synaptic density (PSD) fractions of the rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum (Liu et al., 2006). They observed that a single cocaine injection triggers an increased D2R/GluN2B heteromerization in the NAcc and dorsal striatum, paralleled by a decrease of phospho-GluN2B-Ser¹³⁰³. This was strictly dependent on D2R signaling since the D2R antagonist Eticlopride blocked both cocaine-mediated inhibition of phospho-GluN2B-Ser¹³⁰³ and D2R/GluN2B interaction, while a D2R agonist had opposite effects. The protein domains involved in D2R/GluN2B interaction were then characterized and the residues R²²⁰-A²³⁴ within third intracellular loop of D2R (D2R-IL3) appeared as critical for the binding of D2R to the CTD of GluN2B (Fig. 1a). By using a penetrating peptide corresponding to this R²²⁰-A²³⁴-D2R-IL3 fragment, which disrupts D2R/GluN2B heteromers (Fig. 1b), it was shown that the cocaine-induced stimulation of D2R facilitates the D2R/GluN2B interaction, leading to a decrease of NMDAR currents in iMSN. This inhibition of NMDAR relies on a competition mechanism whereby D2R/GluN2B heteromers induced by cocaine disrupt the binding of CaMKII to GluN2B and reduces CaMKII activity (Fig. 1c). At the behavioral level, disruption of D2R/GluN2B interaction inhibits the acute hyperlocomotion and stereotypies induced by a single high dose of cocaine (Liu et al., 2006). This pioneer study strongly supports the hypothesis that D2R/GluN2B heteromers

could mediate the inhibitory effects of psychostimulants on iMSNs. However, it raises several important questions that we are currently pursuing. With regard to the chronic nature of addiction-related disorders, it would be important to determine how D2R/GluN2B heteromers are modulated in response to repeated exposure cocaine and if disrupting D2R/GluN2B interaction could overcome cocaine-evoked long-lasting responses. Furthermore, the R²²⁰-A²³⁴-D2R-IL3 peptide used to alter D2R/GluN2B interaction comprises a part of the Arginine-rich domain of D2R that is critical for its binding to A2AR (Ciruela et al., 2004; see section 2.1). Using a shorter D2R-IL3 peptide that selectively alters D2R/GluN2B interaction would definitely precise the specific role of D2R/GluN2B in long-term effects of drugs of abuse. This is particularly relevant in light of recent evidence showing that D2R-mediated inhibition of NMDAR also involves D2R/A2AR interaction (Azzad et al., 2009).

2.3. D1R/D2R heteromers

Another DA receptor heteromer that has been extensively studied, mostly by the group of Susan R. George, is the one formed by the D1R and D2R. Co-expression of both receptors in the striatum has been reported mostly in the shell of the NAcc (Deng et al., 2006; Hasbi et al., 2009; Perreault et al., 2010; Gangarossa et al., 2013; Frederick et al., 2015; Gagnon et al., 2017) and D1R/D2R complexes were detected by PLA *in situ* in the striatum of rodents and non-human primates (Perreault et al., 2016; Rico et al., 2017; Hasbi et al., 2018), even though there has been some controversy since the work from Frederick and co-workers showed D1R/D2R complexes were not detectable by using the same approach *in vivo* in mice within the fraction of MSN expressing both D1R and D2R receptors (Frederick et al., 2015). In heterologous systems, the formation of D1R/D2R complexes could lead to atypical signaling: instead of the canonical G_{s/olf} and G_{i/o} proteins, D1R/D2R heteromers would be able to recruit G_q protein, leading to PLC-mediated intracellular Ca²⁺ release (Perreault et al., 2014). It was argued that the D1R ligand SKF83959 preferentially recruits D1R/D2R heteromer-dependent Ca²⁺ signaling, due to alterations of the D1R binding pocket when in the heteromeric complex, supporting the idea of an allosteric modulation within the D1R/D2R heteromers (Hasbi et al., 2009, 2010; Verma et al., 2010; Perreault et al., 2014).

To target D1R/D2R heteromers, Hasbi et al. (2014) designed and interfering peptide, based on putative interaction sites between both receptors involving 2 adjacent Arginine in the D2R-IL3 and 2 adjacent Glutamic acid of the D1R CTD (O'Dowd et al., 2012). This “Tat-D1” peptide, corresponding to amino acid 396–413 of the D1R CTD, was shown to perturb i) D1R/D2R – but not D2R-D5R – interaction, ii) SKF83959-induced Ca²⁺ transients *in vitro* and iii) co-immunoprecipitation from membrane extracts, while a scrambled peptide had no effect (Hasbi et al., 2014).

In the context of addiction, the Tat-D1 peptide was shown to reverse the SKF83959-induced inhibition of amphetamine sensitization (Shen et al., 2015a). The same group showed that the Tat-D1 peptide alone enhanced cocaine-induced locomotor sensitization and place-preference, as well as the reinstatement after self-administration (Perreault et al., 2016; Hasbi et al., 2018). It should be noted that the Tat-D1 peptide displayed, by itself, pro-locomotor effects (Shen et al., 2015a) and induced place-preference (Perreault et al., 2016; Hasbi et al., 2018). Importantly, the Tat-D1 peptide used to disrupt D1R/D2R interaction strongly overlaps with the so-called “Tat-D1R-t2 peptide” originally designed to block D1R/NMDAR heteromers (Nai et al., 2010; Ladepeche et al., 2013; see section 3.1). Furthermore, the Tat-D1R-t2 was shown to induce, by itself, ERK activation (Cahill et al., 2014b) and to potentiate glutamatergic synapses (Ladepeche et al., 2013), suggesting that this peptide could mimic D1R/NMDA interaction (see section 3.1), which could explain the pro-rewarding effect of the Tat-D1 peptide used by the George's group. The specificity of the Tat-D1 peptide in selectively impairing D1R/D2R interaction has therefore to be

further validated. Moreover, most of the *in vivo* effects of the Tat-D1 peptide were assessed through its ability to abolish/attenuate the behavioral impact of SKF83959 (Hasbi et al., 2014, 2018; Shen et al., 2015a,b). Yet, the properties of SKF83959 as a preferential ligand for D1R/D2R heteromers capable of recruiting G_q-dependent mechanisms has been recently challenged (Chun et al., 2013; Lee et al., 2014a,b; Frederick et al., 2015). Further work is needed to unravel the unique properties of this atypical subpopulation of MSN co-expressing both D1R and D2R and their potential regulation by putative D1R/D2R heteromers.

3. D1R heteromers and addiction

3.1. D1R/NMDA heteromers

As opposed to the inhibitory role of D2R on NMDAR currents (see section 2.3), there is a general consensus toward a facilitating effect of D1R stimulation on NMDAR functions (Flores-Hernandez et al., 2002; Wittmann et al., 2005; but see Lee et al., 2002). This positive feedback is bi-directional since NMDAR stimulation also favors D1R surface expression and downstream cAMP production (Pei et al., 2004). The mechanisms underlying the interplay between D1R and NMDAR signals have been intensely investigated, notably because targeting these processes offers the prospect of restoring the imbalance in D1R and NMDAR functions described in numerous psychiatric diseases (Cepeda and Levine, 2006; Missale et al., 2006; Yao et al., 2008; Wang et al., 2012).

The synergy between D1R and NMDAR plays functional roles in drug of abuse-mediated responses. We observed that psychostimulant-mediated striatal activation of ERK1/2, which controls long-term neuronal adaptations, relied on a concomitant stimulation of D1R and NMDAR (Valjent et al., 2000, 2005; Pascoli et al., 2011a). This convergence of DA and glutamate signals onto ERK1/2 involves a D1R-mediated phosphorylation of GluN2B-containing NMDAR on Tyr¹⁴⁷² via the tyrosine kinase Fyn, which triggers a Ca²⁺-dependent activation of ERK1/2 that launches cocaine-induced epigenetic, genic, morphological and behavioral changes (Fig. 1d; Pascoli et al., 2011a). In addition to signaling cascades linking D1R stimulation to a facilitation of GluN2B-NMDAR, the potential role D1R/NMDAR heteromers in drug of abuse-evoked plasticity is only emerging.

The seminal work of Fang Liu and colleagues led to the identification of a direct binding of D1R, but not D5R, to the GluN1 and GluN2A subunits of NMDAR in cultured cells overexpressing the receptors, and hippocampal tissues (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004). These D1R/GluN1 complexes were also detected in the mouse striatum (Cahill et al., 2014b), including in PSD fractions (Fiorentini et al., 2003), as well as in human post-mortem caudate putamen tissues (AA, ESJ, RW, PT, PV unpublished observations). *In vitro* assays showed that the D1R-t2 (L³⁸⁷-L⁴¹⁶) and D1R-t3 (S⁴¹⁷-T⁴⁴⁶) domains of D1R CTD bind to the CTD of GluN1 and GluN2 subunits, respectively (Fig. 1e–f; Lee et al., 2002). The D1R-t2 domain binds to the C1 cassette of GluN1 (GluN1-C1; D⁸⁶⁴-T⁹⁰⁰; Lee et al., 2002; Fiorentini et al., 2003; Pei et al., 2004), which comprises multiple PKA and PKC phosphorylation sites (Tingley et al., 1997; Wang et al., 2014) and controls NMDAR trafficking (Ehlers et al., 1995; Scott et al., 2003). Pull-down assays coupled to mass spectrometry established that electrostatic interactions between the Arginine-rich epitope localized in GluN1-C1 and the acidic residues in the D1R-t2 region mediate D1R/GluN1 interaction (Woods et al., 2005). These findings highlight the importance of epitope-epitope electrostatic interactions for both D1R/NMDA and D2R/A2AR (see section 2.1), suggesting that they might represent a general mechanism for receptor heteromerization. Of note, the D1R-t2 and GluN1-C1 amino acid sequences are conserved across species, supporting the hypothesis that D1R/NMDAR heteromers might be involved in physiological functions that have been preserved through evolution (Woods et al., 2005).

Studies on the modulation of D1R/GluN1 interaction by receptor agonists or antagonists led to controversial findings, with authors reporting a D1R agonist-dependent decrease of endogenous D1R/GluN1 heteromers in cultured hippocampal neurons (Lee et al., 2002), whereas BRET experiments performed on cell lines overexpressing the receptors showed no effect of D1R or NMDAR agonists and antagonists (Fiorentini et al., 2003).

To study whether cocaine could modulate endogenous D1R/GluN1 heteromerization, we first used cultured striatal neurons co-stimulated with a D1R agonist together with a low dose of glutamate, a model that we validated as instrumental to study cocaine-evoked signaling *in vivo* (Pascoli et al., 2011a; Cahill et al., 2014b). Notably, this co-stimulation paradigm, which induces a D1R-mediated facilitation of NMDAR as observed *in vivo* in response to cocaine, led to a significant increase of D1R/GluN1 heteromers (Cahill et al., 2014b). Their potential role in the convergence of D1R and NMDAR signals onto ERK1/2 activity was assessed with a cell-penetrating peptide corresponding to the C1 cassette of GluN1 (TAT-GluN1-C1; Fig. 1g). This peptide efficiently disrupted D1R/GluN1 heteromerization induced by the co-stimulation, as well as the D1R-mediated potentiation of Ca^{2+} transients through GluN2B-NMDAR and downstream ERK activation. Importantly, the TAT-GluN1-C1 peptide was able to block the D1R/NMDAR-dependent signaling, while preserving the functions of individual D1R and NMDAR (Cahill et al., 2014b). The inhibition of D1R/GluN2A interaction with a TAT-D1R-t3 peptide had no effect on ERK1/2 activation downstream of D1R and NMDAR. These observations posit D1R/GluN1 heteromers as the molecular bridge linking DA to the facilitation of NMDAR and ERK activation in an *in vitro* model of cocaine exposure.

Since drug-induced adaptive behavior has been causally linked to long-term synaptic plasticity of glutamate synapses onto dMSN (Pascoli et al., 2011b, 2014b), it seems critical to determine whether D1R/NMDAR heteromers are present at synaptic sites and can control synaptic plasticity.

On organotypic striatal cultures the lateral diffusion of D1R at the plasma membrane is greatly reduced upon NMDAR stimulation, which favors confined D1R expression within dendritic spines. This recruitment of D1R in spines depends on D1R/GluN1 heteromer formation, leading to the model of “diffusion trap system” whereby agonist-induced allosteric changes of NMDAR enhances D1R/NMDAR interaction at synaptic sites (Scott et al., 2006). This model stipulates that upon glutamate release, D1R/NMDAR heteromers are preferentially formed within, or at the close vicinity of, synapses. Accordingly, the CTD of both GluN2 subunits of NMDAR and D1R are known to bind the synaptic protein PSD-95, which stabilizes their localization at synapses (Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996; Kim and Sheng, 2004; Zhang et al., 2009; Ladepeche et al., 2013). The expression of both receptors is thus confined at synaptic sites owing to their interaction with PSD-95. However, Zhang and colleagues demonstrated that GluN1 and PSD-95 bind to the D1R CTD through docking sites that overlap at the level of the D1R-t2 domain (Zhang et al., 2009). Through a competition mechanism, PSD-95 is thus a limiting factor for D1R/GluN1 heteromerization at synapses, even though these receptors complexes are detected in striatal PSD fractions (Fiorentini et al., 2003).

To assess the role of D1R/GluN1 interaction in the modulation of synaptic transmission, electrophysiological recordings were performed from cortico-striatal slices prepared from the *drd1a-egfp* reporter mice to visualize dMSN (Gong et al., 2003). Inhibition of D1R/NMDAR interaction with the GluN1-C1 peptide fully blocked D1R-mediated facilitation of NMDA-mediated excitatory post-synaptic currents, while sparing basal synaptic transmission (Cahill et al., 2014b). A GluN2B antagonist was also able to abrogate the D1R-mediated facilitation of NMDA currents, whereas disruption of D1R/GluN2A heteromers with the D1R-t3 peptide had no effect. This suggests that D1R/GluN2A heteromers are not primarily involved in the modulation of NMDAR currents by DA in dMSN. It also shows that D1R/GluN1 interaction preferentially modulates GluN2B-NMDAR, even though the underlying

mechanism is still unknown.

To study the role of D1R/GluN1 interaction in striatal plasticity, high frequency electrical stimulations (HFS) of the cortex triggering long-term potentiation (LTP) of striatal synapses in both dMSN and iMSN were applied to cortico-striatal slices (Pascoli et al., 2011b). This allowed us to demonstrate the mandatory role of D1R/NMDAR heteromers for LTP in dMSN, but not iMSN (Cahill et al., 2014b). Accordingly, the facilitating effect of D1R on NMDAR-mediated LTP also required D1/NMDAR interaction in the hippocampus (Nai et al., 2010). In contrast, Ladepeche and co-workers found that blocking D1R/GluN1 interaction with the TAT-D1R-t2 peptide increased the number of potentiated synapses in a chemically-induced LTP in cultured hippocampal neurons (Ladepeche et al., 2013). The apparent discrepancy between these results is likely due to differences in experimental models (cortico-striatal slices v.s hippocampal neurons) and/or to the strategies used to block D1R/GluN1 heteromers. In fact, we found that the D1R-t2 peptide was able to activate NMDAR and ERK by itself (Cahill et al., 2014b), which could explain its permissive effect on chemical LTP. By contrast, when using the GluN1-C1 peptide, which disrupts D1R binding to NMDAR without affecting the functions of individual D1R and NMDAR, we observed a blockade of HFS-induced striatal LTP (see Andrianarivelo et al., 2018). Regarding cocaine-evoked responses *in vivo*, the infusion of the TAT-GluN1-C1 peptide into the NAcc was able to attenuate cocaine-induced ERK1/2 activation. Inhibiting D1R/GluN1 heteromers in the NAcc did not impact neither the basal locomotion nor the acute hyperlocomotor response to a first injection. By contrast, the disruption of D1R/GluN1 interaction prior and during the first injection of cocaine altered the locomotor sensitization induced by a second injection of cocaine administered a week later (Cahill et al., 2014b). This supports a role for D1R/GluN1 heteromers in the NAcc in the development of persistent cocaine-induced adaptations in acute models of cocaine exposure. To date, the impact of acute or chronic exposure on endogenous D1R/GluN1 heteromerization *in vivo* in the striatum and in other brain structures of the reward circuit is still not known. Whether or not these heteromers are involved in the development and maintenance of long-lasting structural and behavioral adaptation remains to be established. We are currently tackling these issues, which are critical because they will unravel whether of D1R/GluN1 and D2R/GluN2 heteromers are mediators of the excitatory and inhibitory actions of drugs of abuse on dMSN and iMSN, respectively.

4. Conclusions and perspectives

Numerous studies focused on the mechanisms underlying allosteric changes induced receptor heteromerization and associated modification of downstream signaling but only few reports described roles of endogenous heteromers *in vivo* (Table 1). This is likely due to limitations of current approaches to detect heteromers *in situ*. In fact, class C GPCRs form stable oligomers but class A GPCRs oligomerization seems highly dynamic, and its existence is still a matter of debate. Furthermore, most discoveries on receptor oligomers originate from studies in heterologous systems lacking the dense synaptic macroproteic complexes where receptors have multiple and dynamic interactors. These interactions, sometimes involving overlapping sites, represent a major challenge to selectively alter heteromer formation without impacting on the component receptor's interaction with other partners. This implies a thorough characterization of potential off-target effects and caution when interpreting the results. Such strategy design could benefit from crystal structures of the receptors to model the interface of heteromers, as recently performed for D2R/A2R (Borrito-Escuela et al., 2018c). This could facilitate the identification of the minimal amino-acid residues necessary for receptor heteromerization, the design of non-peptidic interfering molecules or bi-valent compounds selectively targeting receptor oligomers (Soriano et al., 2009).

Several DA receptors heteromers with a therapeutic potential have been described, including D1R/D3R (Fiorentini et al., 2010), but their

roles remain to be established. Moreover, most studies on receptor heteromers in addiction focused on the striatum because of its key role in the pathology and its enrichment in DA receptors. However, a thorough characterization of heteromer expression within the entire brain reward circuit would be of importance considering the implication of various brain regions in distinct components of addiction. Moreover, the implication of DA receptor heteromers has been mainly studied in the initial phases of drug exposure. Addressing their roles in each phases of drug addiction (maintenance, craving and relapse) seems of crucial importance as it could open new routes for the development of selective strategies targeting these heteromers for the treatment of drug addiction.

Declaration of interest

The authors report not biomedical financial interest or conflicts of interest.

Acknowledgements

The work from PV's group was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Sorbonne Université, Agence Nationale pour la Recherche (ANR-15-CE16-0017), Fondation Jérôme Lejeune, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Bio-Psy labex cluster of excellence and the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP). AA is the recipient of PhD fellowship from the French ministry of research. PT was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, University of Bordeaux, Région Aquitaine, ANR "SynLip" (ANR-16-CE16-0022), Idex Bordeaux "chaire d'installation" (ANR-10-IDEX-03-02) and NARSAD Young Investigator Grant from the Brain and Behavior Foundation. RW is the recipient of PhD fellowship from the French ministry of research.

References

- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Trifilieff, P., Vanhoutte, P., 2018. Unraveling the functions of endogenous receptor oligomers in the brain using interfering peptide: the example of D1R/NMDAR heteromers. In: Fuxe, K., Borroto-Escuela, D.O. (Eds.), *Receptor-receptor Interactions in the Central Nervous System*. Neuromethods-Springer Protocols, Humana Press, New York, pp. 317–328.
- Azad, K., Gall, D., Woods, A.S., Ledent, C., Ferré, S., Scharfmann, S.N., 2009. Dopamine D2 and Adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 34 (4), 972–986.
- Beggiato, S., Borelli, A.C., Borroto-Escuela, D., Corbucci, I., Tomasini, M.C., Marti, M., Antonelli, T., Tanganelli, S., Fuxe, K., Ferraro, L., 2017. Cocaine modulates allosteric D2-signal receptor-receptor interactions on dopamine and glutamate nerve terminals from rat striatum. *Cell. Signal.* 40, 116–124.
- Beggiato, S., Tomasini, M.C., Borelli, A.C., Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., Antonelli, T., Tanganelli, S., Ferraro, L., 2016. Functional role of striatal A2A, D2, and mGlu5 receptor interactions in regulating striatopallidal GABA neuronal transmission. *J. Neurochem.* 138 (2), 254–264.
- Bellone, C., Gardoni, F., 2015. Modulation of the glutamatergic transmission by dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and addiction diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 25.
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Hervé, D., Valjent, E., 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 (22), 5671–5685.
- Bonaventura, J., Navarro, G., Casado-Anguera, V., Azdad, K., Rea, W., Moreno, E., Brugarolas, M., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., Cortes, A., Volkow, N.D., Schiffrmann, S.N., Ferré, S., Casado, V., 2015. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (27), E3609–E3618.
- Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Fuxe, K., 2018a. A2AR-D2R heteroreceptor complexes in cocaine reward and addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (12), 1008–1020.
- Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Li, X., Rodriguez, D., Carlsson, J., Jastrzebska, J., Filip, M., Fuxe, K., 2018b. Disruption of A2AR-D2R heteroreceptor complexes after A2AR transmembrane 5 peptide administration enhances cocaine self-administration in rats. *Mol. Neurobiol.* 55, 7038–7048.
- Borroto-Escuela, D.O., Rodriguez, D., Romero-Fernandez, W., Kapla, J., Jaiteh, M., Ranganathan, A., Lazarova, T., Fuxe, K., Carlsson, J., 2018c. Mapping the interface of a GPCR dimer: a structural model of the A2A adenosine and D2 dopamine receptor heteromer. *Front. Pharmacol.* 9, 829.
- Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., 2017. Diversity and bias through dopamine D2R heteroreceptor complexes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 32, 16–22.
- Borroto-Escuela, D.O., Narvaez, M., Wydra, K., Pintsuk, J., Pinton, L., Jimenez-Beristain, A., Di Palma, M., Jastrzebska, J., Filip, M., Fuxe, K., 2017a. Cocaine self-administration specifically increases A2AR-D2R and D2R-sigma1R heteroreceptor complexes in the rat nucleus accumbens shell. Relevance for cocaine use disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 155, 24–31.
- Borroto-Escuela, D.O., Carlsson, J., Ambrogini, P., Navarez, M., Wydra, K., Tarakanov, A.O., Li, X., Million, C., Ferraro, L., Cuppini, R., Tanganelli, S., Liu, F., Filip, M., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2017b. Understanding the role of GPCR heteroreceptor complexes in modulating the brain network in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 37.
- Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A.O., Agnati, L.F., Fuxe, K., 2011. On the existence of a possible A2AR-D2- β -arrestin2 complex: a2A agonist modulation of D2 agonist-induced β -arrestin 2 recruitment. *J. Mol. Biol.* 406 (5), 687–699.
- Cabello, N., Gandia, J., Bertarelli, D.C., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Lujan, R., Ciruela, F., 2009. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J. Neurochem.* 109 (5), 1497–1507.
- Cahill, E., Salery, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014a. Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front. Pharmacol.* 4, 172.
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., 2014b. D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signaling to control synaptic plasticity and cocaine-induced adaptations. *Mol. Psychiatr.* 19 (12), 1295–1304.
- Cepeda, C., Levine, M.S., 2006. Where do you think you are going? The NMDAR-D1 receptor trap. *Sci. STKE* 2006 (333) pe20.
- Chun, L.S., Free, R.B., Doyle, T.B., Huang, X.P., Rankin, M.L., Sibley, D.R., 2013. D1-D2 dopamine receptor synergy promotes calcium signaling via multiple mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 84 (2), 190–200.
- Ciruela, F., Burgueno, J., Casado, V., Canals, M., Marcellino, D.M., Goldberg, S.R., Bader, M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Woods, A.S., 2004. Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2R receptors. *Anal. Chem.* 76 (18), 5354–5363.
- Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A., Hervé, D., 2001. Galpho(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 21 (12), 4390–4399.
- Deng, Y.P., Lei, W.L., Reiner, A., 2006. Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J. Chem. Neuroanat.* 32 (2–4), 101–116.
- Di Chiara, G., Imparato, A., 1998. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (14), 5274–5278.
- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J.P., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* 30 (44), 14610–14618.
- Ehlers, M.D., Tingley, W.G., Haganir, R.L., 1995. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269 (5231), 1734–1737.
- Felder, C.C., Williams, H.L., Axelrod, J., 1991. A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein Gi that amplifies ATP-mediated arachidonic release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (15), 6477–6480.
- Fernandez-Duenas, V., Taura, J.J., Cottet, M., Gomez-Soler, M., Lopez-Cano, M., Ledent, C., Watanabe, M., Trinquet, E., Pin, J.P., Lujan, R., Durroux, T., Ciruela, F., 2015. Untangling dopamine-adenosine receptor-receptor assembly in experimental parkinsonism in rats. *Dis. Model Mech.* 8 (1), 57–63.
- Ferre, S., Bonaventura, J., Zhu, W., Hatcher-Solis, C., Taura, J., Quiroz, C., Cai, N.S., Moreno, E., Casado-Anguera, V., Kravitz, A.V., Thompson, K.R., Tomasi, D.G., Navarro, G., Cordomi, A., Pardo, L., Lluís, C., Dessauer, C.W., Volkow, N.D., Casado, V., Ciruela, F., Logothetis, D.E., Zwilling, D., 2018. Essential control of the function of the striatopallidal neuron by pre-coupled complexes of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramers and adenylyl cyclase. *Front. Pharmacol.* 9, 243.
- Ferré, S., Bonaventura, J., Tomasi, D., Navarro, G., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Casado, V., Volkow, N.D., 2016. Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology* 104, 154–160.
- Ferré, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.B., Fuxe, K., 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (16), 7238–7241.
- Fiorentini, C., Savoia, P., Savoldi, D., Missale, C., 2013. Receptor heteromers in Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 12 (8), 1101–1113.
- Fiorentini, C., Busi, C.B., Sano, P.F., Missale, C., 2010. Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10 (1), 87–92.
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P.F., Di Luca, M., Missale, C., 2003. Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and sensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 278 (22), 20196–20202.
- Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P., Levine, M.S., 2002. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J. Neurophysiol.* 88 (6), 3010–3020.
- Frankowska, M., Marcellino, D., Adamczyk, P., Filip, M., Fuxe, K., 2013. Effects of cocaine self-administration and extinction on D2-like and A2A receptor recognition and D2

- like/Gi protein coupling in rat striatum. *Addict. Biol.* 18 (3), 455–466.
- Frederick, A.L., Yano, H., Trifileff, P., Vishwasrao, A.D., Biezonski, D., Meszaros, J., Urizar, E., Sibley, D.R., Kellendonk, C., Sonntag, K.C., Graham, D.L., Colbran, R.J., Stanwood, G.D., Javitch, J.A., 2015. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Mol. Psychiatr.* 20 (11) 1373–1388.
- Fuxe, K., Tarakanov, A., Romero-Fernandez, W., Ferraro, L., Tanganelli, S., Filip, M., Agnati, L.F., Garriga, P., Diaz-Cabiale, Z., Borroto-Escuela, D.O., 2014. Diversity and bias through receptor-receptor interactions in GPCR heteroreceptor complexes. Focus on examples from the dopamine D2 receptor heteromerization. *Front. Endocrinol.* 5, 71.
- Fuxe, K., Ungerstedt, U., 1974. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptors. *Med. Biol.* 52 (1), 48–54.
- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M.G., Bories, C., Beaulieu, J.M., De Koninck, Y., Parent, A., 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., Espallargues, J., Mailly, P., De Bundel, D., de Kerchove d'Exaerde, A., Herve, D., Girault, J.A., Valjent, E., Krieger, P., 2013. Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. *Front. Neural Circ.* 7, 124.
- Girault, J.A., Valjent, E., Caboche, J., Hervé, D., 2007. ERK2: a logical and gate critical for drug-induced plasticity? *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (1), 77–85.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., Heintz, N., 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425 (6961), 917–925.
- Hasbi, A., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2010. Heteromerization of dopamine D2 receptors with D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10 (1), 93–99.
- Hasbi, A., Fan, T., Alijanian, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2009. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (50), 21377–21382.
- Hasbi, A., Perreault, M.L., Shen, M.Y.F., Fan, T., Nguyen, T., Alijanian, M., Banasikowski, T.J., Grace, A.A., O'Dowd, B.F., Fletcher, P.J., George, S.R., 2018. Activation of dopamine D1-D2 receptor complex attenuates cocaine reward and reinstatement of cocaine-seeking through inhibition of DARPP-32, ERK, and ΔFosB. *Front. Pharmacol.* 8, 924.
- Hasbi, A., Perreault, M.L., Shen, M.Y., Zhang, L., To, R., Fan, T., Nguyen, T., Ji, X., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2014. A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism. *Faseb. J.* 28 (11), 4806–4820.
- He, Y., Li, Y., Chen, M., Pu, Z., Zhang, F., Chen, L., Ruan, Y., Pan, X., He, C., Chen, X., Li, Z., Chen, J.F., 2016. Habit formation after random interval training is associated with increased adenosine A2A receptor and dopamine D2 receptor heterodimers in the striatum. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 151.
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., Nakanishi, S., 2010. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66 (6), 896–907.
- Jin, D.Z., Xue, B., Mao, L.M., Wang, J.Q., 2015. Metabotropic glutamate receptor 5 up-regulates surface NMDA receptor expression in striatal neurons via CaMKII. *Brain Res.* 1624, 414–423.
- Kim, E., Sheng, M., 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (10), 771–781.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3 (8), 760–773.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269 (5231) 1737–1740.
- Kravitz, A.V., Tye, L.D., Kreitzer, A.C., 2012. Distinct roles of direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat. Neurosci.* 15 (6), 816–818.
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C., 2010. Regulation of parkinsonian motor behavior by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466 (7306), 622–626.
- Ladepêche, L., Dupuis, J.P., Bouchet, D., Doudnikoff, E., Yang, L., Campagne, Y., Bézard, E., Hosy, E., Groc, L., 2013. Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (44), 18005–18010.
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (6), 413–426.
- Lee, S.M., Kant, A., Blake, D., Murthy, V., Boyd, K., Wyrick, S.J., Mailman, R.B., 2014a. SKF-83959 is not a highly-biased functionally selective D1 dopamine receptor ligand with activity at phospholipase C. *Neuropharmacology* 86, 145–154.
- Lee, S.M., Yang, Y., Mailman, R.B., 2014b. Dopamine D1 receptor signaling: does Gα_q/phospholipase C actually play a role? *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 351 (1), 9–17.
- Lee, F.J.S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X.M., Liu, F., 2002. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Neuron* 111 (2), 219–230.
- Liao, G.Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H., Leonard, J.P., 2001. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-Methyl-D-aspartate receptor current. *Mol. Pharmacol.* 59 (5), 960–964.
- Lieberman, D.N., Mody, I., 1994. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369 (6477), 235–239.
- Liu, X.Y., Chu, X.P., Mao, L.M., Wang, M., Lan, H.X., Li, M.H., Zhang, G.C., Parekar, N.K., Fibuch, E.E., Haines, M., Neve, K.A., Liu, F., Xiong, Z.G., Wang, J.Q., 2006. Modulation of D2R-NR2B interaction in response to cocaine. *Neuron* 52 (5), 897–909.
- Lobo, M.K., Nestler, E.J., 2011. The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front. Neuroanat.* 5, 41.
- Lobo, M.K., Covington 3rd, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H., Dames-Werno, D., Dietz, D.M., Zaman, S., Koo, J.W., Kennedy, P.J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R.L., Deisseroth, K., Han, M.H., Nestler, E.J., 2010. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330 (6002), 385–390.
- Lopez-Cruz, L., San Miguel, N., Carratala-Ros, C., Monferrer, L., Salamone, J.D., Correa, M., 2018. Dopamine depletion shifts behavior from activity based reinforcers to more sedentary ones and adenosine receptor antagonism reverses that shift: relation to ventral striatum DARPP32 phosphorylation patterns. *Neuropharmacology* 138, 349–359.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2011. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular to circuit remodeling. *Neuron* 69 (4), 650–663.
- Marcellino, D., Roberts, D.C., Navarro, G., Filip, M., Agnati, L., Lluís, C., Franco, R., Fuxe, K., 2007. Increase in A2A receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal. *Brain Res.* 1143, 208–220.
- Missale, C., Fiorentini, C., Busi, C., Collo, G., Spano, P.F., 2006. The NMDA/D1 receptor complex as a new target in drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* 6 (8), 801–808.
- Moss, J., Bolam, J.P., 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28 (44), 11221–11230.
- Mott, A.M., Nunes, E.J., Collins, L.E., Port, R.G., Sink, K.S., Hockemeyer, J., Muller, C.E., Salamone, J.D., 2009. The adenosine A2A antagonist MSX-3 reverses the effects of the dopamine antagonist haloperidol on effort-related decision making in a T-maze cost/benefit procedure. *Psychopharmacology* 204 (1), 103–112.
- Nai, Q., Li, S., Wang, S.H., Liu, J., Le, F.J., Frankland, P.W., Liu, F., 2010. Uncoupling the D1-N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. *Biol. Psychiatry* 67 (3), 246–254.
- Navarro, G., Cordomi, A., Casado-Anguera, V., Moreno, E., Cai, N.S., Cortes, A., Canela, E.I., Dessauer, C.W., Casado, V., Pardo, L., Lluís, C., Ferre, S., 2018. Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. *Nat. Commun.* 9 (1), 1242.
- Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farre, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortes, A., Casado, V., Lluís, C., Ferre, S., Franco, R., Canela, E., McCormick, P.J., 2013. Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* 8 (4), e61245.
- Nestler, E.J., 2001. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci. Pract. Perspect.* 3 (1), 4–10.
- Nestler, E.J., 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 76 PtB, 259–268.
- Niethammer, M., Kim, E., Sheng, M., 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* 16 (7), 2157–2163.
- Nunes, E.J., Randall, P.A., Hart, E.E., Freeland, C., Yohn, E., Baqi, Y., Muller, C.E., Lopez-Cruz, L., Correa, M., Salamone, J.D., 2013. Effort-related motivational effects of the VMAT-2 inhibitor tetrabenazine: implications for animal models of the motivational symptoms of depression. *J. Neurosci.* 33 (49), 19120–19130.
- O'Dowd, B.F., Ji, X., Nguyen, T., George, S.R., 2012. Two amino acids in each of D1 and D2 dopamine receptor cytoplasmic regions are involved in D1-D2 heteromer formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (1), 23–28.
- Omkumar, R.V., Melinda, O., Kiely, M.J., Rosenstein, A.J., Min, K.T., Kennedy, M.B., 1996. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (49), 31760–31768.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (6), 383–400.
- Pardo, M., Lopez-Cruz, L., Valverde, O., Ledent, C., Baqi, Y., Muller, C.E., Salamone, J.D., Correa, M., 2012. Adenosine A2A receptor antagonism and genetic deletion attenuate the effects of dopamine D2 antagonism on effort-based decision making in mice. *Neuropharmacology* 62 (5–6), 2068–2077.
- Pascoli, V., Besnard, A., Kappès, V., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.A., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2011a. Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* 69 (3), 218–227.
- Pascoli, V., Turiault, M., Lüscher, C., 2011b. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behavior. *Nature* 481 (7379), 71–75.
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014a. Extracellular signal-regulated protein kinase1 and 2 activation by addictive drugs: a signal towards pathological adaptation. *Biol. Psychiatry* 76 (12), 917–926.
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallargues, J., Valjent, E., O'Connor, E.C., Lüscher, C., 2014b. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509 (7501), 459–464.
- Pei, L., Lee, F.J., Moszczynska, A., Vukusic, B., Liu, F., 2004. Regulation of D1 receptor function by physical interaction with NMDA receptors. *J. Neurosci.* 24 (5), 1149–1158.
- Perreault, M.L., Hasbi, A., Shen, M.Y.F., Fan, T., Navarro, G., Fletcher, P.J., Franco, R., Lanciego, J.L., George, S.R., 2016. Disruption of a dopamine receptor complex amplifies the actions of cocaine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26 (9), 1366–1377.
- Perreault, M.L., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2014. Dopamine D(1)-D(2) receptor heteromer regulates signaling cascades involved in addiction: potential relevance to adolescent drug susceptibility. *Dev. Neurosci.* 36 (3–4), 287–296.
- Perreault, M.L., Hasbi, A., Alijanian, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P.J., Seeman,

- P., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2010. The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *J. Biol. Chem.* 285 (47), 36625–36634.
- Podurriel, S.J., Spencer, T., Kovner, R., Baqi, Y., Muller, C.E., Correa, M., Salamone, J.D., 2016. Induction of oral tremor in mice by the acetylcholinesterase inhibitor galantamine: reversal with adenosine A2A antagonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 140, 62–67.
- Randall, P.A., Lee, C.A., Nunes, E.J., Yohn, S.E., Nowak, V., Khan, B., Shah, P., Pandit, S., Vemuri, V.K., Makriyannis, A., Baqi, Y., Muller, C.E., Correa, M., Salamone, J.D., 2014. The VMAT-2 inhibitor tetrabenazine affects effort-related decision making in a progressive ratio/choy feeding choice task: reversal with antidepressant drugs. *PLoS One* 9 (6), e99320.
- Rico, A.J., Dopeso-Reyes, I.G., Matinez-Pinilla, E., Sucunza, D., Pignataro, D., Roda, E., Marin-Ramos, D., Labandeira-Garcia, J.L., George, S.R., Franco, R., Lanciego, J.L., 2017. Neurochemical evidence supporting dopamine D1-D2 receptor heteromers in the striatum of the long-tailed macaque : changes following dopaminergic manipulation. *Brain Struct. Funct.* 222 (4), 1767–1784.
- Salamone, J.D., Collins-Praino, L.E., Pardo, M., Podurriel, S.J., Baqi, Y., Muller, C.E., Schwarzschild, M.A., Correa, M., 2013. Conditional neural knockout of the adenosine A(2A) receptor and pharmacological A(2A) antagonism reduce pilocarpine-induced tremulous jaw movements: studies with a mouse model of parkinsonian tremor. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23 (8), 972–977.
- Salamone, J.D., Farrar, A.M., Font, L., Patel, V., Schlär, D.E., Nunes, E.J., Collins, L.E., Sager, T.N., 2009. Differential actions of adenosine A1 and A2A antagonists on the effort-related effects of dopamine D2 antagonism. *Behav. Brain Res.* 201 (1), 216–222.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., Ferre, S., 2007. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* 83 (5), 277–292.
- Scott, L., Zelenin, S., Malmersjö, S., Kowalewski, J.M., Markus, E.Z., Nairn, A.C., Greengard, P., Brismar, H., Aperia, A., 2006. Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (3), 762–767.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Ehlers, M.D., 2003. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 45 (6), 755–767.
- Shen, M.Y., Perreault, M.L., Fan, T., George, S.R., 2015a. The dopamine D1-D2 receptor heteromer exerts a tonic inhibitory effect on the expression of amphetamine-induced locomotor sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 128, 33–40.
- Shen, M.Y., Perreault, M.L., Bambico, F.R., Jones-Tabah, J., Cheung, M., Fan, T., Nobrega, J.N., George, S.R., 2015b. Rapid anti-depressant and anxiolytic actions following dopamine D1-D2 receptor heteromer inactivation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25 (12), 2437–2448.
- Soriano, A., Ventura, R., Molero, A., Hoen, R., Casado, V., Cortés, A., Fanelli, F., Albericio, F., Lluis, C., Franco, R., Royo, M., 2009. Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J. Med. Chem.* 52 (18), 5590–5602.
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., Haganir, R.L., 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272 (8), 5157–5166.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hanse, K.B., Yuan, Y., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacol. Rev.* 62 (3), 405–496.
- Trifilieff, P., Ducrocq, F., van der Veldt, S., Martinez, D., 2017. Blunted dopamine transmission in addiction: potential mechanisms and implications for behavior. *Semin. Nucl. Med.* 47 (1), 64–74.
- Trifilieff, P., Martinez, D., 2014. Imaging addiction: D2 receptors and dopamine signaling in the striatum as biomarkers for impulsivity. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 498–509.
- Trifilieff, P., Rives, M.L., Urizar, E., Piskorski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slattman, M., Gullberg, M., Javitch, J.A., 2011. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 51 (12), 111–118.
- Valjent, E., Corvol, J.C., Pagès, C., Besson, M.J., Maldonado, R., Caboche, J., 2000. Involvement of extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 20 (23), 8701–8709.
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., Greengard, P., Hervé, D., Girault, J.A., 2005. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2), 491–496.
- Verma, V., Hasbi, A., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2010. Dopamine D1-D2 receptor Heteromer-mediated calcium release is desensitized by D1 receptor occupancy with or without signal activation: dual functional regulation by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* 285 (45), 35092–35103.
- Volkow, N.D., Morales, M., 2015. The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell* 162 (4), 712–725.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Logan, J., Alexoff, D., Fowler, J.S., Thanos, P.K., Wong, C., Casado, V., Ferre, S., Tomasi, D., 2015. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Transl. Psychiatry* 5, e549.
- Wang, J.Q., Guo, M.L., Jin, D.Z., Xue, B., Fibuch, E.E., Mao, L.M., 2014. Role of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* 728, 183–187.
- Wang, M., Wong, A.H., Liu, F., 2012. Interaction between NMDA and dopamine receptors: a potential therapeutic target. *Brain Res.* 1476, 154–163.
- Wittmann, M., Marino, M.J., Henze, D.A., Seabrook, G.R., Conn, P.J., 2005. Clozapine potentiation of N-Methyl-D-aspartate receptor currents in the nucleus accumbens: role of NR2B and protein kinase A/Src kinases. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 313 (2), 594–603.
- Woods, A.S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluis, C., Franco, R., Ferré, S., 2005. Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J. Mol. Neurosci.* 26 (2–3), 125–132.
- Yao, W.D., Speelman, R.D., Zhang, J., 2008. Dopamine signaling in dendritic spines. *Biochem. Pharmacol.* 75 (11), 2055–2069.
- Zhang, J., Xu, T.X., Hallett, P.J., Watanabe, M., Grant, S.G.N., Isacson, O., Yao, W.D., 2009. PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the D1R/PSD/NMDAR receptor complex. *J. Neurosci.* 29 (9), 2948–2960.