



HAL
open science

Rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par les substances addictives et le stress

Marie-Charlotte Allichon

► To cite this version:

Marie-Charlotte Allichon. Rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par les substances addictives et le stress. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS362 . tel-04558786

HAL Id: tel-04558786

<https://theses.hal.science/tel-04558786>

Submitted on 25 Apr 2024

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

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



Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Spécialité Neurosciences
École doctorale Cerveau – Cognition – Comportement

Présentée par
Marie-Charlotte Allichon

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Sujet de thèse :

Rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations à long terme induites par les substances addictives et le stress

Soutenue le 28 novembre 2023

Devant le jury composé de :

Dr. Jean-Antoine Girault
Dr. Julie Perroy
Dr. Manuel Mameli
Dr. Catherine Le Moine
Dr. Pierre Paoletti
Dr. Jocelyne Caboche
Dr. Jacques Barik
Dr. Sébastien Parnaudeau
Dr. Peter Vanhoutte

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Invitée
Invité
Invité
Directeur de Thèse

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury. Merci à mes rapporteurs, **Julie Perroy** et **Manuel Mameli**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie sincèrement pour le temps que vous consacrez à la lecture de ce manuscrit. Un grand merci également à mes examinateurs, **Catherine Le Moine** et **Pierre Paoletti**, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et pour le temps que vous m'accordez. Je tiens enfin à adresser mes remerciements à **Jean-Antoine Girault** pour avoir accepté il y a quatre ans de faire partie de mon comité de suivi de thèse, et aujourd'hui de présider mon jury. C'est pour moi un grand honneur de vous confier à tous les cinq l'évaluation de mon travail !

Peter, j'estime la chance que j'ai eue de t'avoir comme directeur de thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse avec toi, en compagnie des hétéromères. Merci pour le temps que tu m'as consacré, pour ta patience et ta bienveillance. Merci de m'avoir si bien encadré et épaulé à chaque étape, tant personnellement que dans le design des manipes, la compréhension des projets, et même pour gérer les aléas administratifs (et on sait...). Merci pour toute la confiance et la liberté que tu m'as accordée, pour tes relectures, mais aussi de m'avoir permis d'assister et de présenter mon travail à de nombreux congrès, de participer activement aux collaborations au sein de l'équipe et en dehors. De m'avoir donné l'opportunité d'encadrer des étudiants en stage. Et peut-être finalement le plus important, merci aussi pour les nombreuses bières et blagues partagées ! Du fond du cœur, je te remercie pour tout, je n'aurai pu espérer mieux pour me lancer dans la recherche que ta compagnie.

Jocelyne, je te remercie de m'avoir accueillie en stage de master 1, de m'avoir donnée envie de poursuivre en thèse, et pour la confiance que tu m'as accordé sur tes projets, et pour tes conseils toujours avisés. Merci de m'avoir emmenée avec toi présenter mon travail en congrès en Sardaigne, ce fut un peu roots, et c'était génial ! J'ai adoré tous ces moments passés.

Jacques, merci pour ce projet incroyable, pour ta bienveillance, ton optimisme et ton énergie qui semblent inépuisables, que ce soit sous la grisaille parisienne ou le (presque) beau temps de Nice (Je persiste à dire que la Bretagne est plus jolie !). Merci pour tout ! **Seb**, je sais que tu sais, mais je tiens sincèrement à te remercier de t'être impliqué dans ma thèse et pour nous avoir aidés avec Peter à lancer le projet morphine. Merci pour ton aide sur les manipes « pilotes », qui nous auront valu des heures à l'animalerie devant la dernière version en date du démineur, à parler de sujet d'actualité passionnant sur un téléphone dernier cri. Merci pour tes bons conseils, ton humour bancal et pour avoir toujours été dans les parages (oui oui, je pensais aussi au Buisson !).

Merci à toi **Sandrine** pour toutes ces discussions matinales, pour ton énergie toujours débordante et tes encouragements ces derniers mois. Un grand merci à **Nicolas**, le roi des épines, merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, à concevoir et réparer mes macros PLA, et pour toutes ces discussions enrichissantes !

Merci également à **Pierre** pour avoir pris part à mon comité de suivi de thèse et pour sa bienveillance tout au long de ma thèse. Merci à **Paula** pour sa gentillesse, son calme et pour sa pédagogie sur l'électrophysique tout du long. Merci à Jonathan, Ying et Jozsef pour leur aide sur le projet morphine et un grand merci à **Jonathan** pour sa gentillesse.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble de mes collègues et aujourd'hui amis qui composent la dream team SNRG. Un immense merci à Dame **Katleen** qui a très largement illuminé ma thèse grâce à sa voix de schtroumpfs de 5 ans et demi et sa passion pour les *KitKat ball*. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout le soutien que tu m'as apporté, pour toutes les conneries faites et dites, et toutes ces parties de ping-pong verbales passionnantes. Merci d'avoir pris soin de moi et de m'avoir permis d'y

arriver. **Faustine**, reine des épines, et étrangement la seule (presque) normande avec un accent du sud dans mon entourage ! Grimpeuse rageuse toujours de bonne humeur, détentrice d'expression loufoque et amie d'exception. Merci pour tous ces bons moments au labo, à l'escalade et à la blanche, ainsi que pour ton soutien ces deux dernières années. Merci à notre petit clown de l'open-space, pour son cœur immense et sa générosité envers les autres et tous ces bons moments, allant des galères ronge-crâne en chirurgie aux tortillas à l'institut... que dire ! Merci pour tout **Lisa**. Ensuite, il y a **Baptiste**, un spécimen attachant, brillant, capable de grandes imitations et majoritairement localisé sur sa balançoire, accompagné de son café soluble. Merci d'être un binôme de bureau et de manipe exceptionnel, pour ton humour douteux et ton rage-quit légendaire ! **Adèle**, très souvent des péripéties à vélo à partager, un casque sur la tête, et toujours prête à rigoler et réchauffer l'ambiance avec un chant du sud qui vous met de bonne humeur. Tu es la relève des hétéromères !

Merci également aux anciens membres de l'équipe que j'ai eu la chance de connaître. Merci à **Marine** et **Arthur** pour votre extrême bienveillance. Merci **Vincent** de m'avoir encadré à la paillasse en M1, pour m'avoir accepté dans ce que l'on appelle encore aujourd'hui le cagibi, et pour tes blagues un peu drôles quand même. Merci **Estefani** de m'avoir accordé de ton temps pendant ta fin de thèse et pour ta gentillesse. Un très grand merci à **Andry** pour sa pédagogie, sa générosité et sa passion évidente pour les sciences. Je te suis reconnaissante pour avoir été ta relève et d'avoir eu la chance de prendre mes marques à tes côtés.

Merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, de près ou de loin, au cours de ma thèse. Merci à **Ilona** d'avoir été ma toute première expérience d'encadrante, merci pour ton aide et tout ce que tu as réussi à maîtriser en si peu de temps, ton aide m'a été précieuse. Merci également à **Lionel** pour ton aide. Vous m'avez permis de me dédoubler et je vous en suis grandement reconnaissante.

Merci à ces étudiants en stage qui finalement deviennent également des amis. Merci à mon **Guillaume**, aka guish, d'être un ami aussi bienveillant, à l'écoute, drôle et d'avoir été un vrai rayon de soleil pendant ma thèse. Merci à toi **Justin-ooo-** (aka Grand C) pour être une vraie tête à claque dotée d'un sarcasme peut-être plus grand que le mien. D'autre part, merci d'avoir supporté mes blagues nulles, partagé nos goûts musicaux et tous ces concerts de rock complètement dingues. Merci pour ton aide ces derniers mois et pour toutes nos sessions d'esc' et lever de coude, dernièrement sous le soleil de panam'. Même si parfois j'en peup' de tes balivernes, elles m'auront été indispensables.

Merci aux membres de NPS dont j'ai eu la chance de croiser la route : **Théo, Delnia, Maroun, Kadia, Estelle, Agnès, Hervé, Benjamin, Marine, Chloé, Sonja, Gauthier, Alice, Chaimae, Virgile, Jessica, Suzanne, Nolwenn**...Ainsi qu'aux membres de l'IDPA. Merci à **Sandrine Picaud**, pour ta bienveillance et d'avoir veiller sur moi durant toutes ces heures au A2L2. Merci également aux membres de la plateforme de phénotypage.

Maroun, my dear, we did it! Merci pour ton soutien, de toujours voir le côté positif et surtout de rigoler à mes nombreux memes... I've really enjoyed all these moments with you ! Ma chère **Delnia**, tu as été mon rayon de soleil khurde depuis le tout premier jour. Merci pour tout l'amour que tu offres autour de toi et tous ces moments au labo comme en-dehors. Ta présence me manque chaque jour. **Théo**, mon « alcolyte » préf et mon partner-in-crime au A3, merci d'avoir partagé avec moi toutes ces journées, semaines et week-end au labo, ce qui représente maintenant quelques années. Merci pour ces pauses caf'-clopes et d'avoir été mon plus grand pilier durant cette thèse. Merci pour tous ces fous rires, ces blagues nulles réciproques et toutes tes histoires à dormir debout et situations cocasses. Merci d'avoir toujours été là.

Bien qu'ils aient quitté Jussieu pour s'expat' un peu plus loin, je ne peux que vous remercier sincèrement **Maxime, Éléonore, Joachim** et **Élise**. Ce congrès à Montréal suivi du petit road trip québécois à vos côtés fut incroyable et des plus plaisants. Merci pour tout.

Ma **Mélanie**, j'ai eu la chance de t'avoir à mes côtés dès le master à Angers, puis au labo pendant deux ans, et j'ai adoré chacun de nos moments et péripéties. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour m'avoir soutenu dans tous les aspects de ma vie, pour ton accent du sud qui me manque tous les jours, nos pauses goûters, nos week-ends et randonnées, ainsi que nos sessions piscine à 7h du matin en compagnie d'un Gary-toss pas toujours d'accord. Merci à toi **Gary** pour ton humour désopilant et pour m'avoir sorti de nombreuses fois de mes galères informatiques toujours improbables. Merci à tous les deux pour ces dernières années, et en particulier dernièrement pour avoir mis Hugo sur mon chemin. Merci **Hugo** pour tout l'amour, le calme et le soutien que tu m'apportes au quotidien, je me sens chanceuse de t'avoir à mes côtés.

Merci également à **Lisa**, toulousaine et binôme de stage londonien, pour ton enthousiasme à toute épreuve et ton émerveillement constant pour la vie. Merci d'être là depuis, pour ton amitié et ton accent du sud qui réchauffe le cœur. Merci à **Yoann**, binôme de L3 rémois, pour son amitié depuis toutes ces années. Merci à **Madeleine**, ma sœur de cœur, pour ta présence dans ma vie d'aussi longtemps que je m'en souviens.

Je sais bien que j'écris actuellement la troisième page de mes remerciements, mais qui serai-je aujourd'hui si je n'avais pas ces irréductibles bretons dans ma vie ? Merci d'avoir été ma seconde famille.

Tinaïg, je ne pouvais rêver mieux que ta présence dans cette folle aventure. Qui aurait pu prédire que nos chemins se seraient entremêlés de la seconde à la thèse. Des TPE sur la schizophrénie en Bretagne jusqu'à un doctorat parisien sur l'addiction... Tu as été l'un des piliers de ma vie les plus importants depuis ces presque quinze années, et vital pendant cette thèse. Merci d'avoir toujours été là, d'avoir su me soutenir toutes ces années, et de m'avoir laissé faire partie de ta vie. Merci d'avoir supporté mes conneries de toute sorte, d'avoir vécu avec moi toutes ces péripéties, voyages, rando, plages, cheval, soirées bretonnes et parisiennes, week-end. Merci d'être un soutien inébranlable, d'avoir toujours les bons mots. Je suis honorée de ta présence à mes côtés et j'espère pour encore tellement d'années. Je suis tellement fière de la personne que tu es, et fascinée par l'énergie que tu mets dans tout ce que tu accomplis, rien ne t'arrête jamais. Merci à **Valentin** pour toutes ces années incroyables également, les plats de pâtes du petit déj' avant une grosse journée de ski, ainsi que ton accent breton qui rappelle si souvent le retour au bercail.

Lucie, ou DJ lux pour les intimes, organisatrice de folie fermière et de soirées déguisées en cheffe. Merci d'être une amie si précieuse et d'avoir rempli ma vie de folie pure et de joie toutes ces années. Avec **Aurélien**, vous faites une sacrée équipe ! Merci pour tout.

Ma **Gwen**, *gwe*, comme tu le disais si bien, une blonde a toujours besoin de sa brune. Merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir éclairé ma lanterne dans les moments de doutes. J'ai adoré chacun de nos moments, et bon sang il y en a eu ! Merci d'avoir été là du collège au lycée breton, jusqu'en master à Angers et pendant ma thèse à Paris. Merci pour ces soirées, après-midi à la plage, les concours et balades à cheval sous le soleil comme sous la tempête, pour ces festivals, et j'en passe. Merci d'être toujours sincère et entière. Un grand merci à ta famille, pour leur soutien et leur bienveillance tellement précieuse depuis toutes ces années, ainsi qu'à **Ludo** !

Liza, une acolyte dont tout le monde rêve ! Je suis chanceuse d'avoir croisé ta route, merci de ton soutien, de ta bonne humeur et de me suivre dans mes folies douces. **Léna** et **Guillaume**, merci d'être des fermiers et amis d'exceptions, et pour tout ces moments que l'on a partagés. Merci au Razzz, alias **Maxime**, pour clairement m'avoir toujours suivi dans mes bêtises, voire d'en être l'investigateur. Merci pour ton soutien, tes séances de kiné salvatrices, ton humour douteux et d'être là pour tes amis même avec ton emploi du temps de ministre de l'EAG. **Charlotte**, merci d'être un sacré bout de femme, inspirante, ambitieuse et présente depuis toutes ces années.

Claire, je te dois énormément durant cette thèse. Merci d'avoir veillé et pris soin de ce que j'ai de plus chère pendant toute la durée de ma thèse, je n'aurai pu y arriver sans ton aide.

Merci à ma **famille** de bretons, nantais, chartripontains et parisiens. Votre soutien et nos moments durant toutes ces années m'ont permis d'arriver jusqu'à ces lignes. Un merci tout particulier au best **parrain** of the world pour m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ma vie, et de donner autant de force et de courage aux plus jeunes ! Merci à **Laurence** pour ton aide dans les dernières relectures et ton enthousiasme pour mon travail qui réchauffe le cœur.

Ma petite **mamie**, c'est avec une larme ou deux au coin de l'œil que je souhaite te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi depuis toujours. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, présente et de m'avoir laissé une liberté sans pareille. Merci pour toutes ces parties de petits chevaux endiablées me permettant de m'occuper pendant le confinement, mais aussi de faire une pause dans la thèse et l'écriture. Merci d'avoir pris soin de moi tout ce temps et, plus important encore, d'avoir été mon refuge – ma maison toutes ces années. Tu m'as donné ce dont j'avais le plus besoin.

À ma **sœur** et mon **papa**, pour qui les mots ne suffiront pas à exprimer ma gratitude pour tout le soutien et l'amour qu'ils m'ont témoigné. Merci papa pour la force, le courage et la résilience que tu me donnes depuis toujours. Merci de toujours me pousser à « voir plus loin », à m'investir dans tout et à y croire à fond. Merci à ma petite sœur d'avoir été ma jumelle maléfique dans toutes nos péripéties, d'être le pilier le plus important de ma vie, d'être toujours prête à rire et à faire les 400 coups à phipi. Je suis plus que reconnaissante de t'avoir à mes côtés chaque jour et pour toute la vie. « Nul ami ne vaut une sœur ». Je vous aime !

À Nico et Raf, les « bestiaux » qui partagent ma vie depuis de nombreuses années, et sans qui mon monde ne tournerait pas rond.

Un immense merci à tous ! Maintenant que j'ai fini mon monologue, je vous laisse essayer de vous reconnaître sur cet incroyable dessin réalisé par Kadia, que je remercie sincèrement pour ce beau souvenir.

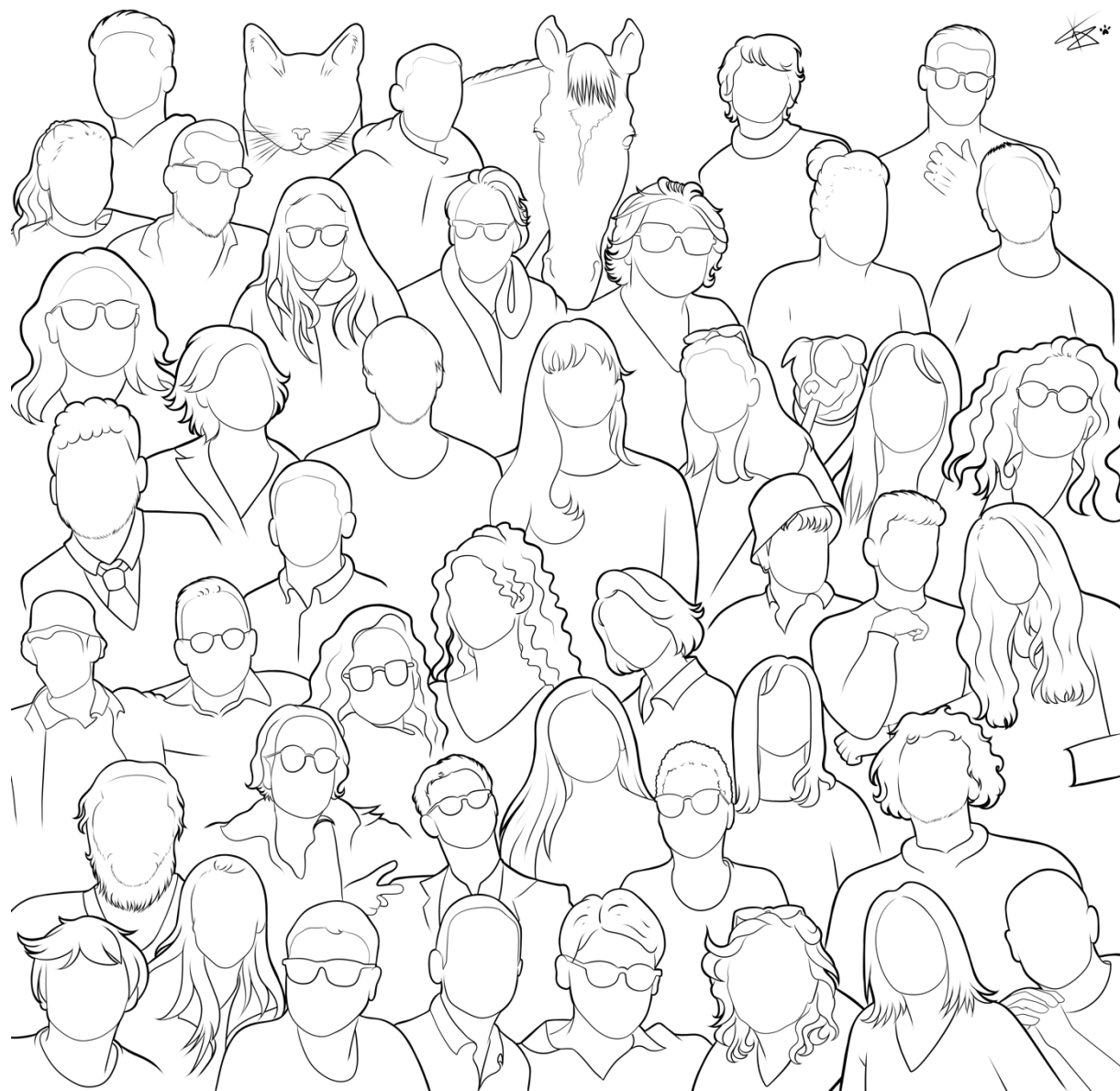


Table des matières

Table des figures	4
Résumé	6
Abstract	7
Abbréviations	8
Introduction	11
Chapitre 1 : Apprentissage lié à la récompense en conditions physiologiques et pathologiques	12
I. Circuit de la récompense – Découverte, anatomie et circuiterie	12
1. Découverte du circuit de la récompense : notions de plaisir, apprentissage et motivation	13
2. Structures et connexions impliquées dans le circuit de la récompense	17
3. Implication du circuit de la récompense dans l'aversion.....	19
II. Erreur de prédiction de la récompense, dopamine, et apprentissage lié à la récompense .	20
1. La dopamine.....	20
2. L'erreur de prédiction de la récompense	22
III. Addiction et détournement du circuit de la récompense	25
IV. Modèles animaux de l'addiction	29
1. Sensibilisation locomotrice	30
2. Préférence de place conditionnée	31
3. Auto-administration.....	32
Chapitre 2 : De la signalisation aux circuits et au comportement : adaptations cellulaire-spécifiques dans des modèles précliniques d'addiction	34
I. Les ganglions de la base	34
1. Organisation générale des ganglions de la base	34
2. Le striatum, structure d'entrée des ganglions de la base.....	36
3. Les voies directe et indirecte des ganglions de la base	38
4. Populations neuronales du striatum.....	39
a. Les MSN	40
b. Autres populations : Interneurones GABAergiques et cholinergiques	42
5. Voie directe et indirecte : historique et controverse.....	43
II. Rôle des MSN dans les réponses aux psychostimulants	46
III. Rôle des interactions dopamine-glutamate au sein du striatum dans les réponses aux psychostimulants et mécanismes moléculaires sous-jacents	51
1. Les récepteurs de la dopamine	51
a. Les récepteurs de type D1	53
b. Les récepteurs de type D2	54
2. Les récepteurs du glutamate	55
a. Les AMPAR.....	57
b. Les récepteurs du kaïnate.....	57
c. Les NMDAR	57
3. Convergence des signaux DAergiques et glutamatergiques en réponse aux psychostimulants	59
IV. Rôle des hétéromères DAR-NMDAR en réponses aux psychostimulants	64
1. D1R-NMDAR.....	64
2. D2R-NMDAR.....	69

3. Modulations et fonctions des hétéromères DAR-NMDAR dans les réponses aux psychostimulants	71
Chapitre 3 : Implication des circuits de récompense et d'aversion dans les comportements addictifs induits par les opioïdes	77
I. Les opioïdes : enjeu de société et focus sur la morphine	77
1. Un enjeu de société	77
2. La morphine, extraite de l'opium	78
II. Le système opioïde endogène et ses effets sur le circuit de la récompense et l'aversion ...	78
1. Le récepteur mu aux opioïdes.....	79
2. Le récepteur kappa aux opioïdes.....	82
3. Le récepteur delta aux opioïdes.....	84
III. Le circuit de la récompense et les symptômes de manque liés au sevrage aux opioïdes	84
1. Les symptômes de manque induits par un sevrage aigu ou prolongé aux opioïdes	84
2. Protocole de sevrage aux opioïdes et effets comportementaux associés	85
3. Implication du circuit de la récompense et de l'aversion dans le sevrage aux opioïdes	87
IV. Différences et similitudes entre psychostimulants et opioïdes : focus sur le NAc	88
V. Lien entre le circuit de la récompense et l'analgésie induite par les opioïdes.....	89
1. Les douleurs chroniques	89
2. Implications du NAc dans la perception de la douleur	91
Chapitre 4 : La dépression	94
I. Les comorbidités entre l'addiction et les désordres mentaux liés au stress.....	94
II. Définition, épidémiologie et enjeux sociétaux de la dépression	95
III. Facteurs de risques de la dépression	97
IV. Traitements actuels et nouvelles approches.....	97
V. Modèles animaux pour étudier la dépression.....	99
1. Vue d'ensemble des modèles animaux	99
2. Le stress chronique de défaite sociale	99
VI. Dépression et circuit de la récompense	101
1. La susceptibilité et la résilience au stress	101
a. Voies DAergiques.....	101
b. Les voies glutamatergiques innervant le NAc.....	103
c. Modification moléculaires et cellulaires des neurones du NAc	103
2. Détournement du circuit de la récompense par le stress	105
Objectifs.....	107
Résultats.....	108
Résultats Article I	109
Résultats partie II	110
Conclusion générale, discussion et perspectives.....	135
I. Modulation des hétéromères DAR-NMDAR dans les modèles précliniques d'addiction et de dépression	136
II. Etude du rôle des hétéromères DAR-NMDAR en réponse à la morphine	139

III. Balance entre l'activité D1R- et D2R-MSN et rôle des hétéromères dans des modèles précliniques de dépression et d'addiction	141
IV. Remodelage du microcircuit striatal.....	143
V. Alternative à la perturbation des complexes DAR-NMDAR à l'aide d'une stratégie virale	146
<i>Références bibliographiques.....</i>	147
<i>Annexes.....</i>	181

Table des figures

Figure 1 Illustration descriptive du conditionnement Pavlovien.	14
Figure 2 Système expérimental permettant d'évaluer l'autostimulation chez les rats.	15
Figure 3 Schéma représentatif des structures cérébrales principales du circuit de la récompense également impliquées dans l'aversion.	18
Figure 4 Schéma simplifié de la synthèse de la dopamine.	21
Figure 5 Encodage de l'erreur de prédiction de la récompense par les neurones dopaminergiques.	23
Figure 6 Populations distinctes de neurones dopaminergiques codant la valeur et la saillance motivationnelles.	24
Figure 7 Les différentes phases de l'addiction aux drogues.	26
Figure 8 Mécanisme d'action des drogues addictives au sein de la VTA provoquant une libération de DA dans les structures cibles comme le NAc.	27
Figure 9 Comparaison des réponses phasiques de la DA en réponse à la nourriture et à la cocaïne dans le NAc et leurs implications potentielles sur l'apprentissage.	29
Figure 10 Schéma représentatif d'un labyrinthe circulaire appelé cyclotron.	30
Figure 11 Schéma illustratif du paradigme de la CPP.	32
Figure 12 Dispositif expérimental d'auto-administration.	33
Figure 13 Voies d'entrées et de sorties des ganglions de la base.	35
Figure 14 Illustrations représentatives de l'organisation du striatum chez l'homme (A) et chez la souris (B), associée à ses connexions.	36
Figure 15 Transition de la consommation volontaire initiale à la perte de contrôle à l'origine de l'addiction.	38
Figure 16 Schéma illustratif du circuit local des ganglions de la base.	39
Figure 17 Représentations schématiques des populations neuronales du striatum.	40
Figure 18 Convergence des entrées glutamatergiques et DAergiques au niveau des MSN du striatum.	41
Figure 19 Représentation schématique des circuits de la voie directe et indirecte.	42
Figure 20 Ancien et nouveau concept des voies directe et indirecte du NAc.	44
Figure 21 Schéma de la connectivité intra-striatale entre les interneurons et les neurones de projection.	45
Figure 22 Schéma représentant la plasticité synaptique liée à la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne.	50
Tableau 2 Caractéristiques principales des DAR.	52
Figure 23 Schémas représentatifs de l'implication du glutamate (GLU) et de la dopamine (DA) dans les réponses comportementales induites par la cocaïne.	56
Figure 24 Illustration des événements cellulaires et moléculaires recrutés de la membrane plasmique au noyau dans les neurones D1R- et D2R-MSN, en réponse aux psychostimulants.	62
Figure 25 Représentation schématique des interactions directes entre NMDAR et D1R.	65
Figure 26 Schéma représentatif de l'interaction physique directe, ou hétéromérisation, entre D1R et GluN1 NMDAR.	65
Figure 27 Schéma de la diffusion latérale de D1R médiée par NMDAR conduisant à une interaction directe fonctionnelle et réciproque.	67
Figure 28 Stratégie d'étude des hétéromères D1R-NMDAR.	68
Figure 29 Rôle des hétéromères D1R-NMDAR dans la plasticité synaptique.	69
Figure 30 Schéma représentatif de l'interaction physique directe, ou hétéromérisation, entre D2R et GluN2B NMDAR.	70
Figure 31 Identification de la région spécifique de D2R interagissant avec GluN2B <i>in vitro</i>	70
Figure 32 Schéma représentatif du mécanisme de formation des hétéromères D2R-NMDAR.	71
Figure 33 La sensibilisation locomotrice induite par l'administration chronique de cocaïne module l'hétéromérisation D1R- et D2R-NMDAR.	72

Figure 34 Stratégie virale pour étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR <i>in vivo</i>	73
Figure 35 Rôles différentiel de l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans le contrôle des effets récompensants de la cocaïne.	74
Figure 36 Le blocage des hétéromères DAR-NMDAR n'altère pas la CPP induite par une récompense naturelle.....	75
Figure 37 L'hétéromérisation D2R-NMDAR est accrue dans les échantillons de cerveau post-mortem d'individus souffrant de troubles liés à l'utilisation de psychostimulants, malgré une diminution de l'expression de D2R.	76
Figure 38 Taux de décès par overdose aux États-Unis entre 1999 et 2021, ajustés selon l'âge et la catégorie d'opioïdes.	77
Figure 39 Illustration du Pavot à opium.	78
Figure 40 Fonction et localisation des MOR dans les neurocircuits de l'addiction.....	82
Figure 41 Fonction et localisation des KOR dans les neurocircuits de l'addiction.	83
Figure 42 Schéma chronologique comparatif des symptômes négatifs induits par le sevrage aigu et prolongé aux opioïdes chez l'Homme (A) et les rongeurs (B).	87
Figure 43 Représentation schématique de protocoles d'évaluation de la sensibilité à la douleur chez le rongeur.	90
Figure 44 Protocole de stress chronique lié à la défaite sociale (CSDS).....	100
Figure 45 Schéma représentatif de la technique de <i>Proximity Ligation Assay (PLA)</i>	137
Figure 46 Schéma représentatif des afférences dopaminergiques, glutamatergiques et GABAergiques marquées dans les souris 3 couleurs.....	139
Figure 47 Schéma récapitulatif du déséquilibre provoqué par la cocaïne, la morphine et la dépression sur la balance D1R- et D2R-MSN du NAc.	142
Figure 48 Schéma expérimental pour identifier les changements morphologiques des collatérales D1R-MSN sur D2R-MSN induites par l'exposition à stress chronique.....	144
Figure 49 Schéma expérimental permettant de moduler le microcircuit striatal et d'observer des changements dans l'expression du phénotype dépressif.	145

Résumé

L'addiction et la dépression sont des troubles psychiatriques qui se caractérisent par une augmentation de dopamine (DA) dans la partie ventrale du striatum, le nucleus accumbens (NAc), ce qui engendre des altérations de la transmission glutamatergique excitatrice dans le circuit de récompense et déclenche des altérations comportementales persistantes. Il apparaît donc important de déterminer les mécanismes par lesquels la DA module les transmissions glutamatergiques dans ces maladies psychiatriques. Les signaux DA et glutamate convergent sur le NAc au niveau des neurones épineux de taille moyenne (MSN), qui sont ségrégués en deux sous-populations suivant qu'ils expriment le récepteur de la DA de type 1 (D1R-MSN) ou de type 2 (D2R-MSN). D'un point de vue fonctionnel, la stimulation de D1R-MSN et D2R-MSN favorise et inhibe le renforcement, respectivement. Les travaux de l'équipe ont montré que l'interaction physique (hétéromérisation) entre le D1R et le récepteur NMDA (NMDAR) du glutamate permettait la facilitation de la transmission glutamatergique par la DA dans les D1R-MSN, alors que d'autres laboratoires ont établi que l'interaction D2R-NMDAR est responsable de l'inhibition des NMDAR par la DA dans les D2R-MSN. Récemment, une étude à laquelle j'ai participé a montré que l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR, induite par la cocaïne dans le NAc, jouaient un rôle clé dans les adaptations moléculaires, cellulaires et comportementales induites par ce psychostimulant.

Des altérations de la transmission glutamatergiques par la DA au sein du NAc étant rencontrées aussi bien dans des modèles précliniques d'addiction que de dépression, nous avons émis l'hypothèse que l'hétéromérisation DAR-NMDAR pourrait être un substrat moléculaire commun à ces deux pathologies. Pour étudier l'impact des DAR-NMDAR dans la dépression, nous avons utilisé un modèle préclinique de défaite sociale chronique (CSDS) qui engendre un phénotype susceptible chez une fraction des souris qui présentent une aversion sociale, une anxiété accrue et une anhédonie, alors que certaines souris sont dites résilientes car, bien que stressées, ne montrent pas de phénotype dépressif. Nous avons montré une hétéromérisation D1R-NMDAR accrue dans le NAc associée au phénotype dépressif aussi bien chez la souris que chez l'Homme. À l'aide d'une stratégie virale permettant le blocage des interactions DAR-NMDAR de manière contrôlée dans le temps, nous avons montré que cibler les interactions D1R-NMDAR empêche le développement et le maintien des symptômes dépressifs ainsi que l'impact du stress sur l'activité des MSN. De manière surprenante, nous montrons que l'inhibition des D1R-NMDAR prévient des effets du CSDS sur l'activité des D1R-MSN, mais également sur les D2R-MSN. Ceci nous a poussés à étudier les effets du stress sur les collatérales inhibitrices réciproques entre ces deux populations neuronales et nous avons montré que le phénotype susceptible est associé à une augmentation des collatérales issues des D1R-MSN projetant sur les D2R-MSN.

Dans une seconde partie de mon travail, j'ai souhaité déterminer si le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans les adaptations induites par les psychostimulants pouvait être généralisé à une autre classe de drogue que sont les opioïdes. J'ai pu montrer que le développement des propriétés hédoniques de la morphine était associé à une hétéromérisation D2R-NMDAR, mais pas D1R-NMDAR dans le NAc, dont le blocage prévient le développement des propriétés renforçantes induites par la morphine. En revanche, cibler ces hétéromères n'impacte pas les propriétés psychoactives de cette drogue observées chez les souris. J'ai également développé des approches expérimentales qui me permettront d'étudier la modulation et le rôle de ces complexes de récepteurs dans les symptômes de sevrage induits par l'arrêt de l'exposition à la morphine, ainsi que sur les propriétés analgésiques de cette drogue. Dans son ensemble, ce travail a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de comportement de type addictif et dépressif et renforce l'hypothèse que cibler ces complexes de récepteurs puisse avoir un potentiel thérapeutique non seulement dans la dépendance et la dépression, mais aussi potentiellement pour d'autres troubles psychiatriques liés un déséquilibre de la DA et glutamate dans le système nerveux central.

Abstract

Addiction and depression are psychiatric disorders characterized by increased dopamine (DA) in the ventral part of the striatum, the nucleus accumbens (NAc), leading to alterations in excitatory glutamatergic transmission in the reward circuit and triggering persistent behavioral changes. It is therefore crucial to understand the mechanisms through which DA modulates glutamatergic transmissions in these psychiatric diseases. DA and glutamate signals converge onto medium-sized spiny neurons (MSN) of the NAc that are segregated into two subpopulations based on their expression of dopamine receptor type 1 (D1R-MSN) or type 2 (D2R-MSN). Functionally, stimulation of D1R-MSN promotes reinforcement, while D2R-MSN inhibits it. Previous research from our team demonstrated that the physical interaction (heteromerization) between D1R and glutamate NMDA receptor (NMDAR) facilitates glutamatergic transmission by DA in D1R-MSN, while other studies established that D2R-NMDAR interaction inhibits NMDAR by DA in D2R-MSN. Recently, a study I participated in showed that cocaine-induced D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization played a key role in the molecular, cellular, and behavioral adaptations induced by this psychostimulant.

Since alterations in glutamatergic transmission by DA within the NAc are found in both preclinical addiction and depression models, we hypothesized that DAR-NMDAR heteromerization could be a common molecular substrate for these two pathologies. To study the impact of DAR-NMDAR heteromerization in depression, we used a preclinical model of chronic social defeat stress (CSDS), which induces a susceptible phenotype in a fraction of mice, characterized by social aversion, increased anxiety, and anhedonia. Some mice, although stressed, do not show depressive behavior and are considered resilient. We observed an increased D1R-NMDAR heteromerization in the NAc associated with the depressive phenotype in both mice and humans. Using a viral strategy allowing a temporally-controlled blockade of DAR-NMDAR interactions, we found that targeting D1R-NMDAR interactions prevents the development and maintenance of depressive symptoms, as well as the impact of stress on MSN activity. Surprisingly, we showed that inhibiting D1R-NMDAR prevents the effects of chronic social stress on both D1R-MSN and D2R-MSN activity. This led us to study the effects of stress on reciprocal inhibitory collaterals between these two neuronal populations and we found that the susceptible phenotype is associated with an increase in collaterals from D1R-MSN projecting onto D2R-MSN.

In the second part of my work, I aimed to determine if the role of DAR-NMDAR heteromers in psychostimulant-induced adaptations could be generalized to another class of drugs, namely opioids. I demonstrated that the development of hedonic properties of morphine was associated with D2R-NMDAR heteromerization, but not D1R-NMDAR, in the NAc, which blockade prevented the development of morphine-induced reinforcing properties. However, targeting these heteromers did not affect the psychoactive properties of morphine observed in mice. I also developed experimental approaches that will allow me to study the modulation and role of these receptor complexes on withdrawal symptoms induced by cessation of morphine exposure, as well as on the analgesic properties of this drug. Overall, this work has provided a better understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying addictive and depressive-like behaviors, supporting the hypothesis that targeting these receptor complexes may have therapeutic potential not only in addiction and depression but potentially also in other psychiatric disorders related to an imbalance of DA and glutamate in the central nervous system.

Abbréviations

5HT	Neurones sérotoninergiques
A2AR	Récepteur A2A de l'adénosine
AAV9	Adénovirus adéno-associés de type 9
AC	Adénylcyclase
ACPC	Acide 1-aminocyclopropanecarboxylique
AMPA	Récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AMPC	Adénosine-monophosphate cyclique
BLA	Amygdale basolatérale
BNST	Noyau du lit de la strie terminale
C1	Cassette C1 de la partie C-terminale de GluN1
C1 Δ	Cassette C1 de GluN1 tronquée sur 9 acides aminés basiques
Ca ²⁺	Ion calcium
CaM	Calmoduline
CAMKII	Protéine kinase dépendante de la calmoduline
CART	Transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine
CDC	Centre de prévention et de contrôle des maladies
ChAT	Interneurones cholinergiques
CK1	Kinase caséine 1
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CPA	Aversion de place conditionnée
CPP	Préférence de place conditionnée
CR	Réponse conditionnée
CS	Stimulus conditionné
CSDS	Stress de défaite sociale chronique
CTD	Domaine C-terminal ou partie carboxyle terminale
D1R	Récepteur D1 de la dopamine
D1R-MSN	MSN exprimant le récepteur D1
D1R-NMDAR	Hétéromères formés entre D1R et NMDAR
D2L	Isoforme long du récepteur D2 de la dopamine
D2R	Récepteur D2 de la dopamine
D2R-MSN	MSN exprimant le récepteur D2
D2R-NMDAR	Hétéromères formés entre D2R et NMDAR
D2S	Isoforme court du récepteur D2 de la dopamine
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAR	Récepteur de la dopamine
DARPP-32	Phosphoprotéine de Mr 32 kDa régulée par la DA et l'AMPC
DAT	Transporteur de la dopamine
DLS	Striatum dorso-latéral
DMS	Striatum dorso-médian
dMSN	Neurones épineux moyens de la voie directe
DOR	Récepteur delta (δ) aux opioïdes
DREES	Direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques
DSM-V	Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux
EMCDDA	Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies
EPM	Labyrinthe surélevé
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSI	Interneurones à pointe rapide

FST	Test de nage forcée
GABA	Acide γ -amino-butyrrique
GAD67	Acide glutamique décarboxylase 67
GB	Ganglions de la base
GC	Hormone glucocorticoïde
GFP	Protéine fluorescente verte
GP	Globus pallidus
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GPe	Globus pallidus externe ou latéral
GPi	Globus pallidus interne ou médial
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GRK2	Kinase 2 de du récepteur couplé à la protéine G
GST	Glutathione-S-transférase
HFS	Stimulation à haute fréquence
HPA	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
Hz	Hertz
IEG	Gènes immédiats précoces
iGluR	Récepteur ionotropique du glutamate
IL3	Troisième boucle intracellulaire de D2R
iMSN	Neurones épineux moyens de la voie indirecte
IPSC	Courants post-synaptiques inhibiteurs
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
K ⁺	Ion potassium
KAR	Récepteur du kaïnate
KO	<i>Knock-out</i>
KOR	Récepteur kappa (κ) aux opioïdes
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
LDTg	Tegmentum latérodorsal
LH	Hypothalamus latéral
LHb	Habénula latérale
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mEPSC	Courants postsynaptiques excitateurs miniatures
Mg ²⁺	Ion magnésium
mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
MHb	Habénula médiale
mIPSC	Courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures
MOR	Récepteur mu (μ) aux opioïdes
mPFC	Cortex préfrontal ventromédian
MSN	Neurones épineux de taille moyenne
mV	Millivolts
NA	Noradrénaline
Na ⁺	Ion sodium
NAC	Noyau accumbens
NCS	Capteur d'AMPC neuritogène
NIDA	Institut National de l'Abus des Drogues
NMDAR	N-méthyl-D-aspartate
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronal
NO	Oxyde nitrique
NST	Noyau sous-thalamique
NTg	<i>Non-target</i>

OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OT	Tubercule olfactif
PA	Potentiel d'action
PAG	Substance grise périaqueducule
PCP	Phencyclidine
PFC	Cortex préfrontal
PKA	Protéine kinase A
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PLTS	Interneurones à pointe à bas seuil
PP1	Phosphatase 1
PPE	Préproenképhaline
PPN	Noyau pédonculopontin
PPTA	Préprotachykinine
PSD	Densité postsynaptique
PTSD	Syndrome de stress post-traumatique
PV	Parvalbumine
PVT	Noyau paraventriculaire du thalamus
RD	Raphé dorsal
RE	Réticulum endoplasmique
RFP	Protéine fluorescente rouge
RMTg	Noyau tegmental rostromédial
RPE	Erreur de prédiction de la récompense
rtTA	Protéine transactivatrice de la tétracycline
SC	Colliculus supérieur
SCH23390	Antagoniste des récepteurs D1 de la dopamine
SIT	Test d'interaction sociale
SN	Substance noire
SNc	Substance noire compacte
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SNr	Substance noire réticulée
SPN	Neurones de projection du striatum
STEP	Tyrosine phosphatase enrichie du striatum
SUD	Trouble lié à l'abus de substance
TAN	Neurones à activité tonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
Tg	<i>Target</i>
TH	Tyrosine hydroxylase
THC	Tétrahydrocannabinol
TRE	Elément de réponse à la tétracycline
TST	Test de suspension de la queue
UCMS	<i>Unpredictable Chronic Mild Stress</i>
UR	Réponse non-conditionnée
US	Stimulus non-conditionné
vGAT	Transporteur vésiculaire du GABA
VP	Pallidum ventral
VTA	Aire tegmentale ventrale

Introduction

Chapitre 1 : Apprentissage lié à la récompense en conditions physiologiques et pathologiques

Le cerveau humain est composé de régions interconnectées qui orchestrent collectivement notre comportement, nos émotions et notre cognition. Parmi ses nombreuses subtilités, le circuit de la récompense se distingue comme un réseau neurobiologique fondamental qui sous-tend les processus de **motivation**, de prise de décision et d'**apprentissage**. Ce chapitre vise à fournir un aperçu de l'anatomie, de l'organisation et de la fonction du circuit de la récompense, avec un intérêt particulier sur le rôle de la **dopamine** (DA) et le concept d'**erreur de prédiction de récompense** (RPE).

I. Circuit de la récompense – Découverte, anatomie et circuiterie

L'acquisition ou la modification de compétences, de connaissances et de comportements est facilitée par le processus central de l'apprentissage. Dans le contexte de l'évolution, les animaux montrent une aptitude continue à ajuster leur comportement, visant à optimiser les choix pour leur survie et leur bien-être. Cette adaptation est intrinsèquement liée à la prise de décision, qui découle de la répétition de rencontres favorables et gratifiantes, tout en évitant les rencontres périlleuses ou indésirables. Un consensus prévaut sur le fait que l'apprentissage motivé par les récompenses trouve ses bases de traitement neuronal dans des secteurs distincts du système nerveux central (SNC), constituant collectivement ce que l'on appelle le **circuit de la récompense**.

Le circuit de la récompense, également connu sous le nom de système mésocorticolimbique, est un réseau neuronal complexe composé de plusieurs régions cérébrales interconnectées qui travaillent de concert pour traiter les récompenses et renforcer les comportements adaptatifs, afin de guider la recherche d'expériences positives et d'éviter les expériences négatives.

En outre, l'interaction complexe entre ces régions permet le traitement des récompenses, l'apprentissage des expériences, l'ajustement des comportements en fonction des résultats et la régulation de la motivation et des réponses émotionnelles. La dérégulation de ce circuit a été impliquée dans divers troubles neuropsychiatriques, notamment l'addiction, la dépression, le trouble bipolaire et la schizophrénie. Comprendre les fonctions de ces structures et leurs interactions fournit des informations précieuses sur les mécanismes sous-jacents à ces troubles et sur les stratégies thérapeutiques potentielles. Ainsi, la dépendance, caractérisée par une recherche excessive et non contrôlée de récompenses, implique un détournement du système dopaminergique (DAergique). Les troubles de l'humeur comme la dépression ou la schizophrénie peuvent provenir d'une altération de la signalisation DAergique, contribuant à l'anhédonie, c'est-à-dire une perte de la capacité à ressentir le plaisir. La schizophrénie a également été associée à un traitement perturbé de la RPE (voir **Chapitre 1-II-2**), conduisant à des perceptions déformées de la réalité (Allichon et al., 2021; Höflich et al., 2019; Salery et al., 2020).

1. Découverte du circuit de la récompense : notions de plaisir, apprentissage et motivation

L'étude du comportement animal a permis l'exploration du circuit de la récompense. De nombreux chercheurs et théoriciens ont contribué de manière significative à notre compréhension de l'apprentissage.

Au début du XX^{ème} siècle, Edward Thorndike a avancé le principe de la « loi de l'effet », qui a ouvert la voie à de nombreuses théories sur le conditionnement comportemental. La loi de l'effet stipule essentiellement que les comportements suivis de résultats positifs ou plaisants seraient plus susceptibles d'être répétés, c'est-à-dire que leur probabilité d'occurrence serait augmentée, tandis que les comportements associés à des résultats négatifs ou déplaisants le seraient moins. Pour illustrer ces effets, il a conçu une « boîte à puzzle » dans laquelle il est nécessaire d'appuyer sur un levier, de tirer une corde ou de marcher sur une pédale pour s'en échapper. Des chats affamés ont été placés dans cette boîte, à l'extérieur de laquelle une récompense alimentaire était positionnée. La première évasion réussie est apparue par hasard. La satisfaction d'obtenir la récompense a renforcé le lien entre l'action (appuyer sur le levier) et le résultat positif (obtenir de la nourriture). C'est ce que Thorndike a appelé la « loi de l'exercice ». Ainsi, au fil des essais successifs, le chat est devenu plus efficace pour s'échapper de la boîte. Le temps nécessaire pour s'échapper a diminué à mesure que le chat a appris à associer l'action spécifique au résultat positif. L'association entre le contexte et le comportement est renforcée (Thorndike, 1933, 1911).

En 1927, les travaux du psychologue Ivan Pavlov ont jeté les bases du behaviorisme et ont profondément influencé la compréhension de l'apprentissage et du comportement. Pavlov a travaillé sur le conditionnement classique : une forme d'apprentissage dans laquelle un stimulus neutre est associé à un stimulus significatif pour susciter une réponse spécifique. Ses recherches les plus célèbres ont porté sur les chiens et leurs réflexes salivaires.

Dans son étude, Pavlov a observé que lorsqu'on présentait de la nourriture à un chien, celui-ci salivait naturellement. Dans ce contexte, la nourriture est le **stimulus non-conditionné** (US, *unconditioned stimulus*) et la salivation en réponse à la nourriture est la **réponse non-conditionnée** (UR, *unconditioned response*). Cette réponse est non apprise et automatique. Ensuite, il a introduit un stimulus neutre, tel qu'une cloche, avant de présenter la nourriture aux chiens. Au départ, la cloche n'avait pas de lien intrinsèque avec la salivation et n'a pas entraîné de réponse chez le chien. Cependant, après avoir combiné de manière répétée le son de la cloche avec la présentation de la nourriture, les chiens ont commencé à faire l'association entre les deux. Au fil du temps, les chiens ont commencé à saliver en réponse à la cloche seule, même lorsque la nourriture n'était pas présentée. La cloche était devenue un **stimulus conditionné** (CS, *conditioned stimulus*) et la salivation déclenchée par la cloche une **réponse conditionnée** (CR, *conditioned response*) (Figure 1).

Cette étude a permis de démontrer qu'un stimulus neutre peut acquérir la capacité d'évoquer une réponse par association. Ces travaux ont mis en évidence que les animaux pouvaient apprendre à associer des stimuli neutres à des stimuli significatifs, ce qui conduit à la formation de nouvelles réponses apprises. Il a également constaté que les chiens pouvaient généraliser leurs réponses conditionnées à des stimuli similaires, démontrant ainsi une capacité plus large à répondre à des stimuli ressemblant au CS. Inversement, la discrimination peut être apprise : les chiens faisaient la différence entre des stimuli similaires qui ne sont pas associés à l'US. De plus, si le CS (cloche) est

présenté à plusieurs reprises sans l'US (nourriture), l'association apprise s'affaiblit, ce qui entraîne une diminution du CR (salivation). Ce processus est connu sous le nom d'extinction. Toutefois, même après l'extinction, le CR peut réapparaître spontanément lorsque le CS est à nouveau présenté, bien que la réponse puisse être plus faible (Pavlov, 1927).

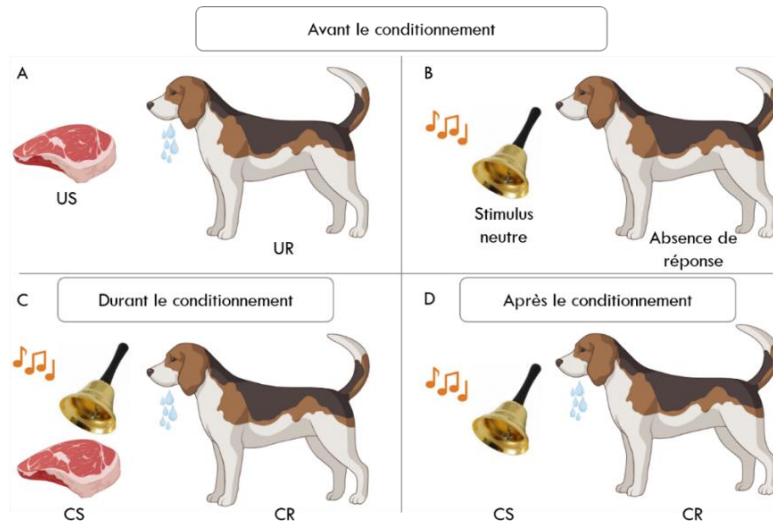


Figure 1 | Illustration descriptive du conditionnement Pavlovien.

(A) Avant le conditionnement, l'animal salive (UR) en réponse à un stimulus appétitif non-conditionné (US) ; (B) À l'inverse, la présentation d'un stimulus neutre comme le son d'une cloche ne déclenche pas de salivation chez l'animal. (C) Durant le conditionnement répété, une association entre le son de la cloche qui précède la récompense appétente se crée. (D) Après le conditionnement, le son de la cloche seul est devenu un stimulus conditionné (CS) et provoque une salivation chez l'animal, qui devient une réponse conditionnée (CR). Schéma réalisé avec BioRender.

En 1954, les neuroscientifiques James Olds et Peter Milner ont mené des expériences révolutionnaires sur des rats. Ils ont implanté des électrodes dans le cerveau de rats pour stimuler électriquement la région de la VTA (*Ventral tegmental Area*, qui contient les neurones à DA, abordé dans le **Chapitre 1-1-2**) au sein de la boîte de Skinner. Il s'agit d'un dispositif expérimental de conditionnement opérant inventé par BF. Skinner en 1937 où l'animal doit appuyer sur un levier pour recevoir une stimulation électrique (**Figure 2**). Lorsque les rats étaient autorisés à contrôler la stimulation en appuyant sur un levier, ils appuyaient de manière répétée et vigoureuse sur le levier pour répéter la stimulation. Olds et Milner ont constaté que la stimulation cérébrale semblait procurer du plaisir aux rats, au point d'ignorer d'autres activités primordiales comme manger et boire. Ils ont par la suite étendu leurs travaux à d'autres régions, incluant le faisceau médian du télencéphale, le pallidum ventral (VP), le thalamus ventral, le striatum ventral ou noyaux accumbens (NAc) et le cortex préfrontal (PFC) médian, ayant toutes en commun de recevoir des projections de la VTA. Cette expérience suggérait l'existence d'un circuit cérébral lié à la récompense et au plaisir (McBride et al., 1999; Olds, 1958; Olds and Milner, 1954; Olds and Fobes, 1981).

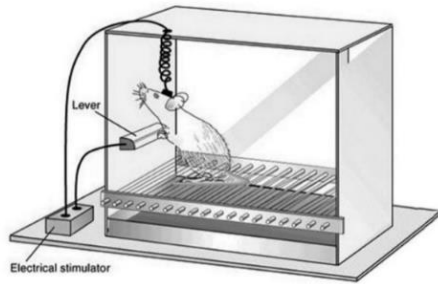


Figure 2 | Système expérimental permettant d'évaluer l'autostimulation chez les rats.

En appuyant sur le levier, le rat active une impulsion électrique qui est transmise à une zone précise de son cerveau. Si cette zone fait partie du circuit de la récompense, le rat va progressivement augmenter la fréquence de ses actions (Pessiglione, 2014).

En s'appuyant sur ces travaux, le neuroscientifique Wolfram Schultz a mené des recherches dans les années 1990 qui ont permis de mieux comprendre le rôle de la DA dans le circuit de la récompense. Ses travaux se sont basés sur des enregistrements électrophysiologiques permettant de mesurer l'activité *in vivo* des neurones DAergiques chez le primate. Il a découvert, entre autres, que ces neurones s'activaient lorsque les singes recevaient des récompenses inattendues. Cette découverte suggère un lien entre la libération de DA, l'anticipation de la récompense (RPE ; voir [Chapitre 1-II-2](#)) et l'expérience de récompenses agréables (Schultz et al., 1997). En parallèle, d'autres groupes ont mené des expériences permettant de mettre en lumière les projections dopaminergiques en provenance de la région du mésencéphale (VTA et la *Substance noire compacte*, SNC) sur ces régions spécialisées dans le traitement de la récompense (Falck and Hillarp, 1959). L'utilisation d'agonistes DAergiques par auto-administration dans ces régions a produits des effets motivationnels contrairement à l'auto-administration d'antagonistes DAergiques (McBride et al., 1999; Shizgal, 1997). Dans l'ensemble, ces données ont appuyé le rôle important de la DA dans ce système de récompense.

Au cours des années 1980, les psychologues Kent Berridge et Terry Robinson ont introduit les concepts d'aimer (*liking*) et de vouloir (*wanting*) en tant que composants distincts du circuit de la récompense. Ils ont proposé que la composante goût soit liée au plaisir réel ressenti lors de la réception d'une récompense (valeur hédonique de la récompense), tandis que la composante désir est associée à la motivation à rechercher des récompenses et à s'engager dans des comportements visant à les obtenir. Cette distinction a permis d'affiner la compréhension des fonctions complexes du circuit de la récompense (Berridge and Robinson, 2016). Dans le contexte de la théorie de Kent Berridge et de sa distinction entre le *liking* et le *wanting*, le concept de l'apprentissage (*learning*) joue également un rôle (Berridge, 2007a).

Le *learning* fait référence aux changements comportementaux qui surviennent en réponse aux récompenses elles-mêmes ou aux indices associés à ces récompenses. Plus précisément, le cerveau apprend à associer certains comportements, actions ou situations à des récompenses, ce qui influence nos actions futures. L'apprentissage lié aux récompenses implique la formation d'associations entre des actions spécifiques et les conséquences agréables qui en résultent. Par exemple, si une personne fait l'expérience du plaisir en mangeant un aliment particulier, le cerveau peut apprendre à associer cette action (manger cet aliment) avec la récompense (plaisir). En conséquence, cette personne sera plus encline à répéter ce comportement à l'avenir. Cette composante de la théorie contribue ainsi à expliquer comment les interactions entre le plaisir, la motivation et l'apprentissage sont liées dans le processus complexe de recherche et d'obtention de récompenses, bien que son rôle avec la DA soit encore débattue (Berridge, 2007a; Berridge et al., 2009; Robinson et al., 2005).

Par la suite, d'importantes contributions ont été apportées à la compréhension des mécanismes cérébraux sous-jacents à la dépendance. L'utilisation de drogues addictives a permis de découvrir que ces substances pouvaient détourner le circuit de la récompense (voir [Chapitre 1-III](#)), conduisant à un comportement compulsif de recherche de drogue ([Lüscher and Janak, 2021](#)). Cette recherche a mis en lumière le lien entre le circuit de la récompense et l'addiction. De plus, les progrès des techniques en neurosciences, telles que l'optogénétique et les méthodes d'imagerie avancées, ont permis aux chercheurs de mieux comprendre les subtilités du circuit de la récompense. Ces technologies ont permis aux scientifiques de manipuler et de visualiser des régions spécifiques du cerveau et des voies neuronales impliquées dans le traitement des récompenses ([Kravitz et al., 2012](#); [Lobo et al., 2010](#); [Tan et al., 2012](#); [Tsai et al., 2009](#); [van Zessen et al., 2012](#); [Witten et al., 2011](#)).

En conclusion, on peut définir l'apprentissage lié à la récompense grâce à ses trois grandes fonctions : elle est associée à une sensation de **plaisir** ou de satisfaction, physique ou morale (*liking*) ; elle peut induire un **apprentissage** (*learning*) ; et elle suscite de la **motivation** en créant des objectifs (*wanting*) ([Berridge et al., 2009](#); [Berridge and Robinson, 2003, 1998](#); [Schultz, 2006](#)).

Les récompenses possèdent des qualités hédoniques, engendrant ainsi un plaisir immédiat ou une émotion positive. Cette caractéristique inhérente aux récompenses joue un rôle central, car c'est la sensation de plaisir liée à ces récompenses qui engendre la motivation et facilite un apprentissage plus efficace. Si l'on adopte une perspective plus large, le goût se rapporte aux attributs agréables des stimuli - essentiellement les sensations joyeuses et positives suscitées par l'exposition à des stimuli spécifiques. Cependant, dans certains cas, l'impact gratifiant s'opère à un niveau subconscient. Souvent, le désir suit le goût. Lorsque la récompense déclenchée par une expérience est importante, elle suscite un désir puissant de revivre cette même expérience. Ce désir est plus communément appelé « saillance incitative » et peut être distingué, tant sur le plan physiologique que neuroanatomique, par des mécanismes qui sous-tendent l'appréciation. En outre, l'apprentissage désigne les changements de comportement induits par la récompense elle-même et/ou par des indices liés à la récompense ([Berridge, 2007a](#); [Berridge and Robinson, 2016](#)).

Enfin, la notion de motivation repose sur la fonction de récompense. Une récompense est un avantage matériel ou moral accordé ou reçu en échange d'une action positive, d'un service rendu ou de mérites particuliers. Cette perspective ramène à la théorie du conditionnement opérant ou instrumental, qui s'appuie sur l'idée de réaliser une action en vue d'obtenir une récompense. Elle agit comme un objectif qui pousse l'individu à répéter un comportement spécifique pour jouir à nouveau de cette gratification. Comme l'a souligné Schultz, « les récompenses vous incitent à en vouloir toujours plus » ([Schultz, 2006](#)). Néanmoins, dans la réalité, les notions d'apprentissage, de motivation et de plaisir interagissent de manière continue, s'influencent mutuellement. Le plaisir est souvent un prérequis à la motivation, et cette dernière est essentielle à la fois pour l'apprentissage et le renforcement. Ces trois éléments – apprentissage, motivation et plaisir – se révèlent indispensables pour favoriser l'apprentissage par le biais de la récompense.

Il est donc important de comprendre les circuits neuronaux ainsi que les processus moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces trois facettes de l'apprentissage lié à la récompense. Ces connaissances sont fondamentales pour ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques novatrices pour atténuer les

troubles associés à des altérations de l'apprentissage lié à la récompense, comme l'addiction et la dépression (Berridge et al., 2009; Robinson et al., 2005).

2. Structures et connections impliquées dans le circuit de la récompense

Les principaux acteurs de ce circuit de la récompense comprennent la VTA, le NAc, l'amygdale, le PFC, l'hypothalamus et l'hippocampe (Figure 3).

La **VTA** est une région riche en neurones DAergiques située dans le mésencéphale qui envoie des projections au NAc, au PFC, à l'amygdale et à l'hippocampe. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la libération de DA en réponse à des stimuli motivants et récompensants. Les projections de la VTA peuvent être subdivisées en voies mésocorticales et mésolimbiques, qui relient la VTA respectivement au PFC et au NAc. De plus, il existe des preuves que certains neurones de la VTA libèrent également du glutamate ou de l'acide γ -amino-butyrique (GABA), se projetant notamment sur le NAc. Ainsi, la VTA est une structure hétérogène composée majoritairement de neurones DAergiques (55-65%), mais également GABAergiques (30%) et glutamatergiques (5%). Certaines de ces sous-populations neuronales répondent différemment à des stimuli gratifiants ou aversifs (Bimpisidis and Wallén-Mackenzie, 2019; Burke et al., 2017; Cooper et al., 2017; Lammel et al., 2012, 2011; Pignatelli and Bonci, 2015; Russo and Nestler, 2013). D'autre part, la VTA reçoit des entrées excitatrices et inhibitrices d'une large distribution de zones cérébrales, notamment du tegmentum latérodorsal (**LDTg**) et du noyau tegmental rostromédial (**RMTg**) respectivement (Lammel et al., 2014).

Le **NAc** est l'une des régions clés du circuit de la récompense car il est souvent considéré comme une interface entre les régions sensorielles, motrices et limbiques du cerveau. Il est associé au plaisir, à la motivation et à la réaction aux récompenses. Il joue un rôle crucial dans le renforcement positif des comportements (voir **Chapitre 1-III**) (Russo and Nestler, 2013), mais également dans les processus émotionnels négatifs comme nous le verrons prochainement (Zhou et al., 2022).

Le **PFC**, en particulier le cortex préfrontal ventromédian (mPFC), envoie des projections glutamatergiques excitatrices vers le NAc pour guider les choix et les comportements en fonction de la valeur attribuée aux récompenses. Ainsi, il intervient dans la prise de décision, l'évaluation des conséquences et la régulation du comportement en fonction des récompenses et des punitions attendues (Cooper et al., 2017; Russo and Nestler, 2013).

L'**amygdale** envoie des signaux glutamatergiques au NAc et est impliquée dans le traitement des émotions et dans l'association des stimuli avec des émotions positives (récompense) ou négatives (peur). Elle attribue une valeur émotionnelle aux récompenses (Russo and Nestler, 2013). L'activation des projections de l'amygdale basolatérale (BLA) vers le NAc facilite la recherche de récompense et soutient le renforcement positif (Cooper et al., 2017; Zhou et al., 2022). La voie BLA-NAc serait également nécessaire dans les comportements d'évitement suite à un stimulus aversif (Ramirez et al., 2015), ainsi que dans la vulnérabilité au stress (Shen et al., 2019).

L'**hippocampe** est crucial pour la formation de la mémoire déclarative et la navigation spatiale. En raison de ses connexions réciproques denses (directes et indirectes) avec la VTA et le NAc, l'hippocampe renforcerait l'encodage de la mémoire en fonction de la valence d'un stimulus. Ainsi, il interagit avec le circuit de la récompense en codant et en récupérant les souvenirs associés aux

expériences enrichissantes. Il contribue à l'apprentissage et à la contextualisation des récompenses, ce qui est essentiel pour adapter le comportement en fonction des résultats passés (Russo and Nestler, 2013). De plus, ce circuit est impliqué dans les comportements de récompense et dans la mémoire aversive (Franco-García et al., 2023; Wisłowska-Stanek et al., 2023), et il a été démontré que sa modulation avait un impact sur les réponses locomotrices induites par les drogues d'abus et sur le comportement de recherche de drogues induit par des indices (Cooper et al., 2017).

Enfin, l'**hypothalamus** interagit avec d'autres parties du circuit de la récompense pour contrôler les comportements de recherche de récompenses. Il est inhibé par les neurones GABAergiques du NAc et projette sur la VTA et l'amygdale à travers ses neurones glutamatergiques. Il régule les fonctions neurovégétatives de l'organisme, c'est-à-dire les fonctions vitales telles que le rythme cardiaque ou la régulation thermique, des fonctions métaboliques comme la faim et la soif, et également la reproduction. Pour cela, il abrite une population hétérogène de neurones qui expriment et coexpriment de multiples neuropeptides, y compris l'hypocrétine, l'hormone de concentration de mélanine, le transcrite régulé par la cocaïne et l'amphétamine (CART) et la neurotensine (Russo and Nestler, 2013; Tyree and de Lecea, 2017).

Ces régions interagissent de manière complexe pour former le circuit de la récompense. Par exemple, le NAc reçoit une innervation glutamatergique dense du PFC, de l'amygdale et de l'hippocampe. Le PFC, l'amygdale et l'hippocampe forment des connexions glutamatergiques réciproques les uns avec les autres. En outre, chacune de ces régions reçoit des entrées sérotoninergiques des noyaux du raphé du mésencéphale et des entrées noradrénergiques du locus coeruleus pontin, et plusieurs sont innervées par des systèmes peptidiques hypothalamiques. Lorsqu'une personne est exposée à des stimuli gratifiants, comme la nourriture, l'argent, le plaisir émotionnel, ce circuit s'active, libérant de la DA et générant des sensations de plaisir et de satisfaction. Cette activation renforce les comportements associés à la recherche et à l'obtention de ces récompenses, ce qui a un impact sur la motivation et le comportement futur (Russo and Nestler, 2013).

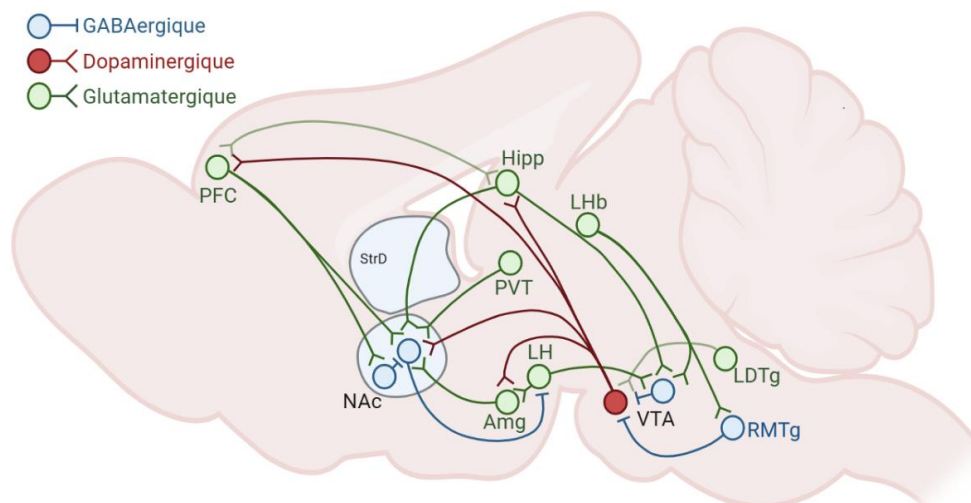


Figure 3 | Schéma représentatif des structures cérébrales principales du circuit de la récompense également impliquées dans l'aversion.

Les entrées dopaminergiques provenant de la VTA (en rouge) et glutamatergiques (en vert) convergent vers les neurones γ -aminobutyriques (GABA)ergiques (en bleu) du noyau accumbens (NAc) pour coordonner et réguler les comportements liés à la récompense, mais également à l'aversion. [PFC : cortex préfrontal ; Hipp :

hippocampe ; Amg : amygdale ; StrD : striatum dorsal ; PVT : noyau paraventriculaire du thalamus ; LHb : habénula latérale ; LH ; hypothalamus latéral ; LTDg : tegmentum latérodorsal ; RMTg : noyau tegmental rostromédial]. Adapté de Cooper et al., 2017; Nestler and Carlezon, 2006; Russo and Nestler, 2013. Schéma réalisé avec BioRender.

3. Implication du circuit de la récompense dans l'aversion

Certaines régions du cerveau, telles que le PFC et le NAc, sont impliquées à la fois dans la récompense et l'aversion. Ces régions évaluent la valeur émotionnelle des stimuli et contribuent à guider les choix en fonction des préférences individuelles et des expériences passées. Les réactions d'aversion peuvent entraîner des comportements d'évitement des stimuli désagréables ou dangereux. Ceux-ci peuvent être influencés par les expériences de renforcement négatif. Parfois, des stimuli aversifs peuvent aussi avoir des composantes gratifiantes, comme la sensation de soulagement après l'évitement d'une menace. Les interactions subtiles entre les circuits de récompense et d'aversion peuvent ainsi créer des réponses émotionnelles et comportementales complexes. Cet équilibre dynamique entre la recherche de plaisir et l'évitement des stimuli aversifs contribue à l'adaptation et à la survie des individus. De plus, des régions, non-définies comme appartenant au circuit de la récompense, alimentent ce circuit et contribuent au traitement des informations émotionnelles positives et négatives pour guider un comportement complexe en fonction des stimuli environnementaux (Pignatelli and Bonci, 2015; Russo and Nestler, 2013).

Des données récentes indiquent que l'habénula latérale (LHb) et le RMTg, également connu sous le nom de « queue de la VTA », sont impliqués dans la médiation de l'aversion. Les neurones glutamatergiques de la LHb projettent sur les neurones GABA de la VTA tandis qu'un sous ensemble de neurones GABAergiques du RMTg projettent quant à eux sur les neurones DAergiques de la VTA. De plus, la RMTg reçoit les projections glutamatergiques excitatrices de la LHb qui répondent à des stimuli aversifs. En retour, les neurones GABAergiques du RMTg projettent sur le shell du NAc (Figure 3) (Bourdy and Barrot, 2012; Cooper et al., 2017; Zhou et al., 2009; Lammel et al., 2014, 2012; Lecca et al., 2014; Mondoloni et al., 2022; Pignatelli and Bonci, 2015; Russo and Nestler, 2013).

L'**habénula** est souvent impliquée dans la perception des récompenses négatives, telles que les événements aversifs, les erreurs de prédiction et les résultats décevants. Elle est activée lorsque des événements ne correspondent pas aux attentes, ce qui peut induire des sentiments d'aversion et de déception. L'une des fonctions clé de l'habénula est d'inhiber la libération de DA provenant de la VTA. Lorsque l'habénula est activée, elle peut réduire la libération de DA, modulant la réponse aux récompenses positives. Par ailleurs, il a été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la dépression. En effet, une activité accrue de l'habénula a été associée à des symptômes dépressifs, et certaines théories considèrent cette structure comme un acteur potentiel dans les mécanismes sous-jacents à la dépression et à la diminution du plaisir (Hu et al., 2020; Lecca et al., 2014).

Plus récemment, les entrées glutamatergiques de sous-régions du thalamus, notamment des noyaux thalamiques de la ligne médiane tels que le noyau paraventriculaire (**PVT**), projetant sur le NAc, ont été mises en évidence. Contrairement aux entrées glutamatergiques provenant des régions décrites ci-dessus (hippocampe, PFC, amygdale) où la stimulation est gratifiante, l'activation directe de la voie PVT-NAc est aversive. En outre, il a été démontré que l'altération de l'activité du PVT abolissait les comportements liés à la drogue, comme la récompense et la recherche de cocaïne (Cooper et al., 2017; Zhou et al., 2022).

La partie dorsale du striatum est également une région cruciale pour l'intégration des réponses comportementales au renforcement positif et à la punition, qui impliquent des circuits différents (voir [Chapitre 2-I-1,2 et 5](#)) (Everitt and Robbins, 2013, 2005; Russo and Nestler, 2013).

En réalité, ces régions ont des fonctions beaucoup plus larges dans la régulation du comportement émotionnel et cognitif. En effet, la complexité des connexions réciproques et des circuits monosynaptiques locaux au sein du circuit de la récompense a fait de l'analyse des voies et des fonctions individuelles un défi méthodologique majeur. La manière dont ce circuit contribue à la dépression reste encore incertaine. Les réponses réduites aux expériences gratifiantes et les réponses exagérées aux expériences aversives, qui caractérisent la dépression, pourraient refléter des anomalies dans la perception et l'interprétation de la valeur de la récompense, dans la motivation pour les récompenses et dans la prise de décision qui s'ensuit.

II. Erreur de prédiction de la récompense, dopamine, et apprentissage lié à la récompense

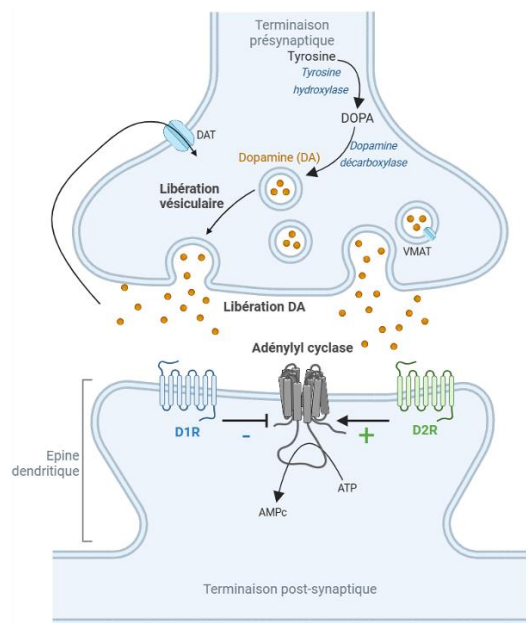
Au cœur du circuit de récompense se trouve la DA, un neurotransmetteur qui captive les neuroscientifiques depuis des décennies. L'histoire de la recherche sur la DA remonte au début du XX^{ème} siècle, avec sa découverte dans le cerveau de plusieurs animaux grâce à l'histofluorescence (Falck and Hillarp, 1959). Cette méthode est basée sur l'exposition de tissus lyophilisés à des vapeurs de formaldéhyde, permettant à la DA et à la noradrénaline (NA) d'être converties en molécules d'isoquinoléine qui émettent une fluorescence dans les longueurs d'onde jaune-vert au microscope (Björklund and Dunnett, 2007). Par la suite, l'importance de la DA dans le contexte de la récompense et du plaisir a commencé à émerger (Carlsson et al., 1962). Les travaux pionniers d'Arvid Carlsson ont jeté les bases de la compréhension du rôle de la DA dans la maladie de Parkinson, conduisant au développement de thérapies de remplacement de la DA. Le rôle de la DA s'étend bien au-delà de la fonction motrice. C'est un acteur central du système hédonique, médiateur de l'expérience de plaisir, de motivation et de renforcement. Les neurones DAergiques sont activés en réponse à des stimuli gratifiants, facilitant l'apprentissage des associations entre les actions et les résultats. L'interaction entre les différentes régions du cerveau et la transmission de la DA régule de manière complexe nos réponses aux récompenses, influençant nos choix et façonnant notre comportement.

1. La dopamine

La DA, également appelée 3-hydroxytyramine, est une substance chimique présente dans le cerveau, faisant partie de la famille des catécholamines aux côtés de la NA et de l'adrénaline. Ce sont des substances capables de moduler et d'ajuster les transferts d'influx nerveux dans les réseaux neuronaux. La DA est synthétisée, par une chaîne enzymatique, à partir de la tyrosine ([Figure 4](#)), et elle est majoritairement produite par les neurones DAergiques du mésencéphale situés dans la VTA, le champ rétrosubstantiel, et la SNc (Lammel et al., 2014; Speranza et al., 2021).

Figure 4 | Schéma simplifié de la synthèse de la dopamine.

La DA est synthétisée à partir de la L-tyrosine qui est transformée en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par



la tyrosine hydroxylase (TH). La L-DOPA est ensuite convertie en DA par la dopamine décarboxylase. La DA peut être stockée dans des vésicules grâce au transporteur vésiculaire de monoamine 2 (VMAT2) ou transformée en noradrénaline (NA) et adrénaline par d'autres enzymes (*non-montré*). Lorsque le cerveau est exposé à différents stimuli, les vésicules remplies de DA sont libérées dans la synapse. Ces vésicules de DA stimulent divers récepteurs DAergiques post-synaptiques (voir Chapitre 2-III-1). Les niveaux de DA extracellulaires sont régulés rapidement par des transporteurs de dopamine (DAT) présents dans les neurones pré-synaptiques. Les DAT récupèrent la DA extracellulaire, permettant son recyclage en milieu intracellulaire (Giros et al., 1991; Nirenberg et al., 1996). Ensuite, la DA peut être dégradée en acide homovanillique par des enzymes comme la monoamine oxydase (MAO) ou la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (*non-montré*), ou elle peut être ré-emmagasinée dans les vésicules pour compléter le cycle (García-Cazorla & Artuch, 2015; Szczupak & Martín, 2015). Schéma réalisé avec BioRender.

La libération et la recapture de la DA sont des processus étroitement régulés. Les neurones DAergiques de la VTA peuvent se trouver dans trois états électrophysiologiques différents : un état hyperpolarisé dit « inactif », un état actif avec une activité phasique et des décharges en bouffées et en état actif tonique avec un profil de décharge lent et régulier (Goto et al., 2007; Grace et al., 2007).

L'état **hyperpolarisé** dit inactif du neurone se traduit par une absence de potentiel d'action (PA). Les neurones ainsi « silencieux » peuvent être sous l'influence d'afférences inhibitrices, provenant notamment du VP (Floresco et al., 2001). Ils permettent une meilleure réactivité suite à l'exposition d'évènements saillants.

La libération **phasique** de DA est rapide et massive. Elle est provoquée par une augmentation de la fréquence de décharge des neurones DAergiques (~20 Hz), qui aboutit à une augmentation significative des taux extracellulaires de DA. Cette libération est synchronisée en réponse à des récompenses inattendues ou à des signaux (indices) associés à des récompenses (Schultz, 2000; Schultz et al., 1997; Ungless et al., 2004). Elle est fondamentale pour un apprentissage et un renforcement rapide. Cependant, les neurones DAergiques de la VTA peuvent également être inhibés par des stimuli aversifs (Ungless et al., 2004) et on peut supposer que toute augmentation de l'activité des neurones DAergiques provoquée par un stimulus aversif aigu (par exemple, un choc au pied) pourrait être due aux effets gratifiants de la fin du stimulus (Tanimoto et al., 2004). En effet, de nombreux travaux ont montré que les événements aversifs, stressants et saillants peuvent exciter les neurones DAergiques du mésencéphale et provoquer la libération de DA dans les structures cibles (pour revue, Lammel et al., 2014). Une étude réalisée chez la souris a montré qu'un nombre équivalent de neurones DAergiques de la VTA est activé ou inhibé par le pincement de la queue (Zweifel et al., 2011).

À l'inverse, la libération **tonique** de DA se traduit par une fréquence de décharge régulière des neurones DAergiques (1 à 6 Hz) en absence de stimulus permettant de maintenir des taux de base de DA extracellulaires faibles et ainsi maintenir les niveaux de base d'excitation et de motivation. Cela

signifie que même en l'absence d'événements spécifiques, il y a une libération constante de DA dans certaines régions cérébrales, due à l'activité spontanée des neurones DAergiques. Ce mode de libération contribue au maintien de l'état d'éveil et d'attention, ainsi qu'à la régulation générale de la motivation pour l'exploration, la recherche de récompenses et l'engagement dans des activités (Goto et al., 2007; Schultz, 2007).

La DA, longtemps appelée le neurotransmetteur du bien-être ou du plaisir, joue un rôle à multiples facettes dans le circuit de la récompense. Dans le passé, la DA était uniquement associée à la caractéristique hédonique des stimuli, qui est l'une des composantes de la récompense. Néanmoins, des études ultérieures ont montré que des souris, ayant une lésion des neurones DAergiques ou présentant une inactivation sélective du gène de la tyrosine hydroxylase (TH), présentaient un manque de motivation pour s'engager dans des comportements orientés vers un but. À l'inverse, la restauration de la DA par l'ajout de 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) a rétabli la motivation, confirmant ainsi que la DA encode plutôt la valeur motivationnelle (Berridge and Robinson, 1998). Par conséquent, outre la motricité, la DA est notamment importante pour signaler la valeur motivationnelle de certains stimuli (positifs ou négatifs, saillants, incertains, nouveaux), motiver des comportements orientés vers un but, prédire une récompense et faciliter la consolidation de la mémoire d'événements saillants (Berridge and Robinson, 1998; Bromberg-Martin et al., 2010; Schultz, 1998; Ungless et al., 2010; Wise, 2004). Les antagonistes de la DA sont capables d'atténuer la motivation à effectuer une action, avant même que les réponses motrices ne se produisent (Wise, 2004). Une dérégulation de la transmission DAergique a été impliquée dans des troubles du mouvement tels que la maladie de Parkinson, ainsi que dans certains syndromes psychotiques comme la schizophrénie, la toxicomanie ou encore la dépression (Speranza et al., 2021), soulignant l'importance d'élucider les mécanismes sous-jacents liés à la DA. Par ailleurs, l'interaction entre la RPE (voir partie suivante) et la DA constitue un mécanisme fondamental par lequel le cerveau adapte ses attentes et guide son comportement en fonction du résultat obtenu lors d'actions spécifiques. Cette relation complexe est la clé pour élucider les mécanismes neuronaux sous-jacents à l'apprentissage, à la prise de décision et aux dysfonctionnements observés dans toute une gamme de troubles psychiatriques.

2. L'erreur de prédiction de la récompense

Le concept de RPE joue un rôle clé dans le fonctionnement du circuit de la récompense, notamment dans l'apprentissage par renforcement. La RPE a été mise en évidence au cours des années 1990 par Wolfram Schultz et ses collaborateurs. Dans cette étude, l'objectif était d'étudier comment les singes apprennent à associer des signaux visuels à des récompenses alimentaires, et comment les neurones DAergiques du mésencéphale réagissent à ces signaux en fonction des attentes de la récompense. Ils ont ainsi implanté des microélectrodes pour enregistrer l'activité électrique émise par les neurones de la VTA durant une tâche comportementale chez le primate.

Ils ont observé qu'avant l'entraînement et pendant les phases initiales, la délivrance d'une récompense inattendue provoque une augmentation de la fréquence de décharge dans la plupart des neurones DAergiques (Figure 5A). Dans une seconde expérience, ils ont fourni la récompense une seconde après un stimulus visuel, au moyen d'un levier que le singe a appris à actionner lorsque le stimulus visuel apparaissait. De manière intéressante, la répétition de ce conditionnement entraîne progressivement une activation phasique des neurones DAergiques lorsque le stimulus apparaît, et non plus lorsque la

récompense est attribuée. Les neurones DAergiques sont capables d'adapter leur activité au fur et à mesure de l'apprentissage (**Figure 5B**). Les changements dans l'activité DAergique sont en accord avec un transfert de la réaction comportementale d'un animal de l'US à un CS dans le modèle de Pavlov, vu précédemment (**Figure 1**).

Dans la dernière expérience, les singes entraînés ayant appris l'association stimulus visuel-récompense sont exposés à ce même stimulus visuel sans l'obtention de la récompense. L'absence de récompense dans la seconde après l'apparition du stimulus visuel provoque une diminution rapide voir une pause de l'activité des neurones DAergiques en dessous de leur niveau d'excitation basal, au moment où la récompense aurait dû être délivrée (**Figure 5C**) (Schultz et al., 1997).

Ces trois expériences ont permis de montrer que les neurones DAergiques réagissent, à travers la libération de DA, non seulement à la récompense réelle, mais prenaient également en compte les attentes. Cette capacité d'encodage de la récompense effectuée par les neurones DAergiques, appelée RPE, se définit comme la différence entre la valeur attendue et la valeur perçue, selon la règle d'apprentissage de Rescorla-Wagner (Schultz, 2007). Dans ce modèle, les auteurs ont montré que l'efficacité des synapses, permettant l'association entre un stimulus et une récompense, est modifiée après chaque essai en fonction de la RPE et de la DA libérée (Pessiglione, 2014). Ainsi, la DA soutient l'apprentissage par renforcement en ajustant la force des connexions synaptiques entre les neurones (Schultz, 1998).

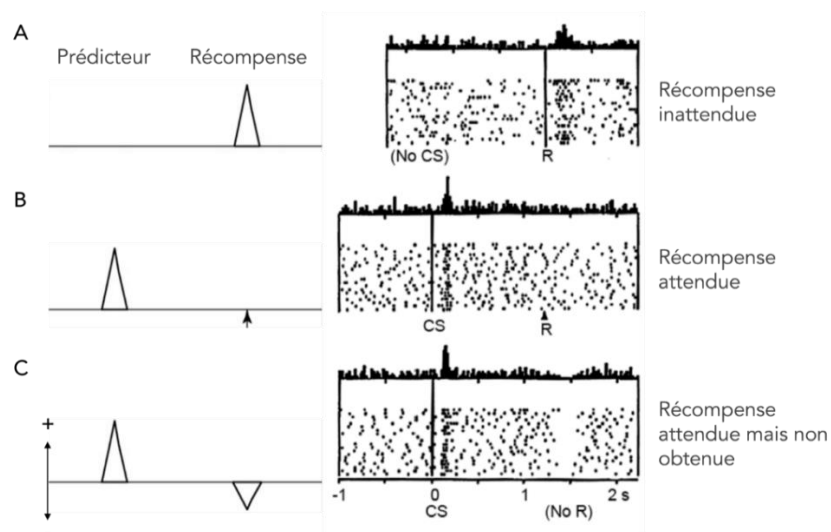


Figure 5 | Encodage de l'erreur de prédiction de la récompense par les neurones dopaminergiques.

(A) Avant l'apprentissage et en l'absence de prédicteur (no CS), la récompense sous forme de jus sucré (R) déclenche un signal DA, d'où une RPE positive. (B) Après apprentissage via un conditionnement opérant, le stimulus conditionné (CS) prédit la récompense (R) en provoquant des signaux DA lors de la présentation de l'indice et de la récompense. Il n'y a pas d'erreur de prédiction puisque le neurone DA est activé par le CS mais pas par la récompense. (C) Si la récompense n'est pas donnée après la présentation de l'indice, il y a une dépression des signaux DAergiques au moment où la récompense aurait dû se produire, ce qui représente une RPE négative. Chaque panneau montre l'histogramme temporel péri-événement et la trame des impulsions provenant du même neurone. Les distances horizontales des points correspondent aux intervalles en temps réel. Chaque ligne de points représente un essai. La séquence originale des essais est représentée de haut en bas. D'après Pessiglione, 2014 et Schultz et al., 1997.

En conclusion, lorsque la valeur de la récompense dépasse les attentes, une RPE positive se produit, entraînant une augmentation de la libération de DA. À l'inverse, lorsque la valeur de la récompense n'est pas celle attendue, une RPE négative s'ensuit, entraînant une diminution de la libération de DA. Ce processus permet au cerveau d'adapter, de façon dynamique, ses attentes et d'optimiser les stratégies de prise de décision. La RPE constitue un mécanisme puissant basé sur l'expérience de l'individu. La RPE positive renforce les comportements qui conduisent à des résultats favorables, tandis que la RPE négative encourage l'exploration de stratégies alternatives. Au fil du temps, le cerveau affine ses prédictions et recalibre ses réponses pour maximiser les récompenses et minimiser les risques.

Certains neurones DAergiques du mésencéphale (SNc et VTA) peuvent être activés suite à une récompense et inhibés suite à un événement de peur (comme une bouffée d'air par exemple). Toutefois, une autre partie de cette population neuronale peut être excitée par ces deux types de stimuli. Ces données peuvent s'expliquer par une différence anatomique entre la substance noire (SN) et la VTA. De nombreux neurones sont ainsi sensibles aux stimuli récompensants et aversifs d'autant plus si l'évènement n'a pas été prédit : ils réagissent lorsque les événements gratifiants sont plus gratifiants que prévu et lorsque les événements aversifs sont plus aversifs (**Figure 6**) (Matsumoto and Hikosaka, 2009). Cela montre que les réponses aversives sont véritablement causées par des prédictions sur des événements aversifs, excluant la possibilité qu'elles puissent être causées par des facteurs non spécifiques tels qu'un apport sensoriel brut ou des associations généralisées avec une récompense (Schultz, 2010).

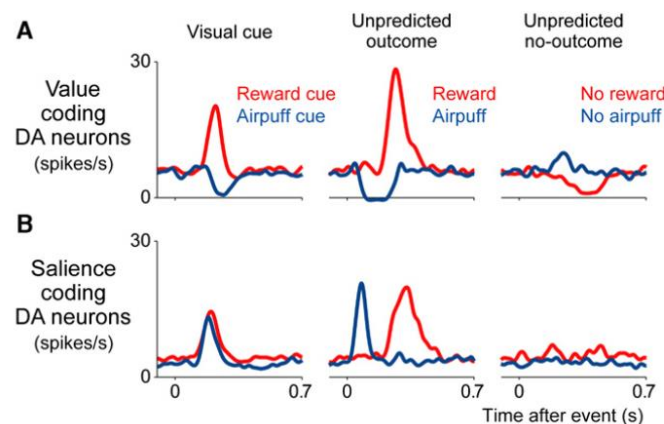


Figure 6 | Populations distinctes de neurones dopaminergiques codant la valeur et la saillance motivationnelles.

(A) Une population est excitée par les événements gratifiants et inhibée par les événements aversifs, comme si elle codait une valeur motivationnelle. (B) Une deuxième population est excitée par les événements à la fois gratifiants et aversifs de la même manière, comme si elle codait la saillance motivationnelle. De Matsumoto and Hikosaka, 2009 et adapté par Bromberg-Martin et al., 2010.

Par conséquent, les événements récompensants et aversifs modulent ainsi l'orientation de l'attention, le traitement cognitif et l'augmentation de la motivation générale. Seuls les événements neutres d'un point de vue motivationnel ne déclenchent pas de réaction (Berridge and Robinson, 1998; Bromberg-Martin et al., 2010). Il existe donc de plus en plus de preuves que les stimuli motivationnels, le stress, ainsi que les drogues addictives aboutissent à la libération de DA dans des projections DAergiques anatomiquement et fonctionnellement distinctes (Lammel et al., 2014, 2011).

III. Addiction et détournement du circuit de la récompense

Les troubles liés à l'usage de substances addictives d'origines naturelles ou de dérivés synthétiques représentent un coût considérable pour la société. En Europe, l'addiction a touché plus de 15 millions d'individus en 2011, ce qui en fait la quatrième maladie la plus répandue avec un coût de 65,7 milliards d'euros (DiLuca and Olesen, 2014). L'addiction est une maladie psychiatrique caractérisée notamment par une transition de la consommation occasionnelle à un comportement compulsif de recherche et de consommation de drogues, avec des épisodes récurrents d'abstinence et de rechute, ainsi qu'une perte de contrôle malgré les conséquences négatives (Kenny, 2007a). Elle a été définie plus précisément au travers de manuels de diagnostic comme le DSM-V datant de 2013 (*Diagnostic and Statistical Manual* ; **Box 1**) et de classifications internationales comme le CIM-10.

D'après le DSM-V, les addictions concernent les drogues telles que l'alcool, le tabac (nicotine), le cannabis (tétrahydrocannabinol : THC), les opiacés (héroïne, morphine), les psychostimulants (cocaïne, amphétamine) et les dérivés de synthèse. Seul le jeu pathologique (jeux vidéo, de hasard et d'argent) est cliniquement reconnu comme une dépendance comportementale, bien qu'il concerne une addiction sans substance.

Box 1 | Les 11 critères diagnostics du DSM V de l'American Psychiatric Association

- Besoin impérieux et irrésistible de consommer la substance ou de jouer (craving)
- Perte de contrôle sur la quantité et le temps dédié à la prise de substance ou au jeu
- Beaucoup de temps consacré à la recherche de substances ou au jeu
- Augmentation de la tolérance au produit addictif
- 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
- Incapacité de remplir des obligations importantes
- Usage même lorsqu'il y a un risque physique
- Problèmes personnels ou sociaux
- Désir ou efforts persistants pour diminuer les doses ou l'activité
- Activités réduites au profit de la consommation ou du jeu
- Poursuite de la consommation malgré les dégâts physiques ou psychologiques

Ces critères permettent de caractériser le degré de sévérité de l'addiction :

- Présence de 2 à 3 critères : addiction faible
- Présence de 4 à 5 critères : addiction modérée
- Présence de 6 critères ou plus : addiction sévère

D'après le site de la MILDECA (<https://www.drogues.gouv.fr/quest-ce-quune-addiction>) consulté le 13 septembre 2023.

L'addiction est une pathologie complexe qui se met en place de façon progressive chez l'individu en suivant plusieurs étapes (**Figure 7**). La première prise de drogue (aigüe), ou initiation, est principalement associée au contexte social ou environnemental de l'individu. Elle n'est pas toujours associée au plaisir, qui arrive souvent lors d'une prise répétée et qui demeure généralement contrôlée. Chez les personnes vulnérables, la prise de drogue devient compulsive avec des doses de plus en plus importantes en dépit des conséquences négatives. Ces comportements compulsifs sont accompagnés de symptômes de sevrage psychologiques et/ou physiques plus ou moins marqués selon les drogues (voir **Chapitre 3**). Même si la période d'abstinence dure depuis plusieurs années, il y a quand même un fort taux de rechute. Cette rechute est associée à des altérations persistantes de la plasticité cérébrale au sein du circuit de la récompense.

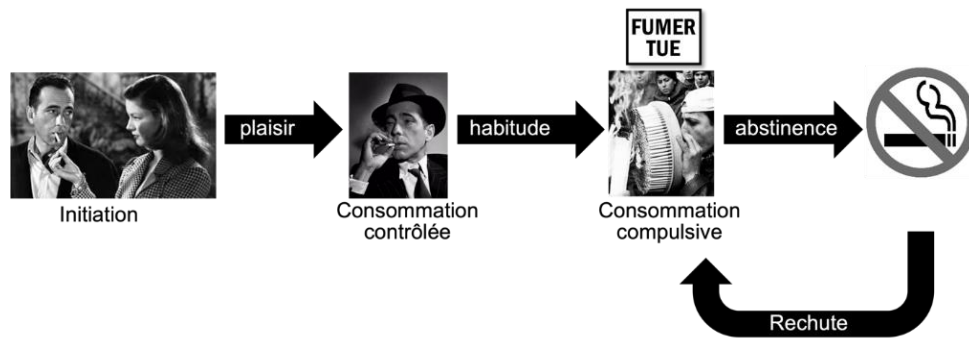


Figure 7 | Les différentes phases de l'addiction aux drogues.

Représentation simplifiée des différentes phases de l'addiction.

Cette condition pathologique a des répercussions dévastatrices tant pour les individus vulnérables que pour la société dans son ensemble. La réhabilitation des personnes dépendantes reste particulièrement limitée, même avec la mise en place de programmes de désintoxication et de réintégration (O'Brien and McLellan, 1996). Les individus en cours de désintoxication font état d'un désir irrésistible de consommer des substances dès qu'ils sont confrontés à des stimuli (indices) liés à leurs anciennes habitudes (Leshner, 1997). Ce témoignage de patients renforce la conception de l'addiction en tant que trouble cérébral, caractérisé en partie par une forte association entre les stimuli sensoriels liés à la prise de drogue et les sensations agréables qu'elle procure.

Actuellement, la recherche neurobiologique sur la dépendance se fixe des objectifs essentiels. Elle vise à comprendre les mécanismes sous-jacents aux plaisirs immédiats induits par la consommation de drogues, les adaptations neurologiques responsables de la transition de la consommation occasionnelle à la consommation compulsive, ainsi que les mécanismes entraînant une rechute chronique. Il est important de noter que tous les individus ne présentent pas la même vulnérabilité face à l'addiction. Des facteurs de risques jouent un rôle important dans cette vulnérabilité inter-individuelle. Ces risques comprennent des éléments de vulnérabilité biologique, tels que la génétique, l'épigénétique et les circuits neuronaux, ainsi que des facteurs environnementaux tels que le stress, les traumatismes, l'exposition précoce aux drogues et les structures sociales et culturelles (Potenza, 2013).

Une grande majorité de ce que nous savons sur les circuits de la récompense et la notion de plaisir provient des études faites sur les drogues addictives. Il a été suggéré que les drogues détournent ce circuit. D'après Lüscher et Malenka, les altérations des propriétés des synapses excitatrices sur les neurones DAergiques de la VTA du mésencéphale sont les modifications les plus importantes qui contribuent au développement de l'addiction (Lüscher and Malenka, 2011).

De plus, les drogues addictives, même si leur structure chimique et leur mécanisme d'action diffèrent, favorisent le renforcement des comportements en augmentant la concentration de DA dans le système mésocorticolimbique (Chiara and Imperato, 1988). En effet, dans cette étude, ils ont mesuré les niveaux de DA par microdialyse après avoir administré de la morphine, de la méthadone, de la nicotine, de l'éthanol, de l'amphétamine et de la cocaïne chez le rat. Ils ont constaté que toutes ces substances addictives augmentaient la concentration de DA extracellulaire dans le circuit de la récompense, en particulier dans le NAc (Figure 8) (Chiara and Imperato, 1988).

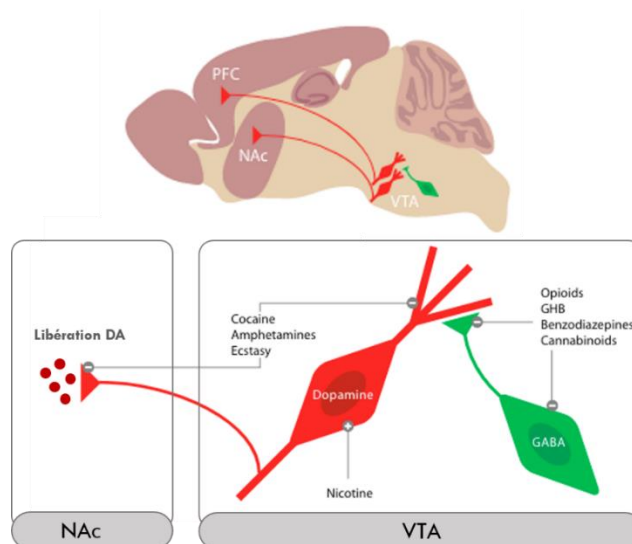


Figure 8 | Mécanisme d'action des drogues addictives au sein de la VTA provoquant une libération de DA dans les structures cibles comme le NAc.

En haut : Schéma d'une coupe sagittale représentant la VTA, le NAc et le PFC. En bas : Les neurones de projections de la VTA sont principalement DAergiques (en rouge) et sous le contrôle inhibiteur des interneurons GABA (en vert). La nicotine agit directement sur les neurones DAergiques de la VTA en les dépolarisant. Les psychostimulants et dérivés (cocaïne, amphétamine, ecstasy) agissent indirectement sur les neurones de la VTA. Bien que l'ecstasy et l'amphétamine favorisent la libération non-vésiculaire, la cocaïne agit en ciblant le transporteur de la DA (DAT) situé sur les terminaisons axonales et les dendrites des neurones DAergiques projetant vers le NAc et le PFC. Cela inhibe la recapture de la DA et entraîne une augmentation locale du taux de DA dans la VTA, le NAc et le PFC. En revanche, les opioïdes, les cannabinoïdes et autres drogues agissent sur l'activité DAergique de la VTA en activant les interneurons GABA inhibiteurs de la VTA. Adapté de Lüscher et Malenka, 2011.

La cocaïne provoque notamment une augmentation de la DA en interférant avec sa recapture à travers le blocage de son transporteur, le DAT (*Dopamine Transporter*). Une seule injection de cocaïne induit ainsi une augmentation de la concentration de DA dans le NAc, mais ne modifie pas directement la transmission du glutamate. Il convient de noter que la cocaïne augmente également la concentration de DA dans la VTA, car ces neurones libèrent ce neurotransmetteur à partir de leurs dendrites (Zhang et al., 2001). En outre, l'exposition répétée à la cocaïne augmente les niveaux de DA et de glutamate dans le NAc (Reid et al., 1997; Zhang et al., 2001). Cette élévation répétée de DA, induite par les drogues, dans les structures cibles du système mésolimbique entraîne une modulation de l'excitabilité des neurones et conduit à la mise en place de plasticités glutamatergiques au sein de circuits spécifiques (Mameli and Lüscher, 2011; Pascoli et al., 2015; Tritsch and Sabatini, 2012).

Par ailleurs, il a été montré qu'une altération de la transmission du glutamate des projections du PFC vers le NAc induite par les substances addictives serait un médiateur de la neuroplasticité comportementale associée à l'addiction (Kalivas, 2004; McFarland et al., 2003). De plus, la consommation de drogue permet d'engager les actions excitatrices des drogues addictives sur le système de récompense. Chez le rat, une élévation des seuils d'autostimulation intracrânienne s'accompagne d'une diminution de l'activité du circuit de la récompense (Kenny, 2007a). De la même manière, une exposition prolongée à de nombreuses drogues addictives tels que les psychostimulants, les opiacés et l'alcool est également capable de diminuer la sensibilité basale de ce circuit chez l'animal. En effet, durant l'abstinence, les adaptations inhibitrices au sein du circuit de la récompense ne sont

plus contrebalancées par la stimulation induite par la prise de drogue, diminuant l'activité du circuit et sa sensibilité aux effets récompensants (c'est la tolérance) (Kenny, 2007a).

La recherche de récompense est contrôlée par des CS, qui peuvent être visuels ou sensoriels, comme vu précédemment dans le conditionnement pavlovien (Figure 1). L'association faite entre l'acquisition de la récompense et les stimuli environnementaux jouent un rôle prépondérant lors de la phase d'abstinence, de sorte que leurs réexpositions compliquent le sevrage puisque l'individu fait face à un déficit de récompense. Ainsi, l'altération du traitement de la récompense induite par la prise compulsive ou l'exposition à des CS sont responsables d'un renforcement négatif qui motive la prise excessive de drogue pendant la période de sevrage (Kenny, 2007a).

Par conséquent, ce déséquilibre de la transmission de la DA et du glutamate déclenche des changements moléculaires, transcriptionnels, épigénétiques, synaptiques et morphologiques dans le circuit de la récompense, décrits comme étant à la base de l'addiction. Ces changements sous-tendent les adaptations comportementales à long terme résultant des expositions soutenues aux drogues, et d'un détournement des circuits de la récompense (Hyman et al., 2006; Lüscher and Malenka, 2011; Nestler, 2001; Robison and Nestler, 2011). Ces altérations se traduisent par une activité locomotrice plus importante et une augmentation de l'auto-administration et de la rechute dans le cas de la cocaïne (Cooper et al., 2017; Steketee and Kalivas, 2011). De cette façon, l'augmentation artificielle des niveaux de DA déclenchée par les drogues modifie l'apprentissage dépendant de la récompense, notamment à travers la RPE vu précédemment (voir Chapitre 1-II-2). Rappelons que la DA signale la RPE, soit la différence entre la récompense attendue et la récompense reçue, qui est nécessaire pour l'apprentissage de nouveaux indices associés à une récompense naturelle. Dans un modèle d'apprentissage de récompense naturelle avec appui-levier, la libération de DA dans le NAc a lieu au moment de la présentation de la récompense naturelle. Lorsque l'animal apprend à prédire la disponibilité de cette récompense, la libération de DA se produit au moment de la présentation de l'indice et induit la réponse comportementale (Figure 9A) (Keiflin and Janak, 2015; Schultz et al., 1997). Dans le cas d'un animal qui a appris à associer un indice à une injection de drogue comme la cocaïne, la libération de DA dans le NAc se produit à la fois lors de la présentation de l'indice et lors de la réception de la drogue (Figure 9B) (Phillips et al., 2003). Ces données montrent que la drogue induit artificiellement une élévation massive de la DA qui, contrairement à la récompense naturelle, persiste même après la phase d'apprentissage lorsque la récompense devient prédictible grâce aux indices associés (Heien et al., 2005; Stuber et al., 2005). La drogue, comme la cocaïne, induit ainsi une valeur RPE positive à travers la libération de DA (Figure 9C) (Keiflin and Janak, 2015).

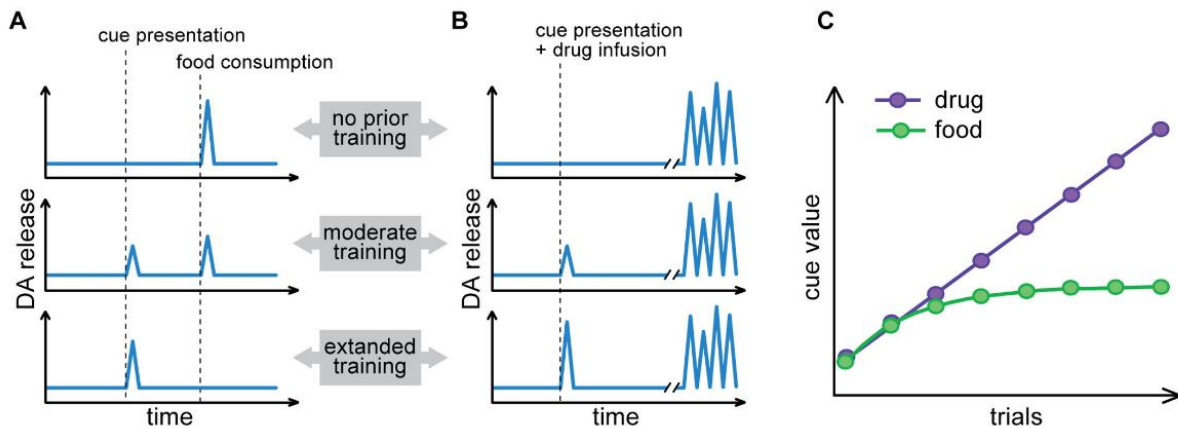


Figure 9 | Comparaison des réponses phasiques de la DA en réponse à la nourriture et à la cocaïne dans le NAc et leurs implications potentielles sur l'apprentissage.

(A) Avant l'apprentissage, la réception d'une récompense alimentaire inattendue déclenche une libération phasique de la DA. Au fil de l'apprentissage, cette libération de DA se déplace de la récompense vers le signal associé. (B) Lorsque la cocaïne est la récompense, chaque injection de la drogue provoque, avec un délai, une importante libération de DA due aux actions pharmacologiques de la drogue. Tout comme pour la récompense naturelle, des réponses phasiques se manifestent à la présentation des indices. Cependant, à la différence des signaux de DA induits par des récompenses naturelles, les signaux de DA générés par les drogues addictives ne sont pas modulés par les prédictions et persistent tout au long de l'apprentissage. (C) Conséquences présumées de ces signaux de DA sur l'apprentissage : les signaux de DA associés à la nourriture, modulés par les attentes en matière de récompense, favorisent l'apprentissage jusqu'à ce que la prédiction corresponde au résultat réel, aboutissant à une valeur de repère stable après quelques essais. En revanche, les signaux persistants de DA induits par la cocaïne continuent d'augmenter la valeur des indices de cocaïne à chaque essai. En fin de compte, la valeur associée aux indices de cocaïne dépasse celle des indices alimentaires, ce qui peut fausser la prise de décision en faveur de la cocaïne. D'après Keiflin et Janak, 2015.

L'ensemble de ces données ont été établies grâce à l'utilisation de modèles animaux qui revêt une grande importance pour l'étude des mécanismes sous-jacents aux addictions, offrant ainsi la possibilité d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

IV. Modèles animaux de l'addiction

L'utilisation de modèles animaux a permis et permet encore de comprendre les mécanismes neurobiologiques sous-jacents de l'addiction. Cette utilisation est motivée par plusieurs facteurs. D'une part, il existe des préoccupations éthiques majeures concernant l'utilisation de techniques invasives d'exploration chez l'homme. Les sujets dépendants sont, de plus, souvent réticents à participer à des études ou à suivre des traitements, rendant la collecte de données fiables difficile. D'autre part, les modèles mathématiques et les approches *in silico* actuelles ne sont pas encore suffisamment sophistiqués pour examiner de manière exhaustive tous les aspects de cette pathologie complexe. Enfin, l'addiction est un trouble du comportement multifacette qui ne peut pas être pleinement modélisé par l'unique utilisation de lignées cellulaires. L'utilisation d'animaux, tels que les rongeurs, représente un modèle d'étude adéquat en raison de leur structure cérébrale similaire à celle de l'homme, notamment en ce qui concerne le circuit de la récompense (Ahmed, 2012). Chez les rongeurs, il a été montré qu'une seule injection de cocaïne peut déclencher une hyperactivité locomotrice, avec une réaction dose-dépendante, ce qui reflète le comportement humain. La durée de cet effet varie en fonction de la voie d'administration et du taux d'injection (Thomsen and Caine, 2011; Woods, 1977). D'autre part, le type de rongeurs utilisé comme modèle a également son

importance. Selon l'expérimentation réalisée, le modèle animal privilégié sera soit le rat, soit la souris. Ainsi, s'il est plus simple de réaliser des enregistrements électrophysiologiques ou d'implanter un cathéter chez le rat, les manipulations génétiques sont plus vastes chez la souris. Il sera également plus facile de faire apprendre des tâches opérantes complexes, et de reproduire la variabilité inter-individuelle chez le rat (Spanagel, 2017). Les modèles comportementaux qui permettent d'étudier les différentes facettes de l'addiction, une maladie psychiatrique complexe, sont la sensibilisation locomotrice, la préférence de place conditionnée et l'auto-administration de substance.

1. Sensibilisation locomotrice

Le test comportemental de sensibilisation locomotrice peut être effectué en plaçant l'animal dans un labyrinthe circulaire appelé cyclotron (Figure 10), ou dans une boîte ouverte appelée openfield, pour permettre la mesure de l'activité locomotrice. Le principe de ce test comportemental repose sur l'administration répétée d'une dose fixe de drogue, qui entraîne une augmentation progressive de la réponse locomotrice, qui persiste dans le temps même après une période de sevrage prolongée. La sensibilisation peut ainsi persister des semaines, des mois, voire un an dans le cas de l'amphétamine (Paulson and Robinson, 1991).

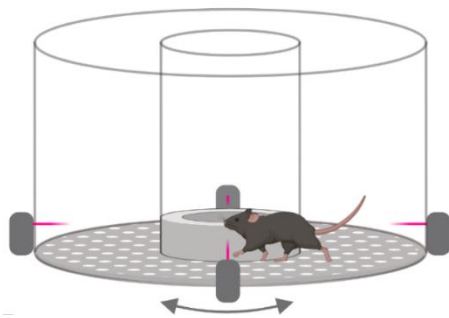


Figure 10 | Schéma représentatif d'un labyrinthe circulaire appelé cyclotron.

Ce dispositif permet de mesurer l'activité locomotrice de la souris en quantifiant le nombre de quart de tour en un temps donné, grâce au capteur laser. Schéma réalisé avec BioRender.

Pour mesurer la sensibilisation locomotrice, on mesure la différence d'activité locomotrice entre la dernière administration de drogues par rapport à la première administration. La persistance de la sensibilisation comportementale est confirmée lors d'un *challenge*, où l'animal reçoit une nouvelle dose de drogue après une période de sevrage, afin de mimer la rechute. Cela provoque de nouveau une réponse locomotrice sensibilisée par rapport à l'hyperactivité locomotrice induite par la première injection. Ainsi, la sensibilisation locomotrice se caractérise par deux étapes clé : son **développement** et son **maintien** (Anderson and Pierce, 2005; Kalivas and Duffy, 1993; Paulson and Robinson, 1991; Vanderschuren and Kalivas, 2000).

Le paradigme de la sensibilisation locomotrice a été majoritairement employé pour explorer les effets psychoactifs induits par les substances addictives sur l'animal. Ce modèle permet également d'étudier l'impact des drogues sur les composantes renforçantes et motivationnelles, ainsi que les composantes neurochimiques, selon la théorie de l'*incentive sensitization*. Cette théorie propose que la sensibilisation comportementale pourrait être majoritairement expliquée par des neuro-adaptations induites par la drogue rendant les circuits cérébraux mésocorticolimbiques hypersensibles ou sensibilisés. S'ils sont rendus hypersensibilisés, ces systèmes provoquent une perturbation pathologique de la motivation (incitation) et du contexte de prise de drogue qui lui est associé (Berridge and Robinson, 1998). Ainsi, dès la première administration de drogue, des modifications moléculaires et cellulaires sont induites et provoquent des adaptations neuronales durables au sein

du circuit de la récompense. Ces adaptations renforcent la réponse locomotrice lors des expositions ultérieures à la drogue (Anderson and Pierce, 2005).

En conclusion, ce modèle comportemental permet d'étudier les adaptations moléculaires et cellulaires induites par une exposition répétée à une substance, et de déterminer leur rôle dans le contrôle des phases de développement et de maintien de cette réponse comportementale (Vanderschuren and Kalivas, 2000). En revanche, il ne correspond pas à un modèle d'addiction à proprement parler.

2. Préférence de place conditionnée

Le test de préférence de place conditionnée, ou CPP, est un protocole non-opérant basé sur le conditionnement pavlovien. Il permet d'évaluer les propriétés hédoniques d'une substance ou d'un stimulus particulier. Dans ce test comportemental, l'animal est entraîné à associer une récompense (drogue) à un contexte spécifique. Pour être mis en place, ce test est divisé en trois étapes clés : le pré-conditionnement (**pré-test**), le conditionnement et le post-conditionnement (**test**).

Au cours de la phase de pré-test, l'animal explore librement deux ou plusieurs compartiments qui diffèrent par leurs caractéristiques visuelles et/ou texturales, afin d'évaluer la préférence initiale de l'animal grâce à la mesure du temps passé dans chaque compartiment. Avant la phase de conditionnement, un compartiment spécifique est attribué au sujet de manière randomisée, sur la base de la préférence initiale. Ce compartiment spécifique est appelé le **compartiment « pairé »** et sera associé à l'administration de la substance. Ainsi, l'acquisition du conditionnement s'effectue en deux étapes. L'animal reçoit tout d'abord la substance neutre véhicule (par exemple de la solution saline) et est immédiatement confiné dans le **compartiment « non-pairé »** pendant la durée du premier conditionnement. Par la suite, après une période de « repos » de quelques heures ou d'une journée selon les protocoles, il se verra administrer la substance puis confiné dans le **compartiment pairé**. Le conditionnement, incluant ces deux étapes, est répété durant plusieurs jours (Figure 11).

La préférence de l'animal est ensuite évaluée au cours du test, où l'animal peut à nouveau explorer librement tous les compartiments. Pour mesurer la préférence de place, on soustrait **le temps (t) passé dans le compartiment pairé (cp) durant le test au temps passé dans ce même compartiment durant la phase de pré-test :**

$$\text{Score CPP} = (t) \text{ test}_{cp} - (t) \text{ pré-test}_{cp}$$

L'effet gratifiant de la substance se traduit ainsi par un score de CPP positif, reflétant ainsi les effets plaisants pour l'animal (Bardo and Bevins, 2000). Le nombre de sessions de conditionnement est corrélé à l'ampleur du score de CPP obtenu ainsi qu'à la dose de la substance. En revanche, à forte dose, la substance peut devenir aversive, et provoquer chez l'animal un évitement du compartiment « pairé », entraînant un score de CPP négatif (Tzschentke, 2007).

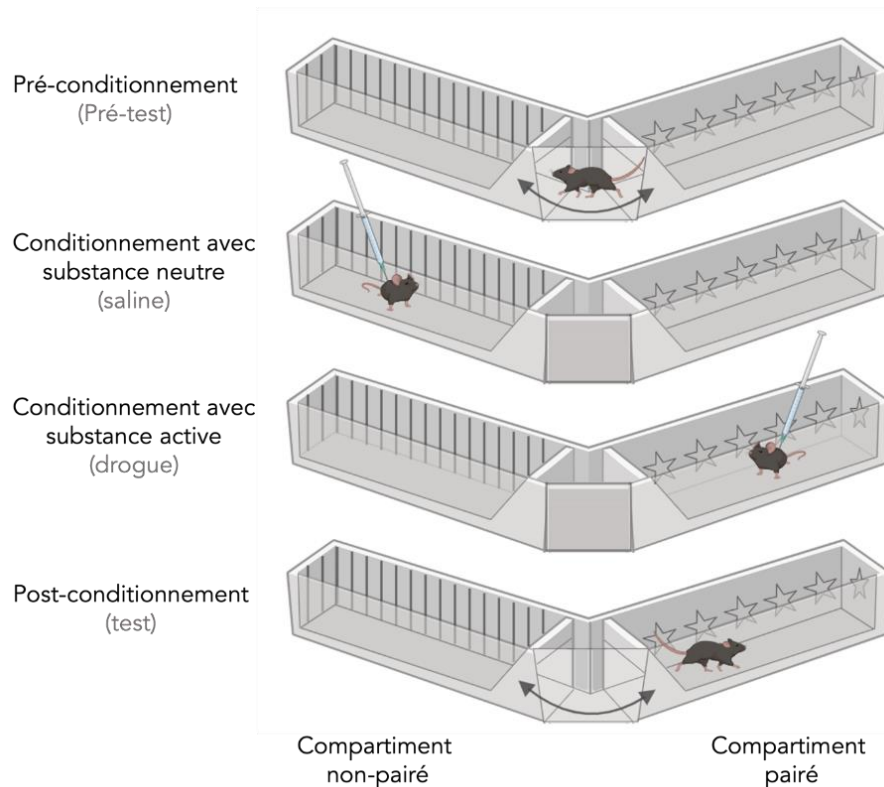


Figure 11 | Schéma illustratif du paradigme de la CPP.

De manière intéressante, la préférence pour un contexte spécifique associé à une récompense se maintient après la phase de test. Il est ainsi possible d'étudier les processus de mémorisation et de rétention pour l'association récompense-contexte, grâce à une étape d'**extinction**. Durant l'extinction, l'animal a de nouveau accès librement à l'ensemble des compartiments avec ou sans administration de la solution véhicule uniquement, jusqu'à ce que l'animal perde la préférence associée au compartiment pairé. La perte de préférence se traduit par un score de CPP nul. Suite à cela, l'animal est de nouveau exposé à la substance active et placé dans la boîte de CPP avec un accès libre à tous les compartiments. La nouvelle administration de la substance restaure la préférence pour le compartiment pairé et rétablit le score de CPP positif (McKendrick and Graziane, 2020).

Ainsi, le paradigme de la CPP permet une étude pertinente et non-invasive des propriétés motivationnelles positives ou négatives d'une substance. En revanche, il s'agit d'un test non-opérant dans lequel la substance est administrée par l'expérimentateur et non par l'animal lui-même, comme dans le cas de l'auto-administration. Toutefois, des protocoles tendent à émerger pour proposer l'étude d'autres facettes de l'addiction comme la recherche de drogue, la rétention de la mémoire associée ainsi que l'activité locomotrice combinées avec la CPP. Dans un de ces paradigmes, l'animal a à disposition dans chaque compartiment des biberons contenant soit la substance active, soit la substance neutre pendant la durée du conditionnement, qui n'est par conséquent pas administrée par un expérimentateur (McKendrick et al., 2020).

3. Auto-administration

L'auto-administration est le paradigme comportemental le plus sophistiqué pour modéliser la dépendance chez les animaux. Il s'agit d'un test de conditionnement opérant utilisant la boîte de

Skinner présentée au début de ce chapitre. Ce système est utilisé pour étudier les propriétés d'une substance sur la motivation de l'animal pour obtenir une récompense. Pour ce faire, les animaux apprennent à effectuer une tâche comportementale spécifique, comme par exemple appuyer sur un levier et reçoivent, en retour, de la drogue par voie intraveineuse ou intracrânienne (**Figure 12**) (Pascoli et al., 2015; Weeks, 1962).

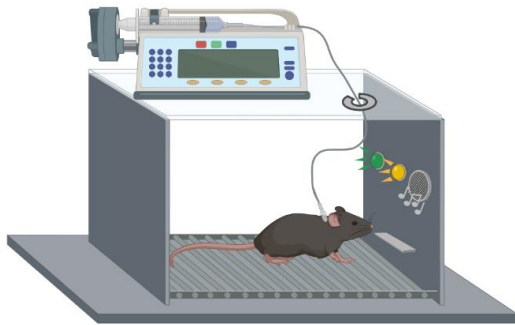


Figure 12 | Dispositif expérimental d'auto-administration.

Schéma réalisé avec BioRender.

Ce paradigme permet l'étude des différentes phases de l'addiction incluant la phase d'**initiation** (acquisition), le **sevrage** et la **rechute**. La phase d'acquisition du comportement correspond à la période où l'animal apprend à s'auto-administrer la drogue en réalisant la tâche comportementale associée, durant plusieurs heures, dans un contexte et avec des indices (sons/lumière) particuliers. Cette phase peut s'accompagner d'une « escalade », c'est-à-dire d'une augmentation de la consommation, au fil du temps (Ahmed and Koob, 1998; Deroche-Gamonet et al., 2004). Cet accès prolongé à la drogue permet notamment d'étudier la transition entre une utilisation occasionnelle de la drogue et sa prise compulsive (Ahmed and Koob, 1999). Ce test offre également la possibilité d'étudier la valeur motivationnelle que l'animal attribue à la récompense et l'intensité de sa motivation en modulant le nombre d'actions requis pour obtenir la même quantité de cette récompense. Ainsi, si on augmente progressivement le nombre d'actions nécessaires à la délivrance de la drogue, on peut observer jusqu'à quel point l'animal est prêt à s'auto-administrer pour obtenir cette drogue (Hodos, 1961; Richardson and Roberts, 1996).

On peut également, à travers un modèle de résistance à la punition, définir la prise compulsive, traduisant la persistance du comportement d'auto-administration en dépit des conséquences négatives. Pour cela, lors de l'auto-administration, la délivrance de la récompense est combinée à l'application de choc électrique au niveau des pattes. On observe ainsi que, malgré les chocs électriques, certains animaux continuent de s'auto-administrer la drogue de manière compulsive (Ahmed, 2011; Pascoli et al., 2015). Enfin, la rechute peut être observée après une période de sevrage, où l'animal ne reçoit plus la récompense bien qu'il continue de réaliser la tâche comportementale (appui levier) dans le contexte associé à l'indice sonore ou visuel. La réexposition de l'individu à ces indices associés ou à la drogue elle-même suffit à provoquer une reprise du comportement d'auto-administration (Epstein and Preston, 2003; Pascoli et al., 2015; Shaham et al., 2003; Steketee and Kalivas, 2011).

Ce modèle est le paradigme qui se rapproche le plus du comportement humain en termes d'addiction et représente ainsi un modèle adéquat pour la recherche de nouvelles approches thérapeutiques (Belin et al., 2008; Cantin et al., 2010; Deroche-Gamonet et al., 2004).

Chapitre 2 : De la signalisation aux circuits et au comportement : adaptations cellulaire-spécifiques dans des modèles précliniques d'addiction

I. Les ganglions de la base

1. Organisation générale des ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB), autrement appelés noyaux gris centraux, sont un regroupement de noyaux profonds sous-corticaux interconnectés. Les GB comprennent le striatum, parties ventrale (NAc) et dorsale, le noyau sous-thalamique (NST), le globus pallidus (GP) et la SN du mésencéphale. Ces structures sont connectées entre elles mais également à d'autres régions cérébrales, et forment ainsi des réseaux neuronaux capables d'intégrer des informations à la fois motrices, associatives et limbiques. Ces réseaux englobent les GB, le cortex cérébral, le thalamus et plusieurs noyaux du tronc cérébral pour former des boucles cortico-striato-thalamo-corticales (Haber, 2003; Liljeholm and O'Doherty, 2012; Nelson and Kreitzer, 2014). Cet ensemble de structures est intimement lié au système DAergique issu de la SNc qui innerve la partie dorsale du striatum et du système DA issu de la VTA qui innerve le NAc. Les GB constituent ainsi un ensemble de structures spécialisées à la fois dans la planification et la coordination des mouvements, mais ils sont également impliqués dans des aspects non-moteurs, comme des fonctions cognitives et motivationnelles, l'attention ou encore la mémoire. Plus précisément, ces boucles sont impliquées dans la modulation de la motricité volontaire, la sélection et l'exécution de l'action, les apprentissages conditionnés et procéduraux pour la partie dorsale du striatum, mais également les comportements motivés par la récompense pour sa partie ventrale (Balleine et al., 2007; Graybiel et al., 1994; Haber, 2003; Horvitz, 2002; Liljeholm and O'Doherty, 2012).

La première identification anatomique de cet ensemble de structures a été réalisée au XVI^{ème} siècle par Andreas Vesalius. De nombreuses recherches ont été réalisées depuis et les travaux du physicien Thomas Willis en 1664 sur le système des GB, appelé alors *corpus striatum*, ont permis d'identifier son importance dans les processus sensorimoteurs. Les GB ont ensuite été pleinement reconnus grâce aux travaux de Karl Friedrich Burdach au XIX^{ème} siècle. Cet intérêt provient notamment de l'implication de dysfonctions des GB dans de multiples maladies humaines, mais également des symptômes frappants associés à des lésions de ces structures chez l'homme. Une atteinte des GB est observée dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson, le syndrome de Gilles de la Tourette ou encore dans la maladie de Huntington. Des altérations des GB sont également retrouvées dans de nombreuses maladies psychiatriques comme la schizophrénie, les troubles obsessionnels compulsifs, l'addiction ou encore les désordres mentaux liés au stress (Albin et al., 1989; Andres and Darbin, 2018; Balleine et al., 2007; DeLong, 1990; Haber, 2003).

L'anatomie et la connectivité des GB sont conservées d'une espèce à une autre, bien que leurs fonctions puissent différer selon les espèces (Grillner and Robertson, 2016; Reiner et al., 1998; Stephenson-Jones et al., 2012), suggérant le rôle crucial de ces structures dans la physiologie et la survie des animaux. Parmi les noyaux qui composent les GB, on retrouve : le striatum, composé du caudé-putamen et du NAc ; le pallidum constitué du GP et du VP. Le GP est divisé en deux par la lame médullaire interne en un segment médian ou interne (GPi), et en un segment latéral ou externe (GPe).

Bien qu'ils soient anatomiquement unifiés, le GPe et le GPi diffèrent dans leurs connexions et leurs fonctions. Chez le rongeur, ces noyaux sont appelés globus pallidus (homologue du GPe des primates) et noyau entopédonculaire (homologue du GPi) (Nicola, 2007). Afin de simplifier, je parlerai de GPe et de GPi également chez les rongeurs. Le VP constitue la partie ventrale et rostrale du GP. Ensuite, on retrouve également le NST ainsi que la SN, formée de la SNc et de la VTA, exprimant tous deux les neurones à DA, ainsi que la SN et réticulée (SNr) différenciées par des paramètres anatomiques et physiologiques (Andres and Darbin, 2018; Gerfen and Surmeier, 2011; Nelson and Kreitzer, 2014).

Ces noyaux peuvent être divisés en plusieurs catégories selon leur rôle. On retrouve tout d'abord, les **noyaux d'entrées**, constitués du striatum et du NST, qui reçoivent les informations glutamatergiques excitatrices provenant du cortex. Puis, les **noyaux de sorties** : le GP, le VP et la SNr qui projettent sur le thalamus et le tronc cérébral, dont le colliculus supérieur (SC) et le noyau pédonculopontin (PPN) (Figure 13).

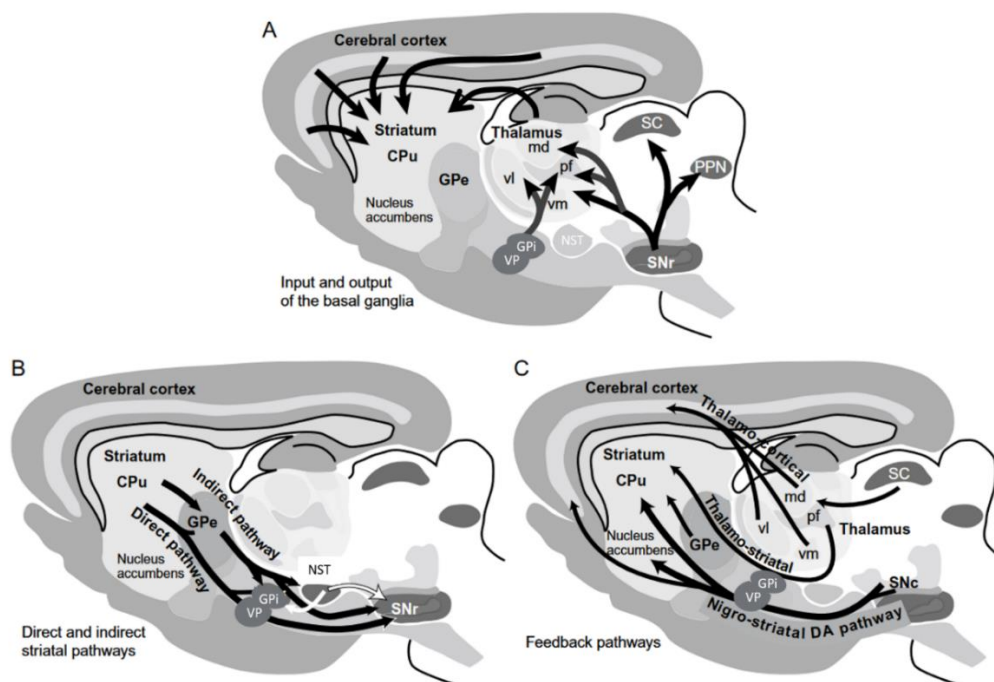


Figure 13 | Voies d'entrées et de sorties des ganglions de la base.

(A) Les afférences glutamatergiques du cortex cérébral et du thalamus fournissent une entrée majeure au striatum, qui comprend le caudé-putamen (CPu) et le NAc. (B) Les voies de projections striatales directes et indirectes provenant des MSN (voir Chapitre 2-1-3) projettent vers le GPi/VP et le GPe/NST respectivement. Ces neurones sont indirectement reliés au GPi et à la SNr par des connexions impliquant le GPe et le NST. (C) La sortie des GB provient des neurones GABA du GPi et de la SNr. Ces neurones fournissent des entrées inhibitrices aux noyaux thalamiques, y compris les noyaux ventral latéral (vl), médiodorsal (md), ventromédial (vm) et le complexe intralaminaire/parafasciculaire (pf), ainsi qu'au colliculus supérieur (SC) et au noyau pédonculopontin (PPN). Adapté de Gerfen and Bolam, 2010.

Et pour finir, les **noyaux intrinsèques** qui contribuent au transfert d'information dans les zones intermédiaires, c'est-à-dire entre les entrées et les sorties. Les **zones intermédiaires** sont composées de :

- Projections GABAergiques inhibitrices provenant du striatum vers le GPe, le GPi, le VP et la SNr ;
- Projections glutamatergiques excitatrices du NST vers le striatum, le GPe, le GPi, le VP et la SNr ;
- Projections inhibitrices issues du GPe projetant vers le striatum, le NST, le GPi et la SNr ;

- Différents types de projections provenant du VP vers notamment la VTA, le noyau médiodorsal du thalamus et le NST, ainsi que l'hypothalamus.

Le striatum, le GPe, le GPi et la SNr sont majoritairement constitués de neurones inhibiteurs GABAergiques, seul le NST est composé de neurones excitateurs glutamatergiques (Gerfen and Surmeier, 2011; Nelson and Kreitzer, 2014; Nicola, 2007). En revanche, le VP est composé de neurones de projections cholinergiques, glutamatergiques et GABAergiques (Prasad and McNally, 2020). Par conséquent, ces structures sont modulées par la DA, le glutamate, le GABA, l'acétylcholine ainsi que la sérotonine et certains neuropeptides (Parent et al., 1995; Sian et al., 1999).

2. Le striatum, structure d'entrée des ganglions de la base

Le striatum, ou corps strié, est la structure d'entrée et d'intégration la plus importante des GB. Il se divise en deux parties : le striatum dorsal et le NAc. Le striatum est anatomiquement séparé du cortex par la capsule externe (ou corps calleux chez le rongeur) et doit son nom au grand nombre de fibres qui le traversent. L'ensemble du striatum possède également une organisation en striosome-matrice. Ces compartiments sont distinguables de par leur composition, leurs projections afférentes et efférentes (Graybiel et al., 1994). En particulier, les striosomes (ou *patches*) reçoivent principalement des afférences provenant du circuit limbique. Il représenterait environ 10% du volume du striatum et serait enrichi en récepteurs opioïdes μ (mu ; MOR). La matrice serait, quant à elle, la cible des afférences sensorimotrices et enrichie en acétylcholinestérase et choline acétyltransférase (Brimblecombe and Cragg, 2017; Kreitzer, 2009). Toutefois, cette compartimentation neurochimique est moins employée que la voie directe et indirecte qui seront décrites dans le chapitre suivant (Chapitre 2-I-3).

Chez l'homme ou le primate non-humain, le striatum dorsal est formé du noyau caudé et du putamen, tous deux séparés par la capsule interne rayée. Chez le rongeur, il est composé du striatum dorso-médian (DMS) et dorso-latéral (DLS). Le striatum ventral est constitué du NAc, qui chez le rongeur est formé lui-même du cœur (*core*), de l'enveloppe (*shell*) ainsi que de la composante striatale du tubercule olfactif (OT) (Figure 14) (Chuhma et al., 2017; Gerfen and Surmeier, 2011; Kreitzer and Malenka, 2008).

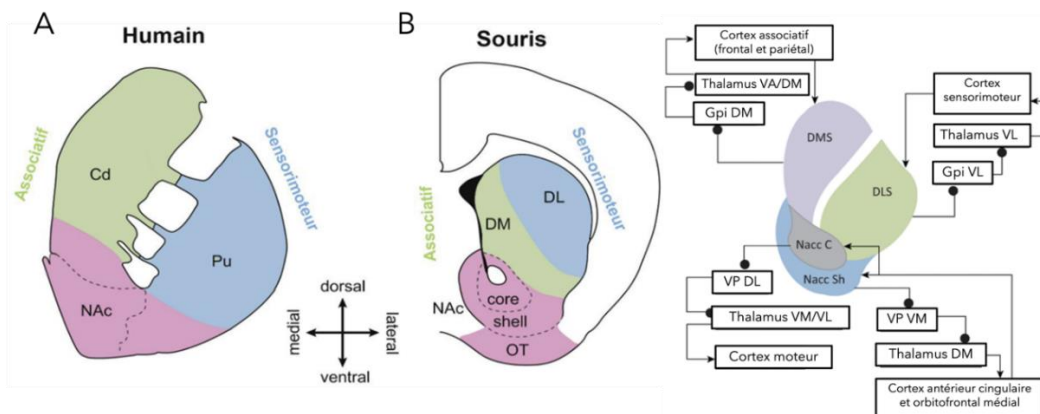


Figure 14 | Illustrations représentatives de l'organisation du striatum chez l'homme (A) et chez la souris (B), associée à ses connexions.

Cd : noyau caudé ; Pu : putamen ; NAc : noyaux accumbens ; DL ou DLS : dorso-latéral ; DM ou DMS : dorso-médian ; OT : tubercule olfactif ; VL : ventro-latéral ; VM : ventro-médian ; VA : ventro-antérieur ; core = Nacc C ; shell = Nacc Sh. Adapté de Chuhma et al., 2017; Liljeholm and O'Doherty, 2012.

Le putamen chez l'homme et le DLS chez la souris (en bleu) reçoivent des informations sensorimotrices provenant du cortex. Le caudé et le DMS (en vert) reçoivent des informations associatives du PFC. En revanche, le NAc (en rose) est impliqué dans les fonctions limbiques et reçoit des afférences issues de l'hippocampe, l'amygdale et les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur (Andres and Darbin, 2018; Chuhma et al., 2017; Kreitzer, 2009; Liljeholm and O'Doherty, 2012; Nicola, 2007).

Ainsi, le striatum représente la structure d'entrée principale des GB. Il intègre les afférences glutamatergiques codant pour des informations contextuelles et émotionnelles de l'individu, provenant de l'ensemble du cortex cérébral, des noyaux intralaminaires du thalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale. En retour, le striatum projette sur le GPe et le GPi (Liljeholm and O'Doherty, 2012). Il reçoit également des afférences DAergiques suite à des récompenses inattendues et à d'autres stimuli saillants perçus par l'individu. En effet, les neurones DAergiques de la SNc projettent principalement sur le striatum dorsal (latéral et médian), tandis que les neurones de la VTA médiale projettent majoritairement sur le NAc au niveau du core et du shell médian, et les neurones de la VTA latérale projettent plutôt sur le shell latéral. En retour, le core et le shell projettent tout deux vers le SNc et la VTA (Beier et al., 2015; Chuhma et al., 2017; Morales and Margolis, 2017; Roeper, 2013).

Le striatum dorsal a longtemps été étudié pour son implication dans les déficits moteurs observés dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson et Huntington, causées par la dégénérescence des neurones DAergiques ou striataux respectivement (Nicola, 2007). De récentes études ont montré que le striatum dorsal est capable d'intégrer des informations liées à des composantes récompensantes et motivationnelles pour influencer le comportement moteur (Horvitz, 2002). Chez l'homme, le caudé et le putamen jouent un rôle dans l'apprentissage d'associations action-récompense. Ce rôle est potentiellement différent en fonction de leur connectivité respectivement associative ou sensorimotrice (Alexander and Crutcher, 1990). De plus, il a été montré grâce à des lésions cérébrales chez le rongeur que le DLS est impliqué dans le conditionnement instrumental habituel tandis que le DMS est important pour le conditionnement instrumental orienté vers un but (performance) (Balleine et al., 2007; Burton et al., 2015; Liljeholm and O'Doherty, 2012; Lipton et al., 2019). Il a été rapporté que les projections en provenance des noyaux thalamiques vers le DMS sont nécessaires à la flexibilité comportementale orientée vers un but (Lipton et al., 2019).

De plus, il existe un mécanisme de déplacement du DMS vers le DLS au fur et à mesure de la stéréotypie comportementale (Lipton et al., 2019). En effet, il existe des preuves que le DLS est nécessaire au toilettage compulsif, car les rats présentant des lésions du DLS expriment des perturbations dans la stéréotypie des séquences de toilettage. L'activité des circuits du NAc est essentielle au développement de la recherche compulsive de cocaïne. Suite à une administration prolongée, les circuits du striatum dorsal sont de plus en plus sollicités pour soutenir la recherche de drogue. Lorsqu'il est engagé, il y a un nouveau changement d'activité, du DMS au DLS. Ainsi, le striatum dorsal est impliqué dans la formation des habitudes, notamment la recherche et la prise compulsive de drogue entraînant un remaniement des circuits neuronaux du NAc au striatum dorsal (Figure 15) (Everitt et al., 2008; Lipton et al., 2019).

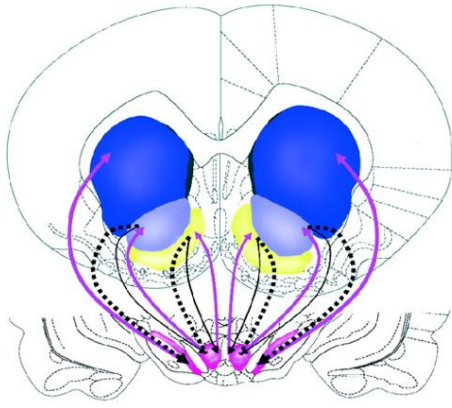


Figure 15 | Transition de la consommation volontaire initiale à la perte de contrôle à l'origine de l'addiction.

Le passage de la recherche contrôlée à la recherche compulsive de drogue représente une transition au niveau neuronal, du contrôle cortical préfrontal au contrôle striatal des comportements de recherche et de prise de drogue, ainsi qu'une progression des domaines ventraux vers les domaines plus dorsaux du striatum, médiée par ses circuits DAergiques interconnectés en série. Ces transitions neuronales dépendent de la neuroplasticité induite par l'auto-administration chronique de drogues dans les structures corticales et striatales, y compris les changements durables qui sont la conséquence des effets toxiques des drogues. D'après Everitt et al., 2008.

Bien que le NAc fasse partie intégrante du striatum, il a été considéré traditionnellement comme ayant un rôle comportemental différent de celui du striatum dorsal. Le NAc a été décrit comme jouant un rôle important dans la motivation, l'apprentissage guidé par la récompense et la dépendance (Berridge, 2007b; Hyman et al., 2006; Kalivas and Volkow, 2005; Kenny, 2007b; Nicola, 2007). Il apparaît que le NAc est plus spécifiquement impliqué dans les apprentissages renforcés. En effet, c'est dans cette région que les substances addictives induisent les plus nettes augmentations de DA, comme cela a été montré par microdialyse chez le rongeur, conduisant à une hyperactivité locomotrice à de faibles doses (Chiara and Imperato, 1988). En revanche, des doses plus élevées et soutenues agissent préférentiellement au niveau du striatum dorsal pour conduire à des stéréotypies (Yates et al., 2007).

Comme détaillées dans le Chapitre 1, des études récentes du même groupe ont montré l'implication du NAc dans l'apprentissage pavlovien : la libération transitoire de DA dans le NAc en réponse aux récompenses alimentaires, au cours de l'entraînement, mène à l'apparition d'un CS prédictif de la récompense alimentaire (Chapitre 1-II) (Day et al., 2007, 2006; Liljeholm and O'Doherty, 2012; Schultz et al., 1997). Le core du NAc a également été décrit comme jouant un rôle dans les comportements orientés vers un but (Burton et al., 2015), tandis que le shell est plutôt impliqué dans les effets renforçants produits par les psychostimulants (Veeneman et al., 2015). Par conséquent, le NAc apparaît comme une structure clé des substances addictives. Il intègre une dense innervation glutamatergique provenant de régions limbiques, thalamiques et corticales, qui code des informations relatives à l'environnement associées à la drogue ainsi qu'à l'état émotionnel de l'individu, mais également une innervation DAergique provenant de la VTA, qui associe la RPE et les valeurs motivationnelles (Hyman and Malenka, 2001).

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

Les paragraphes précédents soulignent à quel point la connectivité au sein des GB en fait un *hub* d'intégration d'informations des aires cortico-limbiques et des noyaux effecteurs du comportement. Nous allons ici détailler le réseau local des GB. Il existe plusieurs modèles des ganglions de la base. Il y a le modèle d'Albin (1989), comprenant deux voies. La voie directe est monosynaptique et constituée des projections GABAergiques inhibitrices issues des neurones épineux de taille moyenne (MSN), du striatum dorsal projetant vers le GPi et la SNr et des projections inhibitrices du NAc sur l'hypothalamus latéral, la VTA et la SNr. En revanche, la voie indirecte est polysynaptique, elle implique les projections des MSN du striatum dorsal sur le GPe qui projette sur le NST. Le NST cible à son tour le GPi/SNr et les

neurones du striatum ventral qui ciblent le VP avant de projeter sur le thalamus et le mésencéphale ventrale (VTA, SNr), projetant ensuite sur le SC et le PPN (**Figure 16**).

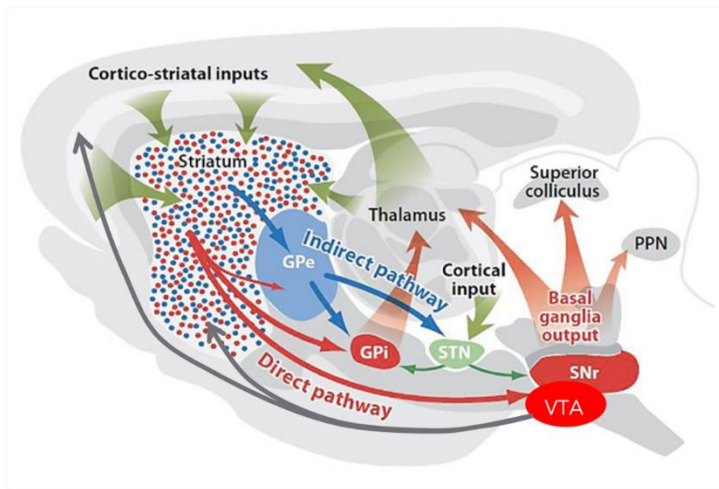


Figure 16 | Schéma illustratif du circuit local des ganglions de la base.

Le cortex ainsi que le thalamus projettent vers le striatum qui correspond à la structure d'entrée des GB. Les noyaux de sortie des GB sont le GPi et la SNr qui projettent vers le thalamus, le SC, et le PPN. Le thalamus projette en retour vers les aires frontales du cortex cérébral. En rouge, la voie directe ; en bleue, la voie indirecte ; en vert, les afférences excitatrices glutamatergiques ; en gris, les afférences DAergiques de la VTA projetant sur la NAc et le PFC. Adapté de Gerfen and Surmeier, 2011.

Dans les modèles des GB établis par Albin et De Long ([Lim et al., 2014](#)), il est évoqué que l'activation des voies directe et indirecte des GB déclenchent des effets opposés sur le cortex, où ces deux voies convergent. En effet, lors de l'activation des MSN de la voie directe (dMSN ; voir section **Chapitre 2-I-3**), les dMSN inhibent en retour les neurones GABAergiques du GPi et de la SNr, venant ainsi lever l'inhibition tonique qu'exercent ces structures sur le thalamus et donc sur le cortex. La voie directe a donc pour conséquence une désinhibition des projections thalamocorticales, qui activent en retour les régions corticales motrices, ce qui favorise la sélection de l'action et facilite le mouvement.

À l'inverse, l'activation des MSN de la voie indirecte (iMSN) inhibe le GPe ce qui a pour conséquence de lever l'inhibition exercée par le GPe sur les neurones glutamatergiques du NST, provoquant une activation du GPi et de la SNr, qui inhibent le thalamus et le cortex. La voie indirecte implique donc une inhibition des neurones de projection thalamocorticaux, associée à une inhibition du mouvement ([Freeze et al., 2013](#); [Kreitzer and Malenka, 2008](#)). Pour cette raison les voies directe et indirecte ont été classiquement dénommées les voies *Go/No-Go*, respectivement. Un modèle plus contemporain du circuit inclut une troisième voie appelée la voie hyperdirecte formée par les projections excitatrices directes du cortex vers le NST et le GPi. Cette voie hyperdirecte contourne le striatum, acheminant des impulsions excitatrices du cortex au GP par l'intermédiaire du NST ([Andres and Darbin, 2018](#); [Nambu et al., 2002](#)).

4. Populations neuronales du striatum

Le striatum dorsal et ventral sont constitués d'environ 95% de neurones de projection GABAergiques nommés MSN, autrement appelés neurones de projection du striatum (SPN). La population de neurones restante est constituée d'interneurones cholinergiques (ChAT) et GABAergiques (**Figure 17**). Il faut souligner que les MSN, les interneurones GABAergiques et les ChAT expriment tous des récepteurs DA ([Kreitzer, 2009](#)).

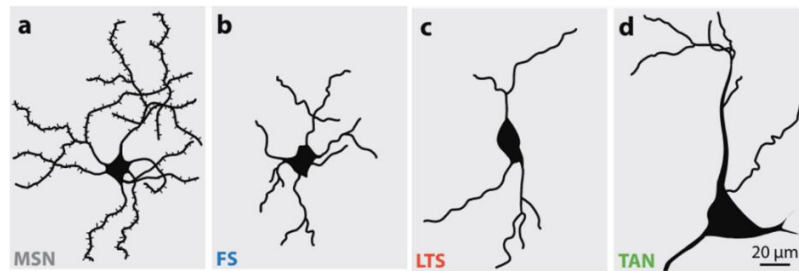


Figure 17 | Représentations schématiques des populations neuronales du striatum.

(a) neurone épineux moyen (MSN) (b) interneurone à pointe rapide (FS) (c) interneurone à pointe à bas seuil (LTS) et (d) neurone cholinergique à activité tonique (TAN). Adapté de Kreitzer, 2009.

a. Les MSN

Les MSN reçoivent les projections glutamatergiques de l'ensemble du cortex cérébral, du thalamus, de l'hippocampe ou encore de l'amygdale (Sesack and Grace, 2010). Ils intègrent et traitent les informations sensorielles et contextuelles provenant des afférences glutamatergiques. En retour, ils relayent les informations vers les structures de sorties des GB pour permettre l'exécution de réponses comportementales. Ils reçoivent et intègrent également les afférences DAergiques provenant, comme vu précédemment, de la SNc pour le striatum dorsal et de la VTA pour le NAC, qui modulent la transmission glutamatergique dans le striatum. Ainsi, la DA module l'intégration des informations perçues par les MSN en attribuant une valeur motivationnelle, qu'elle soit positive ou négative, aux informations sensorielles et/ou contextuelles, pour optimiser les réponses comportementales de l'individu (Allichon et al., 2021; Bromberg-Martin et al., 2010).

Les MSN expriment l'acide glutamique décarboxylase 67 (GAD67), une enzyme de synthèse du GABA, qui en font majoritairement des neurones GABAergiques. Ces neurones sont caractérisés par une forte densité en épines dendritiques et une arborisation sphérique de petite taille, avec un soma de taille moyenne (10-20 µm) (Yelnik et al., 1991). Les épines dendritiques reçoivent les terminaisons glutamatergiques provenant du cortex cérébral, du thalamus, de l'amygdale et de l'hippocampe (Bolam et al., 2000). Ces dernières reçoivent également des afférences DAergiques et glutamatergiques régulant la transmission synaptique glutamatergique (Doig et al., 2010; Moss and Bolam, 2008). L'ensemble de ces connexions glutamatergiques et DAergiques avec les épines dendritiques des MSN forment un complexe synaptique tripartite. Cela signifie que les terminaisons nerveuses DAergiques et glutamatergiques convergent au même endroit sur une épine dendritique spécifique (Figure 18) (Smith and Bolam, 1990).

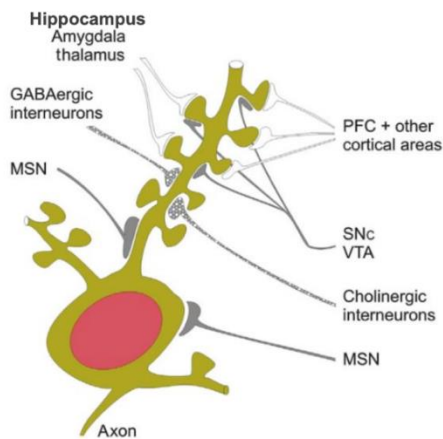


Figure 18 | Convergence des entrées glutamatergiques et DAergiques au niveau des MSN du striatum.

Les afférences glutamatergiques provenant du cortex, du thalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale projettent sur les épines dendritiques des MSN. Les afférences DAergiques de la SNc et de la VTA projettent sur le cou des épines ainsi que les prolongements dendritiques des MSN. Les afférences des interneurons GABAergiques, ChAT mais également les collatérales provenant de MSN projettent sur le niveau proximal des dendrites. D'après Steiner et Tseng, 2017.

Les MSN sont divisés en deux sous-populations majoritairement ségréguées en fonction de leurs expressions géniques et neuropeptidiques, ainsi que de leurs projections axonales (Gerfen et al., 1990 ; Smith et al., 1998). Ainsi on retrouve les MSN exprimant les récepteurs de la DA (DAR) D1 (D1R-MSN) et ceux exprimant les DAR D2 (D2R-MSN), appartenant principalement à la voie directe et indirecte, respectivement. Les D1R-MSN expriment, en plus du D1R, certains neuropeptides comme la substance P et la dynorphine ainsi que le récepteur muscarinique M4 de l'acétylcholine. Les D2R-MSN expriment, en plus du D2R, le récepteur A2A de l'adénosine (A2AR), le récepteur muscarinique M1 de l'acétylcholine et le neuropeptide enképhaline. Ces deux sous-types de MSN sont modulés différemment par la DA (Shen et al. 2007, Surmeier et al. 2007).

Lorsque les MSN reçoivent une information corticale, ils répondent avec un profil irrégulier, alternant entre de nombreuses bouffées de PA et de pauses, chez le rat. Chez le primate, les MSN possèdent une activité soutenue avec un profil de décharges divers (Adler et al, 2013). Chez le rat (Thorn & Graybiel, 2014) et le primate (Adler et al, 2013), les MSN sont caractérisés par un taux de décharge à basse fréquence (inférieur à 5 Hz). Pour tous les MSN, le potentiel membranaire de repos est d'environ -85 mV. En cas de forte activité glutamatergique sur les MSN, ceux-ci sont dépolarisés à -55 mV (proche du seuil d'excitation). L'excitabilité des MSN, c'est-à-dire leur capacité à recevoir et intégrer électriquement une information, peut être modifiée par les niveaux de DA.

De plus, des études électrophysiologiques menées sur des souris juvéniles et adolescentes ont montré que les neurones D2R-MSN sont plus excitable que les D1R-MSN. Toutefois, à l'âge adulte, les D1R-MSN deviennent plus facilement excitable que les D2R-MSN. Cette divergence pourrait être expliquée par un nombre différent de dendrites primaires ou bien par des différences dans les entrées présynaptiques, mais sont notamment liées à l'âge du sujet (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Cao et al., 2018; Gertler et al., 2008). Ainsi, les D1R- et D2R-MSN à l'âge adulte ne présentent pas les mêmes propriétés électrophysiologiques intrinsèques. Il a été démontré que la DA augmente l'activité des D1R-MSN et réduit l'activité des D2R-MSN, respectivement (Gerfen and Surmeier, 2011; Nicola et al., 2000). Cet effet opposé de la DA sur l'excitabilité neuronale des D1R-MSN et D2R-MSN est en partie due aux voies de signalisation distinctes activées en aval de la stimulation des D1R et D2R lorsque les niveaux de DA augmentent (voir Chapitre 2-III-1) (Figure 19) (Gerfen and Surmeier, 2011).

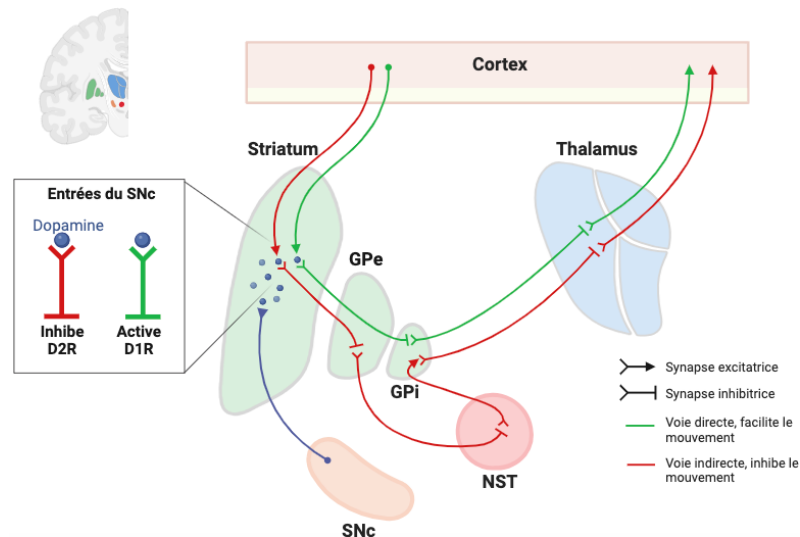


Figure 19 | Représentation schématique des circuits de la voie directe et indirecte.

La voie directe ou striatonigrale comprend les projections directes du striatum vers le GPi et la SNr qui projettent ensuite vers les centres moteurs du thalamus. La voie indirecte, ou striatopallidale, fait intervenir deux structures intermédiaires, les informations sont transmises vers le GPe puis le NST avant d'atteindre les noyaux de sortie des GB. De manière schématique, l'activation de la voie directe aboutit à une levée d'inhibition des projections thalamocorticales qui est associée à une facilitation de l'action, alors que l'activation de la voie indirecte conduit à une inhibition du mouvement par renforcement de l'inhibition issue des projections thalamocorticales (Kravitz et al., 2010). Schéma réalisé sur Biorender.

b. Autres populations : Interneurones GABAergiques et cholinergiques

Le striatum étant composé de 95 % de MSN, les 5 % de neurones restants sont des ChAT ou GABAergiques. Les interneurones GABAergiques striataux sont caractérisés par une activité phasique. Sur la base de leurs propriétés physiologiques, ils peuvent être scindés en deux classes (Burke et al., 2017; Kreitzer and Malenka, 2008; Tepper et al., 2018) :

- Les interneurones à pointe rapide, exprimant la parvalbumine (PV), autrement appelé FSI, *Fast Spiking Interneurons*)
- Les interneurones à pointe à bas seuil :
 - Les interneurones exprimant la calrétinine
 - Les interneurones exprimant la somatostatine, l'oxyde nitrique-synthase et le neuropeptide-Y, autrement appelé PLTS (*Persistent and Low Threshold Spike*)

Semblables aux MSN, les FSI possèdent un profil de réponse tonique avec des bouffées de PA entrecoupées de longues pauses (Yelnik, 2008, 2002). Les interneurones GABAergiques striataux de type FSI et PLTS projettent sur les MSN et d'autres interneurones (Lim et al., 2014). Le striatum contient également une petite population de ChAT géants qui se distinguent par leurs grands corps cellulaires, leur activité tonique *in vivo* et leurs arborisations axonales locales denses (Zhou et al., 2002). Ces ChAT sont des neurones à activité tonique (TAN). Ces neurones présentent trois types de patterns d'activités différents : régulier, irrégulier et avec des bouffées de PA (Aosaki et al., 1994). Ces TAN sont la principale source d'acétylcholine. Ils représentent environ seulement 1 à 2 % de toutes les cellules striatales, mais ils envoient des tiges denses de projections dans tout le striatum, influençant profondément la fonction striatale par le biais d'une variété de récepteurs muscariniques et

nicotiniques de l'acétylcholine (Lim et al., 2014). Récemment, il a été démontré que les ChAT libéraient également du glutamate (Lim et al., 2014; Nelson et al., 2014), notamment par les transporteurs vésiculaires VGLUT3 (Mansouri-Guilani et al., 2019), et qu'ils exprimaient également majoritairement le D2R (Bertran-Gonzalez et al., 2008), et très peu le D1R (Lim et al., 2014). De plus, le tonus inhibiteur des ChAT peut être modulé par l'état d'excitabilité des MSN (Lim et al., 2014), suggérant une connexion entre MSN et ChAT. De même, les neurones de projections GABAergiques de la VTA sont capables d'inhiber les ChAT du NAc (Lim et al., 2014). En retour, les TAN, via leur activité tonique, réduisent l'activité des MSN. Ainsi, les informations corticales reçues par les MSN sont soumises à divers contrôles médiés par les interneurons présents au sein du striatum. Lorsque les TAN sont stimulés par un signal motivationnel, que ce soit un événement positif ou récompensé, ou bien un événement négatif voir aversif, ils stoppent leur activité tonique, permettant aux MSN de recevoir et de traiter l'information corticale (Apicella et al., 1991; Kimura et al., 1984).

Par conséquent, le striatum est une structure recevant et transformant les informations provenant du cortex via des processus complexes d'activation et désactivation en plus du contrôle DAergique et cholinergique permettant le renforcement de l'apprentissage (Kimura, 1995; Schultz et al., 1997).

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes concentrés sur le rôle des deux sous-types de MSN, qui composent historiquement la voie directe et indirecte, en réponse aux stimuli récompensant, en particulier dans le cas des drogues addictives.

5. Voie directe et indirecte : historique et controverse

Le point de vue classique est que l'activation de la voie directe des MSN favorise l'initiation du mouvement, la motivation et l'apprentissage par le biais du renforcement positif, tandis que l'activation de la voie indirecte des MSN conduit à des résultats contraires, provoquant une réduction du mouvement et un évitement. La DA module l'activité des voies directe et indirecte de manière opposée. En effet, lorsque la DA augmente dans le striatum, elle stimule le D1R, ce qui facilite l'activation des D1R-MSN et favorise la potentialisation à long-terme (LTP) des synapses excitatrices et promeut le renforcement. À l'inverse, la stimulation de D2R inhibe les D2R-MSN, diminue leur excitabilité et favorise la dépression à long-terme (LTD) des synapses excitatrices, atténuant ainsi la fonctions "anti-récompense" des D2R-MSN. Ce modèle est étayé par l'expression différentielle des DAR dans les deux sous-populations de MSN : D1 et D2. Les D1R sont couplés aux protéines $G_{s/olf}$ et leur signalisation augmente les niveaux intracellulaires d'adénosine-monophosphate cyclique (AMPC) et l'excitabilité neuronale, tandis que les D2R se couplent aux protéines G_i et conduisent à des effets opposés (voir **Chapitre 2-III-1**). Par conséquent, la signalisation DA dans le striatum représente la principale modulation de l'activité des voies striatales (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gerfen and Surmeier, 2011). Grâce à l'expression dichotomique des D1R et D2R, la DA régule de manière différentielle l'excitabilité intrinsèque et la connectivité synaptique des MSN à voie directe et indirecte. Dans les deux cas, elle favorise le mouvement (Bariselli et al., 2019; Gerfen and Surmeier, 2011; Kreitzer and Malenka, 2008; Shen et al., 2008).

Au cours de ces dernières années, une étude réalisée au sein du striatum dorso-médian a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle les dMSN permettaient de promouvoir les actions et comportements, tandis que les iMSN les inhibaient (Kravitz et al., 2010). Toutefois, ces données ont été établies à travers la manipulation artificielle de ces deux voies, par contrôle optogénétique, qui ne

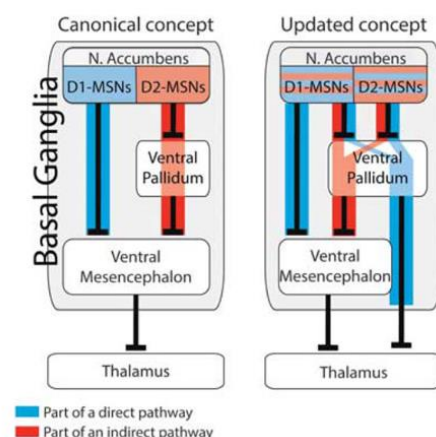
représente pas la réalité de ce qu'il se passe en conditions physiologiques. De plus, ces voies ont été décrites à l'origine pour le striatum dorsal, pour lequel il est communément admis que les D1R- et D2R-MSN exercent des effets opposés par le biais de projections de sorties distinctes (Albin et al., 1989) alors que la situation est différente pour les MSN du NAc. Ces découvertes ont ensuite été transposées au NAc, sans évidences particulières.

Des données récentes ont remis en question ce modèle de dichotomie entre la voie directe et indirecte, notamment dans le comportement motivé par la récompense. Il est désormais évident que le rôle des D1R- et D2R-MSN est plus complexe. Des études ont montré par imagerie calcique que ces deux voies sont activées simultanément lors de l'initiation de l'action et le contrôle fin de la motricité (Cui et al., 2013; Hikida et al., 2010; Tecuapetla et al., 2014; Vicente et al., 2016), suggérant que les D1R- et D2R-MSN travaillent de concert pour sélectionner et faciliter les réponses comportementales appropriées dans le striatum dorsal et le NAc. De plus, il a été montré que les populations D1R- et D2R-MSN du NAc sont activées de manière concomitante lorsque des rats sont entraînés à appuyer sur un levier pour obtenir une récompense alimentaire (Natsubori et al., 2017). Ces résultats rejoignent le Modèle de Mink de 1996, menant au développement d'un modèle complémentaire. Après des années de controverse, il est admis qu'un faible pourcentage des MSN du striatum dorsal et du NAc, en fonction de la sous-région, exprime à la fois les D1R et les D2R (2%–5% dans le striatum dorsal ; 6%–7% dans le core du NAc et 12%–15% dans le shell) (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gangarossa et al., 2013; Kupchik et al., 2015; Le Moine and Bloch, 1995).

De plus, la ségrégation entre la voie directe et indirecte n'est pas parfaite. L'utilisation de souris *Drd1-GFP* et la colocalisation dans le GP avec la synaptophysine, marqueur des terminaisons pré-synaptiques, ont permis de montrer que les D1R-MSN du striatum dorsal envoient des projections collatérales au GP (Cazorla et al., 2014), tandis que des techniques de traçages ont montré que la moitié des D1R-MSN projettent au sein du VP, qui est la structure de sortie des D2R-MSN (Baimel et al., 2019; Creed et al., 2016; Kupchik et al., 2015; Pardo-Garcia et al., 2019). En effet, approximativement 15% des neurones du VP projettent à la fois sur le mésencéphale ventral (VTA et SN) et le thalamus (Tripathi et al., 2013), faisant converger la voie directe et indirecte sur les mêmes neurones (Figure 20).

Figure 20 | Ancien et nouveau concept des voies directe et indirecte du NAc.

À gauche, le concept canonique historique. À droite, le nouveau concept. Dans le concept canonique, les D1R- et D2R-MSN sont entièrement ségrégués. Dans le concept actualisé, les deux sous-types de MSN font partie à la fois de la voie directe et de la voie indirecte, via leurs projections sur le VP et de manière dépendante des neurones du VP ciblés. D'après Kupchik and Kalivas, 2017.



Plus précisément, les MSN du NAc core projettent sur la partie dorsolatérale du VP et la partie médiale de la SN, tandis que les MSN du NAc shell innervent la partie ventrale du VP. Une plus large proportion des D1R-MSN du NAc core envoie des collatérales vers le VP, comparé aux D1R-MSN du NAc shell

(Pardo-Garcia et al., 2019). Ces différences de projections suggèrent que le NAc core et shell peuvent jouer des rôles distincts dans le traitement de l'information motivée par la récompense. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que l'inhibition chémogénétique de la sous-population de D1R-MSN rejoignant le VP contrôle le rétablissement de la recherche de cocaïne induite par les indices dans un paradigme d'auto-administration. Ils ont également montré que les D1R- et D2R-MSN projetant sur le VP régulent la recherche de cocaïne à la suite d'une réexposition aux indices et à une injection de cocaïne, contrairement aux MSN du shell. En revanche, les D1R- et D2R-MSN du shell projetant sur le VP sont impliqués dans la rechute suivant une nouvelle injection de cocaïne (Pardo-Garcia et al., 2019).

Ainsi, les afférences striatales du VP proviennent à la fois des D1R- et D2R-MSN, tandis que le mésencéphale ventral est sélectivement innervé par les D1R-MSN. En effet, les D1R-MSN du NAc shell innervent les neurones GABAergiques de la VTA médiale en ciblant préférentiellement les récepteurs GABA_A présents sur les interneurons GABAergiques. L'augmentation de la libération de GABA par les afférences D1R-MSN désinhibe les neurones DA de la VTA (Kupchik et al., 2015; Yang et al., 2018). Les projections D1R-MSN vers la VTA provenant de la partie médiane du shell du NAc ciblent également les neurones DAergiques innervant l'accumbens directement par l'intermédiaire des récepteurs GABA_B. Cette voie comprend une rétroaction négative retardée sur la signalisation DA mésolimbique (Pardo-Garcia et al., 2019; Yang et al., 2018).

En outre, des inhibitions latérales réciproques, au sein du striatum, entre les deux sous-types de MSN ont été décrites. La probabilité de connexions entre les D1R- et D2R-MSN est asymétrique. Les D2R-MSN forment plus de connexions avec les D1R-MSN et les D2R-MSN, tandis que les D1R-MSN sont plus susceptibles d'être connectés à d'autres D1R-MSN, et plus faiblement aux D2R-MSN (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). Ce modèle de connexions collatérales plaide en faveur d'un rôle synergique plutôt que dichotomique entre les voies directes et indirectes, dans les comportements motivés par la récompense (Figure 21) (Burke et al., 2017).

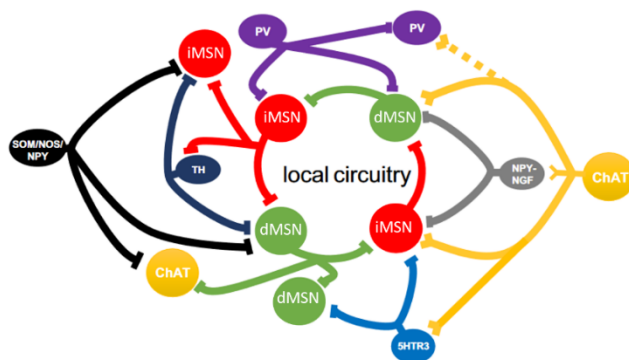


Figure 21 | Schéma de la connectivité intrastriatale entre les interneurons et les neurones de projection.

Abréviations : dMSN : D1R-MSN ; iMSN : D2R-MSN ; ChAT : interneurons cholinergiques ; TH : tyrosine hydroxylase ; SOM : somatostatine ; NOS : oxyde nitrique synthase ; NPY : neuropeptide Y ; NGF : neurogliaforme ; 5HT3R : récepteur de la sérotonine 3 ; PV : parvalbumine. D'après Burke et al., 2017.

Ainsi, de par la formation de collatérales entre D1R- et D2R-MSN au sein du NAc, il est possible que l'activité des D2R-MSN régule la réintégration par le biais d'influences collatérales sur D1R-MSN. La suppression sélective des D2R dans les D2R-MSN a entraîné une augmentation de la force du courant tonique médié par les D2R-MSN, réduisant le déclenchement *in vivo* des MSN et altère la locomotion. Ainsi la modulation des collatérales des D2R-MSN projetant sur les D1R-MSN du NAc a un rôle fonctionnel et pourrait être un mécanisme important permettant aux D2R-MSN de participer à l'activité locomotrice, en favorisant l'activité des D1R-MSN (Burke et al., 2017; Lemos et al., 2016). En

effet, l'activation aiguë des D2R dans les D2R-MSN supprime l'inhibition latérale sur les D1R-MSN (Burke et al., 2017). Une autre étude a mis en évidence des collatérales inhibitrices des D2R-MSN sur les D1R-MSN. En outre, la cocaïne altère l'efficacité de ces collatérales pour faciliter l'activité des D1R-MSN et induire une activité locomotrice aiguë. Cette étude tire parti d'un modèle murin récemment développé permettant la suppression ciblée des D2R dans les D2R-MSN. Ce modèle a permis de découvrir un nouveau mécanisme synaptique par lequel la cocaïne et la DA régulent la connectivité intra-striatale afin de faciliter la locomotion, et montrer que les D2R dans les D2R-MSN sont nécessaires à l'effet stimulant de la cocaïne dans la locomotion (Dobbs et al., 2016).

Ce modèle d'inhibition latérale permet de relier les études mettant en évidence le modèle dichotomique de la voie directe et indirecte avec le modèle complémentaire synergique. Le striatum peut donc réaliser sa tâche importante de sélection des actions motrices en favorisant un comportement tout en inhibant les autres, en contrôlant l'excitabilité des cellules voisines, grâce à une action synergique des D1R- et D2R-MSN (Burke et al., 2017). Compte tenu de cette dichotomie qui n'est pas si franche, on parlera par la suite de D1R-MSN et D2R-MSN et non de MSN des voies directe et indirecte.

Il a été proposé que les adaptations comportementales induites par les substances addictives impliquent initialement le NAc. La formation de comportements habituels allant jusqu'à la consommation compulsive, reposerait sur un recrutement progressif des sous-régions striatales ventro-médiales vers les régions striatales dorso-latérales qui participeraient à la transition de l'usage récréatif de drogues à l'usage compulsif. Ce recrutement graduel des parties dorsales du striatum repose sur plusieurs boucles (ou spirales) initiées par la libération de DA induite par les drogues. Cela contribue à augmenter la valeur motivationnelle de l'indice (ou de l'état) qui précède l'obtention prévisible de la récompense. À mesure que la valeur de l'indice augmente, sa présentation active les D1R-MSN dans le NAc qui envoient leurs projections GABAergiques sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Cela facilite la désinhibition des neurones DA de la VTA et de la SNc, et provoque une RPE induite par la DA et les indices dans le NAc, et le striatum dorsal. Ainsi, cette spirale du système DAergique suggère un rôle important du NAc dans le relais d'information vers une région plus dorso-latérale du striatum, le DMS (Burton et al., 2015; Keiflin and Janak, 2015). Il a été proposé que la plasticité synaptique provoquée par la drogue renforce la connectivité au sein de la boucle, ce qui conduirait au recrutement d'un nombre croissant de projections dorsales au fur et à mesure de la consommation de drogue (Burton et al., 2015; Lüscher and Malenka, 2011). De plus, le core et le shell du NAc ne projettent pas que sur des structures des GB, mais également sur le VP (Nicola, 2007). Dans le chapitre suivant, nous allons nous concentrer sur les stades précoces, majoritairement au sein du NAc et du DMS du striatum car les modèles précliniques utilisés dans les études détaillées ci-dessous sont basées sur des expositions relativement courtes aux psychostimulants.

II. Rôle des MSN dans les réponses aux psychostimulants

Les recherches menées ces dernières années sur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'addiction aux substances concernent majoritairement les adaptations induites par les psychostimulants, tels que les amphétamines et la cocaïne. Le développement de nouvelles approches, telles que l'optogénétique et la chémogénétique, qui permettent de moduler l'activité neuronale de façon cellule-spécifique, a permis de mieux comprendre le rôle des D1R-MSN et D2R-MSN dans les réponses induites par cette classe de drogues. Ces techniques permettent de cibler une population neuronale spécifique pour

l'activer ou l'inhiber, grâce à l'utilisation d'opsines dont l'expression est sous le contrôle de promoteur spécifique d'une population neuronale d'intérêt. Par exemple, il est possible de cibler les D1R-MSN grâce au promoteur de la préprotachykinine (PPTA) ou les D2R-MSN avec celui de la préproenképhaline (PPE) (Dos Santos et al., 2017; Ferguson et al., 2011; Hikida et al., 2010).

Ces techniques peuvent également reposer sur l'utilisation de virus codant des versions « floxées » d'opsines, c'est-à-dire dont l'expression est dépendante de la Cre-recombinase, injectées dans des lignées de souris exprimant la Cre-recombinase dans les neurones exprimant le D1R (souris *drd1a-cre*) ou le D2R (*drd2-cre* ; *adora2a-cre*). Cette approche est la plus communément utilisée (Bock et al., 2013; Calipari et al., 2016; Chandra et al., 2013; Dobbs et al., 2016; Durieux et al., 2009; Farrell et al., 2013; Lobo et al., 2010; Pascoli et al., 2018; Song et al., 2014; voir **tableau 1** ; Salery et al., 2020). Une étude utilise le blocage de la transmission synaptique au niveau des D1R-MSN ou des D2R-MSN, grâce à l'expression contrôlée dans le temps de la toxine tétanique dans les D1R-MSN (utilisation du promoteur PPTA) ou dans les D2R-MSN (utilisation du promoteur PPE; Hikida et al., 2010) ou l'ablation spécifique des D1R-MSN ou D2R-MSN par expression de la toxine diphtérique (Durieux et al., 2009). Comme nous allons le voir par la suite, les observations faites en utilisant ces approches suggèrent des fonctions distinctes et parfois complémentaires des D1R-MSN et D2R-MSN, en particulier dans les apprentissages liés à la récompense et également dans les différentes phases de l'addiction aux psychostimulants.

Par exemple, dans le NAc, l'activation par optogénétique des D1R-MSN facilite la CPP induite par une faible dose de cocaïne (Lobo et al., 2010), tandis que l'inhibition des D1R-MSN par chémogénétique dans le striatum dorsal (Ferguson et al., 2011) et le NAc (Calipari et al., 2016; Chandra et al., 2013), ou l'ensemble du striatum (Hikida et al., 2010) diminue la sensibilisation locomotrice et la CPP induite par les psychostimulants.

De manière similaire à la stimulation des D1R-MSN, l'ablation sélective des D2R-MSN au sein du NAc, via la toxine tétanique, augmente l'activité locomotrice basale après administration d'amphétamine et renforce le développement et le maintien de la CPP induite par cette drogue (Durieux et al., 2009). L'inhibition chémogénétique transitoire des D2R-MSN au sein du DMS améliore la sensibilisation locomotrice induite par l'amphétamine. L'effet de l'inhibition transitoire des D2R-MSN sur la sensibilisation est persistante comme observé lors d'un *challenge* réalisé par une nouvelle exposition à la drogue après une période de sevrage (Ferguson et al., 2011). À l'inverse, la stimulation des D2R-MSN par optogénétique pendant le développement de la CPP réduit la CPP induite par une forte dose de cocaïne. Stimuler leur activation grâce à une approche chémogénétique, au sein du striatum à la fois ventral et dorsal, bloque la sensibilisation locomotrice induite par l'amphétamine, ainsi que son expression lors d'un *challenge* sans CNO suivant une période de sevrage (Farrell et al., 2013). Cette manipulation réduit également la réponse locomotrice induite par une réexposition aux psychostimulants après une période de sevrage (Song et al., 2014). De plus, la stimulation concomitante des D1R- et D2R-MSN pendant le développement de la CPP provoque une augmentation de la CPP induite par la cocaïne (Lobo et al., 2010), suggérant ainsi que les conséquences comportementales induites par l'activation des D1R-MSN prédominent sur celles déclenchées par l'activation des D2R-MSN.

Tableau 1 : Manipulations cellulaires-spécifiques et conséquences comportementales (modifié d'après Salery et al. 2020)

Modèle	Drogue	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	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ablation des <u>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).	<p>Injection (Inj) aigue (cocaïne : 10mg/kg, méth. 2mg/kg)</p> <p>Sensibilisation locomotrice / CPP (cocaïne 10mg/kg)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des D1R-MSN ou des <u>D2R-MSN</u> (striatum entier) : ↑ hyperlocomotion induite par la méthamphétamine ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> (striatum entier) : ↑ hyperlocomotion induite par la cocaïne ▪ Inhibition des D1R-MSN; ↓ sensibilisation et CPP ▪ Inhibition des <u>D2R-MSN</u>: <ul style="list-style-type: none"> - 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)	<p>CPP (5 mg/kg)</p> <p>CPP (7mg/kg)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activation des D1R-MSN pendant le conditionnement : ↓ CPP ▪ Activation de tous les MSN pendant le conditionnement : ↓ CPP ▪ Activation des <u>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-pDyrn-hM4D CNO 1mg/kg	<p>Sensibilisation locomotrice (2mg/kg ; 0,5 mg/kg)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des D2R-MSN: ↑ sensibilisation et son expression après un sevrage et challenge d'amphét sans CNO ▪ Inhibition des D1R-MSN: ↓ 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-cre</i> Tomato - Fibres optique dans le NAc core (impulsions lumineuses de 4 ms à 1 Hz pendant 10 min)	<p>Inj. chroniques (15mg/kg)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dépotentialisation des projections infralimbiques du PFC sur le NAc core: <ul style="list-style-type: none"> - 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/chimogénétique 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	<p>Auto-administration (AD) Intraveineuse (IV, 1-2mg/kg par perfusion)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition chimogénétique des <u>D2R-MSN</u> : augmente la motivation à s'auto-administrer de la cocaïne ▪ Activation optogénétique de <u>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)	Inhibition des <u>D1R-MSN</u> : ↓ sensibilisation locomotrice	Chandra et al. 2013
Souris	Amphét.	Activation chimogénétique des D2R-MSN dans l'ensemble du striatum <i>adora2a-m3Ds</i> CNO 1mg/kg	Sensibilisation locomotrice (2mg/kg)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activation <u>D2R-MSN</u>: <ul style="list-style-type: none"> - ↓ 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-tdTomato</i> Impulsions légères 4 ms à 1 Hz ou 13 Hz pendant 10 min	AD (0.75mg/kg/inf)	IV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dépotentialisation des projections de l'hippocampe ventral sur les <u>D1R-MSN</u> du <u>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 périodes de 3 min durant des sessions de 40 min)	Sensibilisation locomotrice (15mg/kg)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activation des <u>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)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> pendant le conditionnement : ↓ CPP ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> pendant le test : ↓ CPP ▪ Inhibition des <u>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-KO</i> <i>adora2a-cre</i> x <i>drd2^{lox/lox}</i> (D2R-MSN- <i>Drd2KO</i>) AAV5-hSyn-DIO-hm4Di dans le noyau NAc	Inj. aigue (15mg/kg)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des <u>D2R-MSN</u>: restaure la réponse locomotrice aigue chez les souris <u>D2R-MSN-<i>drd2-KO</i></u> 	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-Tomato</i> 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		<ul style="list-style-type: none"> ▪ <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 ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> par l'administration de <u>CNO</u>: <ul style="list-style-type: none"> - ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> par <u>CNO local</u> dans le pallidum ventral: <ul style="list-style-type: none"> - ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne 	Pascoli et. 2018
Rat	Cocaïne	Inhibition chémogénétique des D1R-MSN dans le NAc <i>drd1a-Cre</i> 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)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> par l'administration de <u>CNO</u>: <ul style="list-style-type: none"> - ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u> par <u>CNO local</u> dans le pallidum ventral: <ul style="list-style-type: none"> - ↓ 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)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition des <u>D1R-MSN</u>: <ul style="list-style-type: none"> ↓ la rechute induite par un indice associé à la cocaïne mais pas la saccharose 	Yager et al. 2019

Ainsi, les D2R-MSN semblent avoir des effets opposés aux D1R-MSN sur la motivation ou la préférence pour la récompense (Durieux et al. 2009, Lobo et al. 2010). Ces avancées soutiennent un modèle binaire et dichotomique, pour lequel nous avons montré précédemment de nombreuses évidences soulignant la complexité du striatum et de son rôle au sein des GB. Il est important de noter que ces travaux ont été réalisés grâce à des approches expérimentales nouvelles et essentielles, mais qu'elles modulent artificiellement les D1R- et D2R-MSN. Ces modulations engendrent des effets opposés comme si les drogues conduisaient ce système dans une voie dichotomique. Cette modulation artificielle ne tient pas compte de l'impact physiologique des drogues sur le circuit de la récompense, en particulier sur les deux sous-populations de MSN.

Une étude a montré que l'exposition répétée à la cocaïne potentialise les synapses des D1R-MSN et dépotentialise celles des D2R-MSN projetant sur les neurones du VP (Creed et al., 2016). La potentialisation se traduit par un renforcement de la transmission glutamatergique médiée par une insertion de récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA, AMPAR) (voir Chapitre 2-III-2-a) en postsynaptique. Ensuite, par traitement optogénétique à basse fréquence au niveau des afférences glutamatergiques sur les D1R-MSN, ils ont rétabli la transmission basale par dépotentialisation, provoquant une réduction des AMPAR membranaires (Figure 22).

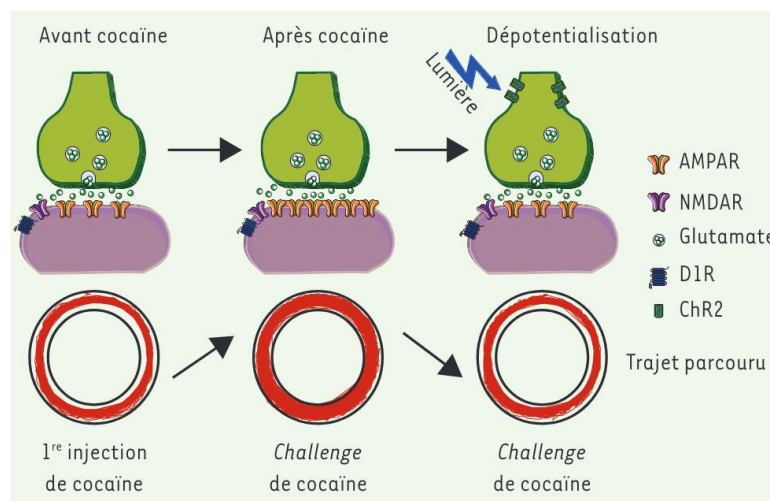


Figure 22 | Schéma représentant la plasticité synaptique liée à la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne.

Les entrées glutamatergiques du cortex infralimbique contactent les D1R-MSN du NAc via leurs synapses. Les D1R-MSN contiennent un pool défini de AMPAR qui définit l'efficacité basale de la transmission glutamatergique. L'administration aiguë ou chronique de cocaïne induit une hyperactivité locomotrice (en rouge dans le cercle représentant un cyclotron), renforçant la transmission glutamatergique à travers l'insertion de AMPAR à la membrane synaptique (potentialisation synaptique). La répétition des injections de cocaïne augmente l'hyperactivité locomotrice, entraînant une réponse sensibilisée de l'animal. La stimulation optogénétique des entrées glutamatergiques permet de rétablir la transmission basale par un mécanisme de dépotentialisation associé à une internalisation des AMPAR membranaires, qui abolit la sensibilisation locomotrice. D'après Lüscher and Pascoli, 2012.

La restauration de la transmission basale par dépotentialisation *in vivo* des D1R-MSN vers le VP a aboli la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne. À l'inverse, la potentialisation des D2R-MSN-VP n'a pas affecté la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne. Cependant, cette manipulation

restaure les déficits de motivation chez les souris ayant été sensibilisée, qui ont par la suite, après 10 jours de sevrage, réalisé une tâche opérante avec une récompense hédonique de saccharose. Les souris traitées avec la cocaïne et dont la transmission glutamatergique a été restaurée par optogénétique n'affichent plus d'anhédonie pour la récompense naturelle (Creed et al., 2016). Ces résultats suggèrent l'implication des synapses D2R-MSN vers le VP dans les états émotionnels négatifs, caractérisés par exemple par des symptômes d'aversion et de dépression qui apparaissent après le sevrage à la cocaïne (Kravitz et al., 2012; Lobo et al., 2010). En accord avec ces résultats, l'équipe de C. Lüscher a montré que la sensibilisation locomotrice induite par des injections chroniques de cocaïne est associée à une potentialisation des entrées corticales excitatrices sur les D1R-MSN, mais pas sur les D2R-MSN dans le NAc (Pascoli et al., 2012). Cette même équipe a récemment montré que l'autostimulation compulsive de la transmission de DA, qui modélise l'addiction, repose sur la potentialisation des projections excitatrices du cortex orbitofrontal sur les D1R-MSN du striatum dorsal chez les rats persévérants (Pascoli et al., 2018).

Les drogues addictives détournent ce circuit pour fixer une valeur de récompense élevée de la drogue et des indices associés en stimulant de manière concomitante les D1R et D2R de la voie directe et indirecte respectivement. Cette double stimulation provoque un déséquilibre de la balance entre la voie directe et indirecte, notamment dans le NAc (Lobo and Nestler, 2011).

L'ensemble de ces travaux montre que les psychostimulants induisent, de manière DA dépendante, une plasticité synaptique cellule spécifique avec, dans le cas de la cocaïne, une potentialisation des D1R-MSN dans le NAc. De plus, ces travaux établissent un lien causal entre la facilitation de la transmission glutamatergique par la DA dans les neurones D1R-MSN et les adaptations comportementales induites par les psychostimulants. Il apparaît donc important d'étudier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'intégration des signaux DAergiques et glutamatergiques au niveau des D1R- et D2R-MSN et leur détournement par les substances addictives. Il est également important de mentionner que de nombreuses pathologies psychiatriques, outre l'addiction, sont associées à un déséquilibre de la transmission de ces signaux. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'intégration des signaux DAergique et glutamatergique pourrait contribuer au développement de futures stratégies thérapeutiques innovantes dans le contexte de nombreuses maladies psychiatriques.

III. Rôle des interactions dopamine-glutamate au sein du striatum dans les réponses aux psychostimulants et mécanismes moléculaires sous-jacents

Avant de décrire comment l'intégration des signaux DAergique et glutamatergique est réalisée au sein du striatum, et comment celle-ci est altérée en réponses aux psychostimulants, il est nécessaire de passer brièvement en revue les différents types de récepteurs de ces deux neurotransmetteurs exprimés dans cette structure cérébrale.

1. Les récepteurs de la dopamine

La signalisation DA dans le système nerveux central joue un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs aspects des fonctions cérébrales, notamment le comportement moteur, la motivation, l'apprentissage et la mémoire (Schultz, 2007). La DA exerce ses fonctions sur les DAR qui sont des récepteurs métabotropes conservés au cours de l'évolution et font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), constitués de sept domaines transmembranaires. La protéine G est

une protéine hétérotrimérique composée de sous-unités α , β et γ . Suite à la liaison de la DA à son récepteur, la sous-unité α se dissocie de l'hétérodimère β/γ , favorisant ainsi l'interaction de la protéine G avec l'adénylcyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMPc, un second messenger important du SNC (Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Burke et al., 2017; Tritsch and Sabatini, 2012).

Il existe cinq types de DAR (D1R, D2R, D3R, D4R et D5R). Ils peuvent émettre un signal par la voie canonique de la protéine G, mais aussi par des mécanismes indépendants de la protéine G, par exemple par la liaison aux bêta-arrestines ou l'hétéromérisation (voir **Chapitre 2-IV**).

L'influence de la DA sur la fonction striatale est vaste et complexe en raison de la variété des récepteurs de type D1 (D1R et D5R) et D2 (D2R, D3R et D4R) situés à la fois sur les terminaisons axonales et les sites postsynaptiques dans le striatum (**Tableau 2**) (Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Burke et al., 2017; Tritsch and Sabatini, 2012).

	D1-like Family		D2-like Family		
DA-R subtype	D1	D5	D2	D3	D4
Gene Name	<i>Drd1a</i>	<i>Drd5</i>	<i>Drd2</i>	<i>Drd3</i>	<i>Drd4</i>
Number of Introns	0	0	6	5	3
Splice variants	No	No	Yes (D2S, DSL)	Yes	Yes
Affinity for DA (μM)	1.0-5.0	0.2-2.0	0.2-2.0	0.02-0.2	0.01-0.1
G protein coupling	G_{α_s} , $G_{\alpha_{olf}}$	G_{α_s} , G_{α_q}		G_{α_i} , G_{α_o}	
Specific agonists	SKF-38393, SKF-81297		(-)Quinpirole, Cabergoline		
Specific antagonists	SCH-23390, SKF-83566		(-)Sulpiride, Spiperone, Nemonapride		

Tableau 2 | Caractéristiques principales des DAR.

D'après Tritsch and Sabatini, 2012.

L'affinité des récepteurs de type D2 pour la DA est généralement décrite comme étant 10 à 100 fois supérieure à celle des récepteurs de type D1. En effet, les D2R et D4R présentent la sensibilité la plus élevée pour la DA et les D1R la plus faible (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). En outre, les D1R et D2R peuvent exister à la fois dans des états de haute et de basse affinité puisque l'augmentation de DA dans le NAc active non seulement le récepteur D1R de faible affinité dans les neurones striatonigraux, mais sature également le récepteur D2R de haute affinité dans les neurones striatopallidiaux (**Tableau 1**) (Hikida et al., 2010). Ces divergences suggèrent un rôle différent pour les deux types de DAR, étant donné que les neurones DAergiques peuvent avoir deux schémas différents de libération de DA, tonique ou phasique, en fonction de leurs propriétés de déclenchement. Par conséquent, il est supposé que le D1R, de faible affinité pour la DA, est activé de préférence par les concentrations élevées et transitoires de DA médiées par les salves phasiques des neurones DAergiques. En revanche, les D2R, de forte affinité pour la DA, pourraient détecter les niveaux plus faibles de libération tonique de DA (Grace et al., 2007; Schultz, 2007).

Au cours de ma thèse, nous nous sommes uniquement intéressés aux D1R et D2R, exprimés par les MSN. Par souci de synthèse, nous allons donc nous concentrer sur ces deux types de récepteurs

DAergiques, les D1R et D2R, qui sont les DAR les plus abondamment exprimés au sein du cerveau et qui jouent un rôle majeur dans l'addiction.

a. Les récepteurs de type D1

Ils sont classés en deux familles, en fonction du type de protéine G à laquelle ils sont couplés. La famille des D1R est associée à la protéine $G_{s/oif}$ (Hervé et al., 2001), qui est couplée positivement à l'AC. Ainsi, lorsque la dopamine se lie au DAR de type D1 du striatum, elle active l'AC de type 5 ce qui augmente le niveau intracellulaire d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA) en aval (Konradi et al., 1996; Valjent et al., 2005, 2000). La PKA est composée de quatre sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. Elles sont inactives jusqu'à ce que l'AMPc se lie aux sous-unités régulatrices. Cela dissocie et libère les sous-unités catalytiques qui deviennent actives et qui vont ensuite phosphoryler leurs protéines cibles parmi lesquelles on compte les récepteurs ionotropiques du glutamate tel que les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA, NMDAR) et AMPAR (voir Chapitre 2-III-2-c), ainsi que les facteurs de transcription (Tritsch and Sabatini, 2012).

Les récepteurs de type D1 sont composés des D1R et D5R. Les gènes codant pour les récepteurs de type D1 sont constitués d'un seul exon, ce qui ne génère pas d'épissage alternatif. Les D1R sont exprimés à un niveau de densité élevé en pérисynaptique et extrasynaptique au niveau du cou des épines dendritiques (Huang et al., 1992; Smiley et al., 1994). Ils sont exprimés plus largement dans les régions qui composent le circuit de la récompense recevant les afférences DAergiques, telles que le striatum (dorsal et NAc), la SN, le OT, le cortex (préfrontal, cingulaire et piriforme) et l'amygdale, et plus faiblement dans l'hippocampe, le cervelet, le thalamus et l'hypothalamus (Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Tritsch and Sabatini, 2012). Ils sont principalement exprimés par les MSN de la voie directe (Gerfen et al., 1990), même si une proportion de MSN de la voie indirecte exprime également les D1R (Bertran-Gonzalez et al., 2008).

Le D1R a fait l'objet d'études dans un contexte d'addiction aux drogues (pour revue, Baik, 2013). Dans cette revue, les auteurs recensent un certain nombre d'études montrant que les DAR de type D1 sont impliqués dans les changements de l'activité locomotrice induits par la cocaïne. Cependant, les études basées sur l'utilisation de composés pharmacologiques (en local ou périphérique) ont donné lieu à des résultats contradictoires, notamment à cause de l'application de divers antagonistes, à des doses différentes, mais également de l'emploi de différents modèles animaux (Self, 2010). Ainsi, les études basées sur l'utilisation d'un modèle génétique (Knock-out, KO) sont plus pertinentes.

Les D1R sont impliqués dans les réponses comportementales à court et long termes induites par les drogues addictives comme les psychostimulants. Le blocage pharmacologique de ces récepteurs à travers l'antagoniste des D1R, le SCH23390, empêche la réponse locomotrice aiguë dans le cas d'une sensibilisation locomotrice induite par la méthamphétamine, ainsi que le développement de la CPP induite par la cocaïne chez le rat (Adams et al., 2001; Gu et al., 2020; Kuribara, 1995; Liao et al., 1998). Cependant, ces effets ne sont pas entièrement observés chez des souris D1R KO. La sensibilisation locomotrice, l'apparition de stéréotypies ainsi que l'auto-administration suivant l'administration aiguë ou chronique de cocaïne ont été abolies, contrairement au développement de la CPP qui est préservée, ainsi que l'auto-administration à la nourriture (Caine et al., 2007; Miner et al., 1995; Xu et al., 2000, 1994).

Les D1R et D5R possèdent des séquences similaires et provoquent tous deux la production d'AMPC et l'activation de la PKA. Les D5R ont cependant plus d'affinité pour la DA que D1R, et s'expriment à de faibles niveaux dans de multiples régions du cerveau, notamment dans les neurones pyramidaux du cortex (préfrontal, prémoteur, cingulaire et entorhinal), dans la SNc et la VTA, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cervelet. Un très faible niveau d'expression a également été observé dans les MSN (Ariano et al., 1997; Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Khan et al., 2000). Le D5R a montré un rôle uniquement dans les réponses aiguës de la cocaïne, contrairement aux D1R. En effet, une diminution de la réponse aiguë suivant une injection de cocaïne a été observée chez les souris D5R KO (Elliot et al., 2003). Une autre étude a également montré une augmentation des courants dépendants des récepteurs glutamatergiques de type NMDAR dans la VTA suite à la stimulation des D5R par la cocaïne (Schilström et al., 2006). Cependant, le rôle des D5R dans les réponses induites par les drogues reste à ce jour encore mal connu.

b. Les récepteurs de type D2

Le D2R est couplé négativement à l'AC par l'intermédiaire de la protéine $G_{i/o}$, inhibant l'activité des neurones exprimant le D2R. Au niveau des protéines, les récepteurs de type D1 et D2 partagent un haut niveau d'homologie et présentent des propriétés pharmacologiques similaires, bien que le rôle principal des D2R comprenne l'inhibition et la modulation de la neurotransmission DA globale (Baik, 2013). Les récepteurs de type D2 possèdent des isoformes générés par épissage alternatif du gène *drd2*, ce qui donne lieu à des isoformes ayant des propriétés physiologiques et une localisation subcellulaire distinctes. Les plus connus et caractérisés sont les isoformes court (D2S) et long (D2L). Ils sont identiques à l'exception d'un insert de 29 acides aminés présent dans la troisième boucle intracellulaire putative de D2L situé entre l'intron 4 et 5, un domaine intracellulaire supposé jouer un rôle dans le couplage de cette classe de récepteurs à des seconds messagers spécifiques. Toutefois, ces deux isoformes pourraient avoir des fonctions différentes *in vivo* (Dal Toso et al., 1989; Lindgren et al., 2003; Usiello et al., 2000). En effet, le phénotype des souris D2S KO s'est avéré très différent de celui des souris KO D2L. De plus, l'isoforme D2L semble être exprimé de façon dominante dans toutes les régions du cerveau, bien que le ratio exact des deux isoformes puisse varier. En effet, il a été démontré que D2S est majoritairement exprimé au niveau présynaptique et qu'il est principalement impliqué dans les fonctions auto-réceptrices, tandis que D2L semble être principalement une isoforme postsynaptique (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000). Il est à noter que seule l'isoforme D2L est capable d'activer les voies de signalisations β -arrestine et la kinase 2 du GPCR (GRK2) (Beaulieu et al., 2007), par lequel les D2R sont capables de signaler indépendamment de la protéine G_i , déclenchant l'activation de la voie GPCR kinase GRK2 (Pack et al., 2018). D'autre part, de nombreux variants des D3 et D4 ont également été décrits (pour revue, Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Tritsch and Sabatini, 2012).

Les D2R sont localisés au niveau post-synaptique. Les niveaux les plus élevés de D2R se trouvent dans le striatum dorsal, le NAc et le OT. Ils sont également exprimés à de faibles niveaux dans la SN, la VTA, l'hypothalamus, les zones corticales, le septum, l'amygdale et l'hippocampe (Baik, 2013; Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Ils sont aussi présents dans les ChAT, dans les terminaux présynaptiques des neurones DAergiques du mésencéphale et au sein des neurones glutamatergiques corticostriataux (Dobbs et al., 2016; Tritsch and Sabatini, 2012). Ainsi, l'activation des D2R présynaptiques diminue la libération de glutamate des MSN du NAc et du striatum dorsal, et réduit la libération d'acétylcholine par les interneurons cholinergiques striataux (Le Moine et al., 1990; Tritsch and Sabatini, 2012). Les

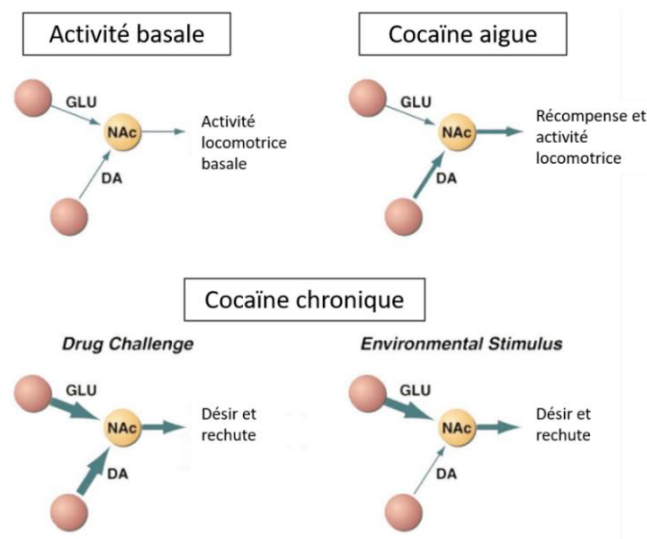
souris D2R KO dans les ChAT présentent une diminution de la locomotion après une exposition aiguë, une inhibition de la sensibilisation locomotrice et de la CPP à la cocaïne (Lewis et al., 2020). La stimulation par la DA ou encore l'activation optogénétique des D2R dans les D2R-MSN produit des changements bien décrits dans la signalisation intracellulaire, la voie biochimique et l'expression des gènes (Dobbs et al., 2016; Girault and Greengard, 2004; Tritsch and Sabatini, 2012).

L'utilisation d'approches pharmacologiques a montré que, chez les rongeurs prétraités avec le SCH23390, la réponse locomotrice était atténuée suite à une administration aiguë de cocaïne, tandis que l'halopéridol et raclopride, des antagonistes D2R, n'ont pas eu cet effet. Ces résultats suggèrent des rôles différents des sous-types de DAR dans la modulation des effets stimulants de la cocaïne en aigu sur la locomotion. Cependant, l'utilisation d'antagoniste D1R ou D2R n'a pas affecté la sensibilisation comportementale induite par des injections répétées de cocaïne (pour revue voir Baik, 2013). Concernant les réponses comportementales induites par les drogues, les souris D2R KO s'auto-administrent beaucoup plus de cocaïne que les souris contrôles (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). Le D2R étant localisé à la fois dans les compartiments pré et post-synaptiques, 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 DAergiques. Ces travaux ont montré 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 chez ces souris (Bello et al., 2011). De plus, la réponse locomotrice aiguë, l'induction de c-Fos et de ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) induite par la cocaïne sont inhibées chez les souris D2R KO dans les D2R-MSN (Kharkwal et al., 2016).

2. Les récepteurs du glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire au sein du cerveau chez les vertébrés. Toutefois, il s'agit également d'une excitotoxine qui peut détruire les neurones du SNC par une activation excessive des récepteurs exciteurs, et ainsi provoquer une excitotoxicité. D'un point de vue physiologique, il joue un rôle primordial dans la modulation des réponses émotionnelles, la mémoire et l'apprentissage, mais également dans les adaptations moléculaires et comportementales induites par la cocaïne. En effet, une administration aiguë de psychostimulants déclenche une augmentation de DA dans le striatum sans altérer les niveaux de glutamate. Cependant, l'augmentation aiguë de DA déclenche des cascades de signalisation qui affecteront la transmission du glutamate en modifiant l'activité de ses récepteurs. En revanche, les administrations répétées de psychostimulants augmentent à la fois les niveaux de DA et de glutamate au sein du striatum (Figure 23) (Kalivas, 2004; Newcomer et al., 2000; Reid et al., 1997; Scott et al., 2001).

Figure 23 | Schémas représentatifs de l'implication du glutamate (GLU) et de la dopamine (DA) dans les réponses comportementales induites par la cocaïne.



La libération tonique de DA et GLU dans le NAc en condition basale est associée à une activité locomotrice basale. L'administration aigüe de cocaïne entraîne une augmentation de la libération de DA uniquement, associée à une stimulation de l'activité locomotrice et un effet récompensant. L'administration chronique de cocaïne peut engendrer la rechute lors d'une nouvelle exposition à la drogue associée à une augmentation de la libération de DA et de GLU. En l'absence de cocaïne, l'exposition à un indice contextuel associé à la drogue augmente la libération de GLU et peu de DA, et provoque un comportement de recherche de drogue accompagné d'une rechute. D'après Cornish et Kalivas, 2001.

Le glutamate agit sur différents récepteurs du glutamate qui sont classés en deux types principaux : les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (iGluR) (Kalivas, 2009).

Les mGluR sont un type de récepteur couplé aux GPCR qui répondent au glutamate et qui déclenchent une série d'événements de signalisation intracellulaire via une voie médiée par la protéine G, provoquant une cascade de réactions biochimiques au sein de la cellule. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, classés en trois groupes : Groupe I (mGluR1 et mGluR5), Groupe II (mGluR2 et mGluR3) et Groupe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8). Ils peuvent moduler la libération de neurotransmetteurs, influencer la force synaptique et jouer un rôle dans la plasticité synaptique et d'autres processus cellulaires. De plus, certains sous-types peuvent activer une cascade de signalisation conduisant à une modulation indirecte des canaux ioniques dans la membrane postsynaptique. Enfin, ils sont impliqués dans une série de processus physiologiques, notamment la transmission synaptique, le développement neuronal, la plasticité, l'apprentissage et la mémoire. Ils contribuent également à la régulation de l'équilibre excitateur et inhibiteur des circuits neuronaux. En raison de leur implication dans divers troubles neurologiques et neuropsychiatriques, les mGluR sont devenus des cibles pour le développement de médicaments. La modulation de ces récepteurs peut potentiellement offrir des stratégies thérapeutiques pour des conditions telles que l'anxiété, la dépression et les maladies neurodégénératives (Bellone and Mameli, 2012; Kalivas, 2009; Niswender and Conn, 2010).

Il existe un grand nombre de iGluR. Parmi eux, on distingue pharmacologiquement trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate : les AMPAR, les NMDAR et les kaïnate (KAR), qui tirent chacun leur nom de leur agoniste sélectif synthétique (AMPA, NMDA) ou naturel (acide kaïnique) (Paoletti et al., 2013). Ils jouent collectivement un rôle crucial dans la médiation de la neurotransmission excitatrice rapide dans le SNC (Newcomer et al., 2000).

a. Les AMPAR

Les AMPAR sont les principaux récepteurs responsables de la médiation de la majeure partie de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le cerveau. Ils permettent l'afflux d'ions sodium (Na^+) et potassium (K^+) lors de leur activation, conduisant à une dépolarisation rapide du neurone postsynaptique. Ils sont constitués de différentes sous-unités, notamment GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. La composition en sous-unités des récepteurs peut influencer leurs propriétés, telles que la conductance et la cinétique. La majorité des AMPAR comportent des sous-unités GluA2 qui sont imperméables au calcium (Ca^{2+}). Ils sont largement distribués dans tout le cerveau et se trouvent dans les zones responsables du traitement sensoriel, du contrôle moteur et d'autres fonctions cognitives. Bien qu'ils soient essentiels à la transmission excitatrice rapide, ils sont également impliqués dans certaines formes de plasticité synaptique, telles que la potentialisation à court terme. Ils peuvent contribuer à la phase initiale de renforcement synaptique avant que les NMDAR ne jouent un rôle dans la LTP (Kalivas, 2009; Malinow and Malenka, 2002; Wolf, 2010).

b. Les récepteurs du kaïnate

Les KAR, comme les AMPAR, assurent la médiation de la neurotransmission excitatrice. Ils permettent l'afflux d'ions Na^+ et K^+ , conduisant à une dépolarisation du neurone postsynaptique. Cependant, les KAR sont moins bien compris que les AMPAR et NMDAR. Ils sont constitués de différentes sous-unités, notamment GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 et GluK5. Semblable aux AMPAR, la composition des sous-unités influence les propriétés du récepteur. En effet, certains isoformes sont perméables au Ca^{2+} . On les retrouve dans diverses régions du cerveau, souvent colocalisés avec les AMPAR et NMDAR. Ils sont impliqués dans des processus tels que la transmission synaptique, mais leurs rôles précis sont encore à l'étude (Köhler et al., 1993; Lerma, 2006).

Ces trois types de récepteurs du glutamate (AMPAR, KAR et NMDAR) contribuent collectivement à la neurotransmission excitatrice et à la plasticité synaptique. Ils travaillent souvent ensemble selon différentes combinaisons pour façonner la force et la plasticité des connexions synaptiques dans le cerveau. Le NMDAR, avec ses propriétés uniques telles que l'activation dépendante du voltage et son implication dans la LTP, est un acteur clé dans le réseau complexe de signalisation glutamatergique et de plasticité synaptique.

c. Les NMDAR

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux NMDAR. Ils sont exprimés de manière ubiquitaire dans le cerveau et jouent un rôle essentiel pour contrôler la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Les NMDAR sont des canaux calciques voltage-dépendants. Ils jouent des rôles différents en fonction de leur expression à la synapse (pro-survie, plasticité) ou en dehors des synapses (mort neuronale) (Vanhoutte and Bading, 2003). Ils sont principalement situés au niveau des synapses excitatrices du SNC, même si leur distribution, leur densité et leur fonction peuvent varier en fonction de la zone spécifique du cerveau et du stade de développement. Ainsi, on les retrouve dans le striatum, l'hippocampe (CA1 et CA3), le cortex, l'amygdale, le thalamus, mais également le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière.

Ces récepteurs possèdent une structure protéique complexe hétérotétramère car ils sont formés de quatre sous-unités. Historiquement, ces sous-unités étaient nommées NR mais la nomenclature

actuelle est GluN. Ainsi, on retrouve les sous-unités GluN1 (ou NR1), GluN2A (ou NR2A), GluN2B (ou NR2B), GluN2C (ou NR2C), GluN2D (ou NR2D) et GluN3 (ou NR3). Les NMDAR sont composés de deux sous-unités obligatoires GluN1 et de deux sous-unités GluN2 régulatrices (A, B, C ou D) ou GluN3 (Paoletti and Neyton, 2007). GluN1 et GluN3 contiennent le site de fixation du co-agoniste, la glycine ou la D-sérine, nécessaire à l'activation du récepteur (Bossi et al., 2023; Paoletti et al., 2013). L'activation de l'un ou l'autre site augmente la perméabilité au Ca^{2+} du canal NMDAR. En revanche, le site de fixation du glutamate est sur la sous-unité GluN2B (Paoletti et al., 2013; She et al., 2012). En outre, la composition des sous-unités des NMDAR peut influencer leurs propriétés et leurs rôles dans les différentes régions du cerveau.

Les NMDAR sont des canaux ioniques qui permettent aux ions Ca^{2+} , Na^+ et (K^+) de traverser la membrane cellulaire. L'activation du récepteur entraîne l'afflux de ces ions dans le neurone postsynaptique, ce qui peut déclencher diverses voies de signalisation intracellulaires. Leur activation nécessite plusieurs étapes successives : la fixation de glutamate libéré par le neurone présynaptique, qui entraîne la dépolarisation membranaire (autour de -40 mV) induisant le retrait du bouchon magnésium (Mg^{2+}), et permettant ainsi le passage des ions à travers le canal. Cette nécessité de dépolarisation est due à au fait que les NMDAR sont bloqués par un ion Mg^{2+} au potentiel de repos (Nowak et al., 1984; Paoletti et al., 2013).

La dérégulation de la fonction des NMDAR a été impliquée dans divers troubles neurologiques et neuropsychiatriques, notamment la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, la schizophrénie et la toxicomanie (Chen et al., 2021; Paoletti et al., 2013). Dans le contexte de la toxicomanie, ils sont impliqués dans le processus de plasticité synaptique qui sous-tend les changements induits par les drogues dans les circuits de récompense du cerveau. En effet, ils sont importants dans le déclenchement des événements moléculaires qui conduisent à la LTP, dont on pense qu'elle est à la base des processus d'apprentissage et de mémoire. Pendant la LTP, la force de la transmission synaptique entre les neurones impliqués est accrue, ce qui améliore la communication entre eux (Kalivas, 2009). Dans des modèles précliniques d'addiction, il a été montré que la LTP induite par l'afflux calcique à travers des NMDAR est impliquée dans la plasticité observée dans la VTA et le NAc en réponse à l'exposition à la cocaïne (Mao et al., 2009; Pascoli et al., 2012). De plus, il a été proposé que l'augmentation transitoire des NMDAR contenant GluN2B induite par la cocaïne dans les MSN du NAc est nécessaire pour la potentialisation ultérieure des AMPAR et les changements dans les comportements conditionnés par cette drogue (Joffe et al., 2018). En effet, la sous-unité GluN2B dans la NAc joue un rôle clé dans le remodelage des synapses excitatrices en réponse aux drogues (Mao et al., 2009). Les complexes NMDAR formés avec les sous-unités GluN1 et GluN2B ont, *in vitro*, des potentiels postsynaptiques excitateurs plus longs que ceux induits par l'activation des complexes GluN1-GluN2A NMDAR. Cela suggère qu'une expression accrue des sous-unités GluN2B et leur incorporation dans des complexes de récepteurs fonctionnels, *in vivo*, pourraient augmenter le délai nécessaire aux NMDAR pour détecter la coïncidence synaptique, améliorant ainsi l'efficacité synaptique et potentiellement la fonction de mémoire (Newcomer et al., 2000; Paoletti et al., 2013).

Les AMPAR et les KAR sont très rapidement activés par des concentrations élevées de glutamate et produisent des courants excitateurs rapides et transitoires qui permettent l'activation subséquente des NMDAR (Traynelis et al., 2010). De plus, les NMDAR ne présentent pas de désensibilisation rapide induite par le ligand et sont plus perméables au Ca^{2+} que les autres iGluR. Ils jouent donc un rôle central

dans l'activation de multiples cascades de signalisation intracellulaires dépendantes du Ca^{2+} , ainsi que dans le contrôle de l'expression de la transcription de nombreux gènes (Reiner and Levitz, 2018; Traynelis et al., 2010).

L'implication des NMDAR dans les adaptations comportementales observées dans des modèles précliniques d'addiction a été décrite depuis de nombreuses années. En effet, par des approches pharmacologiques, il a été constaté que les NMDAR jouaient un rôle dans le développement de l'activité locomotrice (Pulvirenti et al., 1991) et dans l'auto-administration induite par la cocaïne (Pulvirenti et al., 1992; Schenk et al., 1993). Il existe également plusieurs sources de données montrant que le blocage des NMDAR atténue la consolidation (Alagband and Marshall, 2013; Feltenstein et al., 2007) et la reconsolidation des souvenirs associés à la cocaïne chez les rongeurs (Brown et al., 2008; Milton et al., 2008; Smaga et al., 2021; Wouda et al., 2010).

Le ciblage des NMDAR a également été exploré en tant que stratégie thérapeutique potentielle pour divers troubles. En effet, plusieurs composés pharmacologiques interagissent avec les NMDAR, notamment dans la dépression. Par exemple, des antagonistes comme la kétamine et la phencyclidine (PCP) bloquent la fonction des NMDAR et peuvent induire des effets dissociatifs ainsi qu'une analgésie. Cependant, plusieurs de ces antagonistes NMDAR, comme le MK-801, ont des effets neurotoxiques ou des effets secondaires indésirables (Newcomer et al., 2000). Ces données soulignent la nécessité de trouver de nouvelles stratégies pour cibler les NMDAR sans provoquer d'effets secondaires et altérer les propriétés physiologiques fonctionnelles des récepteurs glutamatergiques.

3. Convergence des signaux DAergiques et glutamatergiques en réponse aux psychostimulants

Comme décrit précédemment, le rôle clé du striatum dans le contrôle de la motricité, la cognition et l'apprentissage guidé par la récompense dépend de sa capacité à intégrer les signaux DAergiques et glutamatergiques. De nombreuses études ont établi que les adaptations comportementales durables induites par les substances addictives sont intimement liées à la capacité des drogues de déclencher une libération artificielle de DA au sein du NAc qui va moduler certaines afférences glutamatergiques projetant sur les MSN (Salery et al. 2020).

Il existe un consensus sur le fait que la DA agit de manière différentielle sur les deux sous-populations de MSN puisqu'il est établi qu'une augmentation de DA induit une dépolarisation dans les D1R-MSN, tandis qu'elle hyperpolarise les D2R-MSN (Gerfen and Surmeier, 2011). En accord avec ce modèle, une étude utilisant l'imagerie Ca^{2+} par microsonde *in vivo* sur souris anesthésiées a montré qu'une injection aiguë de cocaïne produit une augmentation rapide du Ca^{2+} intracellulaire dans les D1R-MSN du striatum dorsal et une diminution progressivement des taux de Ca^{2+} dans D2R-MSN. Ces données reflètent ainsi l'effet opposé de la DA sur l'activité neuronale des deux sous-populations de MSN. À noter que cette modulation de l'activité des D1R-MSN et D2R-MSN par la DA requière la stimulation des D1R et D2R, respectivement (Luo et al., 2011). Cette intégration des signaux calciques induits par la cocaïne dans le striatum dorsal est permise par la formation de groupes (*clusters*) de neurones D1R-MSN et D2R-MSN qui encodent des informations pertinentes pour la locomotion, avec un effet différentiel sur le striatum dorsal en fonction du sous-type de MSN. En effet, la cocaïne augmente l'activité des clusters D1R-MSN dans le DLS et réduit l'activité des clusters D2R-MSN dans le DMS. Ces résultats suggèrent l'influence de la cocaïne sur l'organisation de ces clusters pour moduler les voies

directes et indirectes responsables de l'équilibre de la locomotion en réponse aux psychostimulants (Barbera et al., 2016).

Ces données ont été confirmées par une autre méthode d'imagerie Ca^{2+} basée sur la photométrie par fibre dans le NAc. Ces travaux ont montré qu'une injection unique de cocaïne stimule transitoirement l'activité calcique dans les D1R-MSN et la réduit dans les D2R-MSN chez des souris vigiles. Ces variations calciques sont abolies en présence d'agonistes spécifiques des D1R ou D2R. Cela suggère un profil d'activité neuronal biphasique au sein du NAc dans les D1R- et D2R-MSN (Calipari et al., 2016). De plus, les souris conditionnées à la cocaïne dans un paradigme de CPP présentent une augmentation transitoire de l'activité calcique des D1R-MSN dans le NAc le jour du test, avant l'entrée dans le compartiment associé à la drogue, alors que l'activité des D2R-MSN diminue dans ce compartiment (Calipari et al., 2016). Ces résultats montrent donc que la drogue elle-même, ou les indices environnementaux préalablement associés à la drogue, sont capables de moduler l'activité des D1R- et des D2R-MSN de façon similaire. D'un point de vue fonctionnel, cette étude montre également que l'inhibition chémogénétique des D1R-MSN au sein du NAc empêche l'extinction et facilite la rechute pendant une période de sevrage dans un paradigme de CPP.

Afin de comprendre comment le DA module la signalisation calcique dans les MSN et contribue au développement des réponses comportementales induites par la drogue, le groupe de R. Palmiter a initialement utilisé une lignée de souris dans laquelle les neurones exprimant le D1R expriment également une version de la sous-unité GluN1-NMDAR mutée au niveau du pore afin de réduire le flux Ca^{2+} . Cette approche a permis d'établir que l'inactivation des NMDAR dans les cellules exprimant le D1R inhibe la sensibilisation locomotrice et la CPP induite par la cocaïne (Heusner and Palmiter, 2005). L'inactivation de GluN1 dans les cellules positives pour le D1R bloque également l'acquisition de la CPP et la sensibilisation induites par l'amphétamine. La réexpression de la forme sauvage de GluN1, localement dans les D1R-MSN du NAc, suffit à restaurer les comportements de CPP. De manière surprenante, la délétion de GluN1-NMDAR à la fois dans les D1R- et D2R-MSN préserve la sensibilisation locomotrice induite par l'amphétamine (Beutler et al., 2011), ainsi que le développement et l'extinction de la CPP induite par la cocaïne. De plus, la délétion des NMDAR dans les D1R-MSN, mais pas les D2R-MSN, affaiblit la réinstauration de la CPP, ce qui est partiellement restauré par la délétion de NMDAR dans les deux sous-populations (Joffe et al., 2017). L'expression de la forme mutée de GluN1^{-/-} dans les D2R-MSN n'a pas d'effet sur le comportement. D'autre part, l'inhibition des NMDAR dans les D1R- et D2R-MSN n'affecte pas le comportement (Joffe et al., 2017). À l'inverse, 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). Ces données suggèrent l'importance d'un déséquilibre dans la signalisation NMDAR dans les D1R- et D2R-MSN au profit des D1R-MSN dans le développement des réponses aux psychostimulants. Ces observations soulèvent la question importante des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la DA module la signalisation dépendante des NMDAR en réponse aux substances addictives.

En aval des DAR et des NMDAR, toutes les substances addictives activent, de manière rapide et transitoire, la voie de signalisation ERK sélectivement dans les D1R-MSN du striatum (Valjent et al., 2000 ; Valjent et al., 2004 ; Bertran-Gonzalez et al., 2008). Un certain nombre d'études basées sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie ERK (SL327, U0126 et PD98059) ont permis

d'établir le rôle crucial de l'activation de ERK dans les adaptations moléculaires, cellulaires et comportementales induites par les substances addictives. En effet, l'inhibition de ERK bloque la LTP induite par la cocaïne au niveau des synapses glutamatergiques des D1R-MSN (Pascoli et al. 2012), ainsi que la sensibilisation locomotrice et la CPP induite par la cocaïne (Valjent et al., 2000). Les mêmes approches pharmacologiques ont mis en lumière le rôle clé de l'activation de ERK dans la reconsolidation de la mémoire contextuelle associée à la cocaïne dans le NAc (Miller and Marshall, 2005; Valjent et al., 2006). Il est important de noter que l'inhibition de ERK n'altère pas les réponses comportementales aiguës déclenchées par une injection unique de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2000 ; 2006b), mais seulement les adaptations durables induites par des administrations répétées de drogues. Le rôle de l'activation de ERK dans le striatum dans le développement des adaptations à long terme repose sur le fait qu'une fois activées localement dans le cytoplasme, les protéines ERK transloquent au noyau où elles contrôlent un vaste répertoire de réponses épigénétiques et génétiques qui sont nécessaires au maintien à long terme des adaptations neuronales induites par les drogues (Girault et al., 2007; Pascoli et al., 2014, 2011; Trifilieff et al., 2009).

De manière intéressante, l'activation de ERK en réponse aux psychostimulants agit comme un détecteur de coïncidence des signaux DAergique et glutamatergique dans le striatum puisqu'elle requiert la co-stimulation des D1R et NMDAR (Girault et al., 2007; Pascoli et al., 2011; Valjent et al., 2000).

L'équipe a montré que cette activation implique, indépendamment de la production d'AMPC, l'activation en aval du D1R de la protéine kinase non réceptrice Fyn qui va phosphoryler à son tour la Tyr1472 de la sous-unité GluN2B du NMDAR. L'activation de la voie D1R/Fyn/pTyr1472-NMDAR induite par la cocaïne permet la facilitation des flux calciques au travers des NMDAR qui déclenche l'activation de ERK dans les D1R-MSN par la cocaïne. Cette voie de signalisation reliant la stimulation D1R à la facilitation des fonctions NMDAR porteurs de la sous-unité GluN2B a un rôle fonctionnel puisque l'inhibition pharmacologique de l'activité de Fyn ou l'inhibition de la sous-unité GluN2B des NMDAR inhibe la sensibilisation locomotrice et la CPP induite par la cocaïne (Pascoli et al., 2011). L'équipe a également montré que cette facilitation des fonctions NMDAR par le D1R est responsable de l'activation de ERK qui contrôle la formation de nouvelles synapses glutamatergiques par les D1R-MSN en réponse à une injection unique de cocaïne (Dos Santos et al., 2017).

En aval du D1R (Figure 24), la voie AMPC-PKA contribue également à la facilitation des fonctions NMDAR au travers de la phosphorylation des résidus situés dans la partie C-terminale des sous-unités des NMDAR (Flores-Hernández et al., 2002). En effet, des études ont montré que la voie AMPC/PKA recrutée en aval de la stimulation D1R participe à la potentialisation des NMDAR composés de la sous-unité GluN2B (Flores-Hernández et al., 2002; Wittmann et al., 2005). Il a également été décrit que la PKA est capable de phosphoryler la sous-unité GluN1 des NMDAR au niveau de la sérine 897 (Ser897) (Tingley et al., 1997) en réponse à la DA, contrôlant ainsi le trafic des NMDAR à la membrane. Même si la PKA ne cible pas directement les protéines ERK, la voie AMPC/PKA peut amplifier l'activation de ERK dans le striatum en réponse aux psychostimulants. Dans ce contexte, l'activation de ERK se produit par un mécanisme dépendant de la PKA qui phosphoryle la phosphoprotéine de Mr 32 kDa régulée par la DA et l'AMPC (DARPP-32). À son tour, DARPP-32 lève l'inhibition exercée par la phosphatase 1 (PP1) sur MEK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) qui est la kinase en amont de ERK (Girault et al., 2007; Valjent et al., 2005, 2000). Il a été démontré que l'activité de DARPP-32 est augmentée dans les

D1R-MSN et réduite dans les D2R-MSN en réponse à la cocaïne (Bateup et al., 2008). Par ailleurs, la suppression de DARPP-32 dans les D1R-MSN diminue l'activité locomotrice basale induite par la cocaïne, tandis qu'elle est augmentée lors de l'invalidation de DARPP32 dans les D2R-MSN (Bateup et al., 2010). Cela suggère l'importance de la voie D1R-PKA-DARPP32 dans les réponses comportementales induites par les psychostimulants. Ce qui est confirmé par l'absence de sensibilisation locomotrice chez les souris KO DARPP-32 traitées à la cocaïne (Valjent et al., 2005). D'autre part, la PKA agit directement sur la tyrosine phosphatase enrichie du striatum (STEP) pour lever l'inhibition que STEP exerce sur ERK (Girault et al., 2007; Pulido, 1998; Valjent et al., 2005, 2000). La PKA agit également sur le capteur d'AMPC neuritogène (NCS) codé par le gène Rapgef2 (NCS-Rapgef2), dont l'invalidation bloque l'activation de ERK induite par la cocaïne dans le NAc (Fasano et al., 2009; Jiang et al., 2017). Ces études soulèvent l'importance du rôle de Fyn, DARPP-32 et STEP dans l'activation de la voie ERK et révèlent leurs rôles primordial dans la convergence des voies de signalisations DAergiques et glutamatergiques, et les réponses induites par les drogues addictives (Girault et al., 2007).

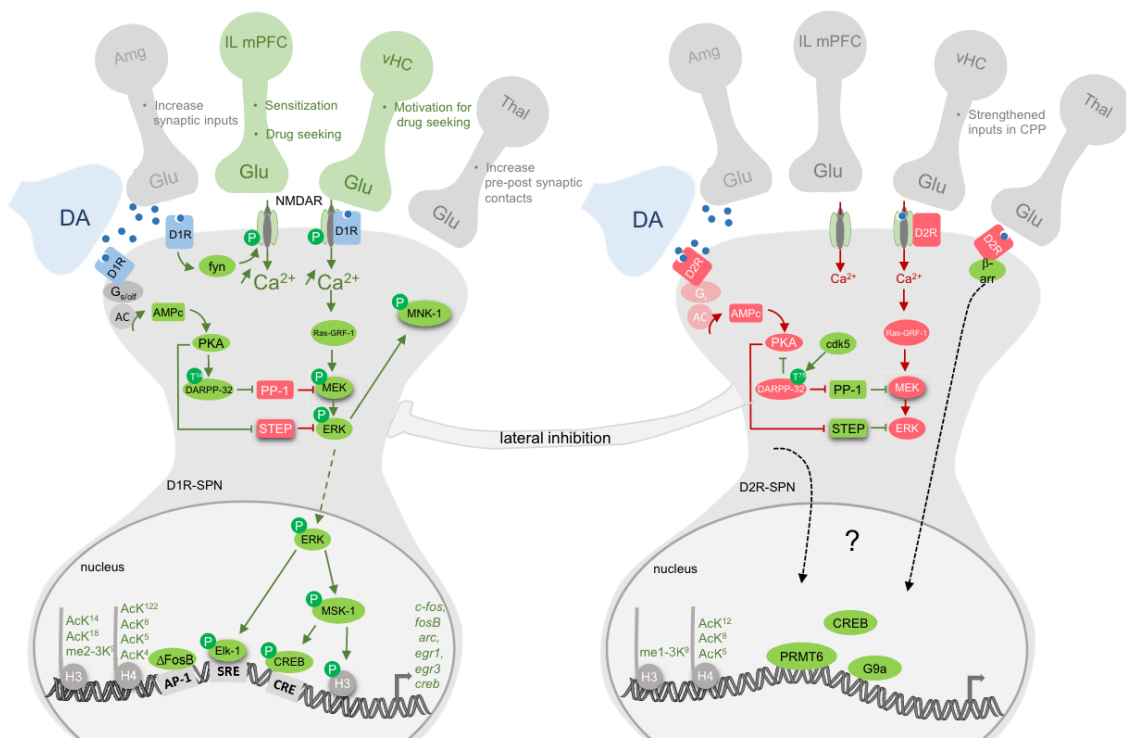


Figure 24 | Illustration des évènements cellulaires et moléculaires recrutés de la membrane plasmique au noyau dans les neurones D1R- et D2R-MSN, en réponse aux psychostimulants.

Description des principales voies de signalisation striatales et les réponses épigénétiques et géniques induites par les psychostimulants dans les D1R-MSN à gauche et les D2R-MSN à droite. Les flèches et les lignes vertes et rouges représentent les mécanismes qui sont activés et inhibés, respectivement, lors de la libération de DA induite par les psychostimulants. Les afférences glutamatergiques touchant chaque type de cellule sont représentées en haut de chaque sous-type de MSN. Les afférences vertes représentent celles pour lesquelles une modulation de la transmission du glutamate induite par les psychostimulants a été causalement liée à des composantes distinctes des réponses comportementales. Les afférences grises représentent celles pour lesquelles les modifications de la transmission du glutamate induites par les psychostimulants ont été corrélées aux réponses comportementales ou n'ont pas été modifiées. D'après Sallery et al., 2020.

Cependant, même si ERK intègre les signaux DAergique et glutamatergique, et que son blocage restaure de nombreuses adaptations induites par les drogues, ce n'est pas une alternative

thérapeutique. En effet, ERK est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques, y compris positives comme l'apprentissage lié à la mémoire, la différenciation neuronale etc. Il est donc primordial de trouver un mécanisme d'activation de ERK qui soit spécifique des drogues liant la DA, le glutamate et la voie de signalisation ERK, tel que les hétéromères.

En ce qui concerne l'intégration des signaux D2R-NMDAR, il existe un consensus par lequel la stimulation des D2R produit un effet inhibiteur sur les fonctions des NMDAR (Kotecha et al., 2002; Li et al., 2009; Liu et al., 2006). Il a été montré qu'une exposition aiguë à la cocaïne, qui stimule les D2R, diminue lentement les niveaux de Ca^{2+} dans les D2R-MSN (Luo et al., 2011). La stimulation du D2R induirait ainsi une diminution des courants NMDAR au sein du striatum (Liu et al., 2006) et du PFC (Li et al., 2009). L'effet inhibiteur dans le PFC 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 diminuant ainsi l'expression des NMDAR contenant GluN2B à la surface membranaire (Li et al., 2009). Grâce à des techniques d'imagerie calcique sur animal vigile, il a été montré que le Ca^{2+} diminue dans les D2R-MSN du NAc dans le paradigme de CPP lorsque l'animal reste dans le compartiment préalablement associé à la cocaïne (Calipari et al., 2016).

Les hétéromères (ou oligomères) sont des complexes de protéines constitués d'au moins deux protéines différentes, par opposition aux homomères qui impliquent l'interaction de protéines identiques. Sur le plan fonctionnel, la formation de ces hétéromères permet une modulation fine, dynamique, réciproque et spatio-temporelle de chacun des récepteurs impliqués (Cepeda and Levine, 2006; Fiorentini et al., 2008; Ladepeche et al., 2013; Nai et al., 2010; Pei et al., 2004; Wang et al., 2012). Les propriétés fonctionnelles de ces complexes de récepteurs sont distinctes de celles des récepteurs qui les composent. Elles en font donc des cibles privilégiées pour le développement de stratégie thérapeutique plus spécifique dans le domaine des maladies neurologiques et psychiatriques. Le ciblage de ces complexes présenterait potentiellement moins d'effets secondaires que leur inhibition pharmacologique puisqu'ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques (Borrito-Escuela et al., 2017a, 2017b; Ferré, 2018; Fuxe et al., 2014; Missale et al., 2006; Rodríguez-Ruiz et al., 2017; Wang et al., 2012).

Il a été démontré que les DAR ont la capacité de former des oligomères avec plusieurs récepteurs partenaires, majoritairement décrits dans des systèmes hétérologues (Andrianarivelo et al., 2019). Historiquement ce sont les hétéromères formés entre les DAR D2R et les récepteurs A2AR de l'adénosine qui ont été décrits en premier et les plus étudiés, notamment en termes de structure, sites d'interactions et mécanisme de formation (Borrito-Escuela et al., 2017a; Ferré, 2018; Trifilieff et al., 2011). Une étude a montré indirectement le rôle des hétéromères D2R-A2AR dans les réponses induites à la cocaïne. Cette étude a utilisé un peptide qui perturbe l'interaction entre ces deux récepteurs et qui empêche la diminution d'auto-administration de cocaïne induite par un agoniste A2AR (Borrito-Escuela et al., 2018a, 2018b).

Dans un souci de concision et de clarté, parmi les types d'hétéromères étudiés dans la littérature, nous allons nous intéresser dans cette partie aux hétéromères formés entre les DAR et les NMDAR, qui ont fait l'objet de mes travaux de thèse.

IV. Rôle des hétéromères DAR-NMDAR en réponses aux psychostimulants

Les hétéromères formés entre DAR et NMDAR ont fait l'objet de recherches intenses car ils sont considérés comme des acteurs potentiels de l'intégration des signaux DAergique et glutamatergique convergeants sur les neurones du striatum (Andrianarivelo et al., 2019; Cepeda and Levine, 2006). La convergence des projections DAergique et glutamatergique sur les MSN, ainsi que les interactions délétères entre les voies de signalisation dépendantes de la DA et du glutamate induites par les substances addictives, font de ces hétéromères DAR-NMDAR des cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, la majorité des études concernant ces hétéromères furent menées *in vitro*. Récemment, les travaux de l'équipe auxquels j'ai contribué ont montré que ces hétéromères peuvent être modulés *in vivo* en réponse aux psychostimulants et qu'ils contrôlent les adaptations à long terme induites par cette classe de substances addictives (Andrianarivelo et al., 2021).

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la manière dont les D1R ou D2R interagissent avec les NMDAR pour former des hétéromères, aux mécanismes impliqués dans leur interaction, aux conséquences sur les fonctions des récepteurs partenaires, et enfin nous décrirons leurs rôles dans les adaptations induites par la cocaïne *in vivo*.

1. D1R-NMDAR

Des études pionnières ont révélé l'interaction directe entre les récepteurs D1R et NMDAR. L'équipe de Fang Liu a mis en évidence, par des approches biochimiques, l'interaction physique et directe entre NMDAR et D1R dans des tissus hippocampiques de rat. En utilisant des protéines de fusion glutathione-S-transférase (GST) codant pour une séquence de la queue carboxyle de D1R (GST-D1R_{CTD}) et différentes partie C-terminales (CTD) des sous-unités des NMDAR (GST-GluN1_{CTD}, GST-GluN2A_{CTD}, GST-GluN2B_{CTD}), ils ont montré que la partie carboxyle terminale du D1R interagit avec les sous-unités GluN1 et GluN2A de NMDAR. En outre, l'équipe montre que le fragment t2 du D1R (D1R-t2 (L387-L416)) interagit *in vitro* avec le domaine C-terminal (CTD) de GluN1, tandis que le domaine t3 du D1R (D1R-t3 (S417-T446)) se lie au CTD de la sous-unité GluN2A du NMDAR. Ces interactions D1R-GluN1 et D1R-GluN2A sont capables d'influencer les fonctions essentielles du NMDAR. En effet, dans un modèle de cellules HEK293 coexprimant les deux récepteurs, l'activation de D1R par un agoniste dissocie l'interaction du D1R avec GluN1, réduisant l'excitotoxicité déclenchée par une forte dose de NMDA en permettant à GluN1 de recruter la calmoduline (CaM) et activer la voie PI-3 kinase qui promeut la survie neuronale. D'autre part, l'activation du D1R permet l'interaction entre D1R-t3 et GluN2A, qui est responsable de la réduction de l'expression membranaire des NMDAR, provoquant une inhibition des courants calciques NMDAR (Figure 25) (Lee et al., 2002).

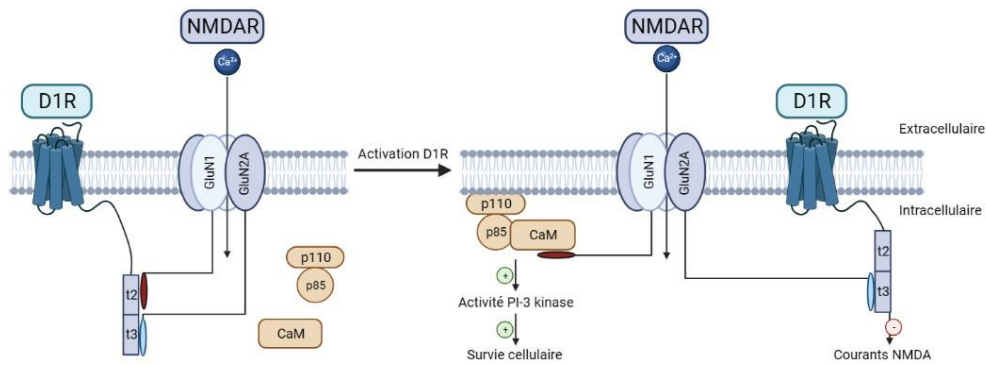


Figure 25 | Représentation schématique des interactions directes entre NMDAR et D1R.

À gauche, l'interaction D1R-NMDAR avant la stimulation de D1R. À droite, le mécanisme d'interaction de D1R-NMDAR après stimulation de D1R. L'activation de D1R par un agoniste provoque une dissociation de la région D1R-t2 et du domaine CTD de GluN1-NMDAR, permettant le recrutement de CaM et de la kinase PI-3 (p110 et p85), responsable de la survie cellulaire. De plus, l'activation de D1R inhibe les courants NMDAR à travers l'interaction entre D1R-t3 et GluN2A-NMDAR, réduisant l'expression membranaire. D'après Lee et al., 2002. Schéma réalisé sur Biorender.

L'interaction de D1R avec GluN1 a été la plus étudiée. Une étude par spectrométrie de masse a montré qu'elle implique des interactions électrostatiques entre D1R-t2 et la cassette C1 de GluN1 (GluN1C1 (ici E834-S938)) (Woods et al., 2005). Il s'avère que les séquences d'acides aminés du D1R et de la sous unité GluN1 des NMDAR impliquées dans cette interaction électrostatique sont conservées d'une espèce à une autre au cours de l'évolution, suggérant l'importance de ces hétéromères D1R-NMDAR dans des fonctions physiologiques essentielles (Woods et al., 2005). Les études de la modulation de l'interaction D1R avec GluN1 par des agonistes ou antagonistes est controversée. En effet, selon les études, ils provoquent soit une diminution de l'hétéromérisation dans des cultures de neurones hippocampiques (Lee et al., 2002), soit n'ont pas effet sur l'interaction entre les deux récepteurs dans des lignées cellulaires surexprimant D1R et NMDAR (Fiorentini et al., 2003). Des travaux antérieurs de mon équipe d'accueil ont montré l'interaction entre les D1R et les NMDAR endogènes sur des cultures primaires de neurones striataux. Ils ont également étudié la modulation de l'hétéromérisation D1R-NMDAR par des agonistes des deux récepteurs partenaires. Une co-stimulation de ces récepteurs a été réalisée avec un agoniste D1R, le SKF38393, et une faible dose de glutamate. Ce modèle de co-stimulation permet de mimer *in vitro* les principaux effets moléculaires et cellulaires provoqués par une injection aiguë de cocaïne *in vivo* tels qu'une facilitation des influx calciques au travers des NMDAR induite par la stimulation du D1R qui déclenche l'activation de la cascade de signalisation de la voie ERK (Pascoli et al., 2011). Dans ce modèle, il a été montré que ce paradigme de co-stimulation favorise l'hétéromérisation du D1R avec la sous-unité GluN1 des NMDAR (Figure 26) (Cahill et al., 2014; Pascoli et al., 2011).

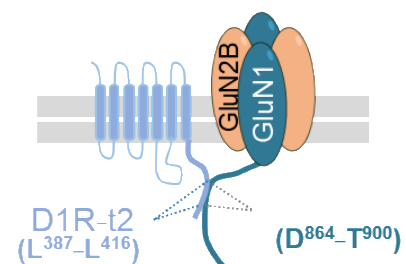


Figure 26 | Schéma représentatif de l'interaction physique directe, ou hétéromérisation, entre D1R et GluN1 NMDAR.

Ces hétéromères ont ensuite été mis en évidence à la fois au niveau des synapses, dans des fractions enrichies en densités postsynaptiques (PSD) (Fiorentini et al., 2003), mais également dans les compartiments péri-synaptiques (Ladepêche et al., 2013). Bien que ces hétéromères soient détectables dans, ou à proximité des synapses, Zhang et ses collaborateurs ont démontré que GluN1 et la protéine d'échafaudage synaptique PSD-95 se lient au CTD de D1R par des sites d'interaction qui se chevauchent au niveau du domaine D1R-t2 (Zhang et al., 2009). Par un mécanisme de compétition, PSD-95 est donc un facteur limitant de l'hétéromérisation D1R-GluN1 au niveau des synapses, bien que ces complexes de récepteurs soient détectés dans les fractions PSD striatales (Fiorentini et al., 2003).

Par la suite, les hétéromères D1R-NMDAR endogènes ont été détectés *in vitro* dans des cultures primaires de neurone striataux (Emma Cahill et al., 2014), puis *in vivo* (Andrianarivelo et al., 2021) grâce à la technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA) (Trifilieff et al., 2011) permettant la mise en évidence de la proximité protéine-protéine *in situ* sur des coupes de cerveaux fixées (Andrianarivelo et al., 2021 en Annexe I). Récemment, grâce à la technique de PLA, ces hétéromères ont également été détectés dans des échantillons humains post-mortem de caudé-putamen (Andrianarivelo et al., 2021), renforçant ainsi le potentiel translationnel et thérapeutique que pourrait offrir le ciblage de ces complexes.

Bien que le mécanisme de formation des hétéromères D1R-GluN1 ne soit pas encore connu, il reste pourtant bien étudié, d'où l'émergence d'un certain nombre d'hypothèses. Tout d'abord, il a été proposé qu'un changement conformationnel des NMDAR synaptiques, induit lors de sa stimulation par un agoniste, pourrait piéger les D1R situés à proximité des NMDAR. Cela réduirait leur diffusion latérale (Figure 27) en augmentant le nombre de D1R à la synapse grâce à la formation d'hétéromères D1R-NMDAR. Ce modèle est appelé « système de piège par diffusion » et a été proposé par Scott et al. (Cepeda and Levine, 2006; Scott et al., 2006). Ces données confortent l'hypothèse que les complexes D1R-NMDAR se forme à l'intérieur des synapses ou à proximité immédiate de celles-ci.

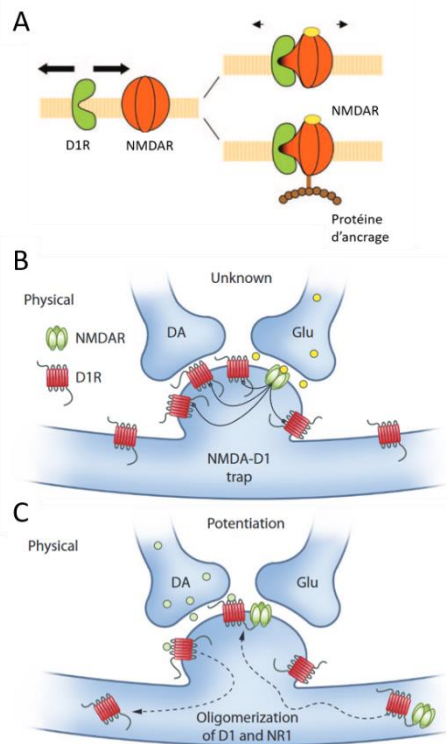


Figure 27 | Schéma de la diffusion latérale de D1R médiée par NMDAR conduisant à une interaction directe fonctionnelle et réciproque.

(A) D1R diffuse de manière aléatoire dans la membrane plasmique et peut interagir physiquement avec les NMDAR, qui ont subi un changement allostérique, en raison de l'occupation par le ligand du site de liaison du glutamate NMDA (Scott et al., 2006). (B) L'activation des NMDAR piège les D1R par diffusion des D1R vers les NMDAR. (C) L'oligomérisation des D1R avec la sous-unité GluN1 NMDAR au niveau de la synapse empêche l'internalisation des récepteurs normalement produite par l'activation des D1R (Cepeda and Levine, 2006). Les oligomères D1R-GluN1 sont acheminés vers la synapse depuis le réticulum endoplasmique et pourraient potentialiser la fonction du récepteur NMDA (Fiorentini et al., 2003).

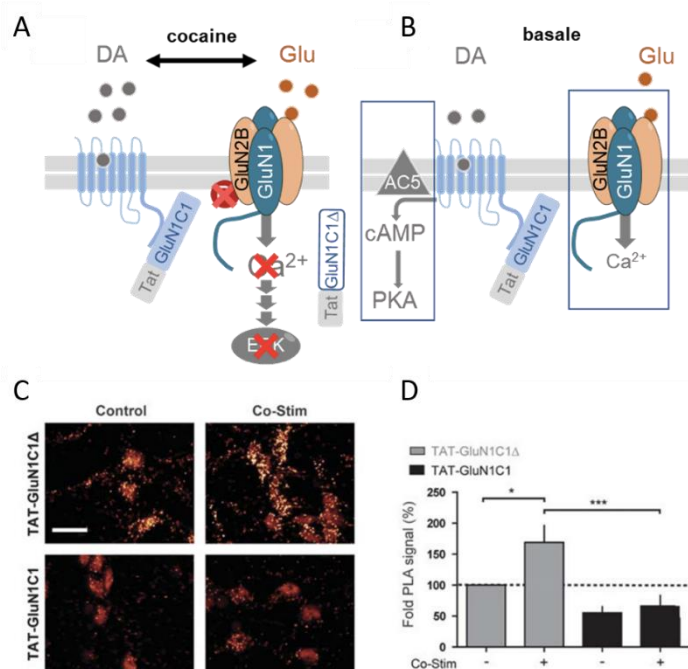
D'autres mécanismes d'oligomérisation des D1R-NMDAR ont également été proposés. Le premier repose sur un processus où l'oligomérisation pourrait avoir lieu dès le réticulum endoplasmique (RE), puis les complexes D1R-NMDAR seraient ensuite transportés vers la synapse (Figure 26) (Fiorentini et al., 2003). En effet, la sous-unité GluN1 de NMDAR est incapable de sortir du RE et d'atteindre la surface à moins d'être liée à des sous-unités GluN2B, qui permettent le recrutement à la membrane plasmique (Fiorentini et al., 2003). Récemment, il a été suggéré que l'épitope riche en arginine (R) ($_{890}\text{SFKRRRSSK}_{898}$) de GluN1C1, qui lie le D1R, soit un signal de rétention dans le RE (Scott et al., 2001). Ainsi, l'interaction de D1R avec la cassette C1 de GluN1 faciliterait l'expression à la surface membranaire des sous-unités GluN1 liées aux sous-unités GluN2B en masquant le signal de rétention RE et en agissant comme une molécule chaperonne qui permettrait l'insertion à la surface des complexes D1R-GluN1, dans des lignées cellulaires co-exprimant les deux protéines (Fiorentini et al., 2003).

Enfin, il a également été proposé que les interactions D1R-GluN1 soient régulées par des modifications post-traductionnelles. Il a en effet été montré par spectrométrie de masse que la phosphorylation de la Ser397 de D1R dans le domaine t2, possiblement ciblées par la kinase caséine 1 (CK1), augmente l'interaction des peptides D1R-t2 et GluN1C1 (Woods et al., 2005). En accord avec ces résultats, il a été montré par la suite que la mutation de la Ser387 en alanine non-phosphorylable, diminue fortement l'interaction de D1R-GluN1 dans des extraits de striatum de rat (Scott et al., 2006).

Les mécanismes de formation des hétéromères D1R-NMDAR décrits ci-dessus (Cepeda and Levine, 2006) suggèrent un rôle important de chacun des récepteurs impliqués dans cette interaction et nous allons voir maintenant que cette interaction permet au D1R et au NMDAR de réguler leurs fonctions de manière réciproques.

D'après Fiorentini et collaborateurs, cette hétéromérisation D1R-NMDAR aux niveaux des synapses striatales serait importante pour assurer la proximité des deux récepteurs partenaires au sein des synapses. La stimulation de D1R pourrait par exemple faciliter les fonctions des NMDAR synaptiques via le recrutement des voies PKA/PKC qui ciblent des résidus des domaines CTD des sous-unités NMDAR. Ainsi, les fonctions des NMDAR seraient facilitées par la DA sélectivement au niveau de synapses contenant des hétéromères D1R-NMDAR (Fiorentini et al., 2003). D'autres données montrent que l'activation de D1R augmente les courants NMDAR via la voie AMPc-PKA-DARPP32 dans les MSN (Flores-Hernández et al., 2002), ou encore via l'activation de Fyn en aval du D1R (Pascoli et al., 2011; Wittmann et al., 2005). En accord avec l'hypothèse de Fiorentini et collaborateurs concernant le rôle de l'hétéromérisation D1R-NMDAR dans la modulation des fonctions NMDAR par la DA, l'équipe a montré, sur des cultures de neurones striataux, qu'un peptide pénétrant (couplé à la protéine TAT du VIH) correspondant à la cassette C1 de GluN1 (TAT-GluN1C1) qui lie le D1R-t2, inhibe l'association D1R-NMDAR, et réduit également la phosphorylation de GluN2B (pGluN2B) sur Tyr1472 induite par la stimulation du D1R (Figure 28 A-C-D). À l'inverse, le peptide TAT contrôle (TAT-GluN1-C1Δ) exprime une version déletée de la cassette C1 de GluN1 dont les 9 acides aminés correspondant au motif riche en arginine de GluN1C1 essentiels à l'interaction électrostatique avec D1R-t2 (Woods et al., 2005), ont été tronqués (₈₉₀SFKRRR₈₉₈). Ce peptide contrôle n'a aucun effet sur l'interaction D1R-GluN1 ou sur la facilitation des NMDAR par un agoniste D1R (Figure 28 B-C-D).

Cette étude montre donc que l'inhibition de l'interaction D1R-NMDAR bloque l'activation de la voie D1R-Fyn-pGluN2B et empêche la facilitation des flux calciques NMDAR induite par un agoniste D1R (Cahill et al. 2014). Il est important de noter que le peptide TAT-GluN1C1, interférant avec l'interaction entre D1R et la sous-unité GluN1 du NMDAR, n'a altéré ni la survie neuronale, ni les fonctions individuelles de chaque récepteur indépendamment de leur hétéromérisation (production d'AMPC via D1R, flux calciques NMDAR) (Figure 28 B) (Cahill et al. 2014).



Pour étudier le rôle fonctionnel des hétéromères D1R-NMDAR *ex vivo* dans la modulation de la transmission synaptique, des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches cortico-striatales ont été effectués, en collaboration avec l'équipe de C. Lüscher, sur des souris *drd1-egfp* permettant d'identifier les D1R-MSN. Ces enregistrements révèlent que l'hétéromérisation D1R-GluN1 est nécessaire à la potentialisation des courants post-synaptiques dépendants des NMDAR contenant la sous-unité GluN2B (**Figure 29**), ainsi qu'à la LTP dans les D1R-MSN.

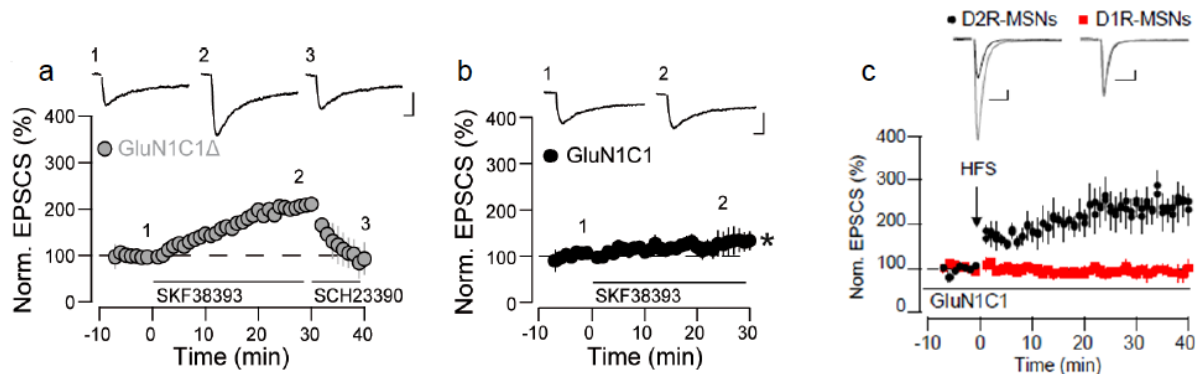


Figure 29 | Rôle des hétéromères D1R-NMDAR dans la plasticité synaptique.

(a) La stimulation du D1R induit une potentialisation des courants NMDAR en présence du peptide contrôle GluN1C1 Δ . (b) Le peptide GluN1C1 bloque la potentialisation des courants NMDAR induite par la stimulation des D1R, (c) ainsi que l'induction de la LTP par une stimulation à haute fréquence (HFS) des D1R-MSN, mais pas les D2R-MSN. D'après Cahill et al., 2014.

En effet, dans ce modèle, le peptide TAT-GluN1C1 qui perturbe l'interaction D1R-NMDAR, bloque la facilitation des courants post-synaptiques excitateurs NMDAR induits par la stimulation des D1R avec le SKF38393 alors que le peptide contrôle, TAT-GluN1-C1 Δ , n'a aucun effet (**Figure 29 a, b**) (Cahill et al., 2014). De manière intéressante, cette facilitation des courants NMDAR par la DA contrôlée par l'hétéromérisation D1R-NMDAR dans les D1R-MSN concerne spécifiquement les NMDAR contenant la sous-unité GluN2B (Cahill et al., 2014). En accord avec les résultats de l'équipe, l'effet facilitateur de D1R sur la LTP dépendante des NMDAR a également été révélé sur des neurones hippocampiques de rat en culture et requiert l'interaction D1R-NMDAR (Nai et al., 2010).

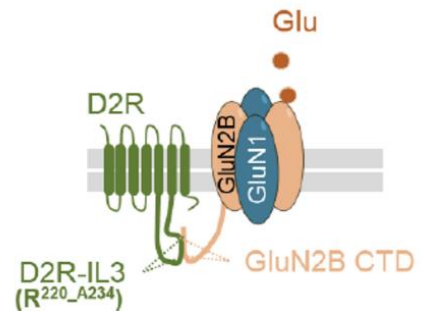
L'ensemble de ces travaux montre que l'interaction entre le D1R-t2 et la cassette C1 de GluN1 est impliquée dans la facilitation des fonctions du NMDAR induite par la DA. Il est important de noter que cette modulation des récepteurs partenaires par le biais de leur hétéromérisation apparaît être réciproque. Plusieurs études révèlent en effet que les NMDAR régulent également l'activité D1R via leur interaction physique et directe. D'une part, l'interaction de D1R avec GluN1 est responsable de l'expression accrue de D1R au niveau des épines dendritiques de neurones striataux incubés avec un agoniste des NMDAR (Scott et al., 2006). D'autre part, cette interaction est responsable d'une augmentation de la production d'AMPC en aval du D1R qui serait liée à la capacité de l'interaction D1R-GluN1 à diminuer l'endocytose du D1R induite par un agoniste (Pei et al., 2004).

2. D2R-NMDAR

Outre l'hétéromérisation D1R-NMDAR, un autre mécanisme illustrant l'interaction dopamine-glutamate a été étudié et montre la formation d'hétéromères D2R-GluN2B NMDAR. En effet, la réalisation de fractions riches en PSD, d'overlay assay ainsi que de co-immunoprécipitations (co-IP) ont permis de détecter *in vivo* dans le striatum, l'hippocampe et le PFC chez le rat, une association

constitutive directe entre D2R et la sous-unité GluN2B des NMDAR (Liu et al., 2006). Après avoir testé plusieurs domaines d'interactions possibles, ils ont identifié une interaction directe passant par un fragment de la **troisième boucle intracellulaire de D2R (D2R-IL3)**, au niveau des résidus R220-A234, qui se lie à la queue carboxyle de GluN2B (GluN2B CTD) (**Figure 30**) (Liu et al., 2006).

Figure 30 | Schéma représentatif de l'interaction physique directe, ou hétéromérisation, entre D2R et GluN2B NMDAR.



Dans cette étude, les auteurs ont également montré par co-IP qu'une forte et unique dose de cocaïne à 30 mg/kg induisait une augmentation des niveaux d'hétéromères D2R-NMDAR dans le NAc et le striatum dorsal (Liu et al., 2006). Cette interaction a également été confirmée par mon équipe grâce à la technique de PLA *in situ* sur des tranches de cerveaux de souris et également en post-mortem à partir de caudé-putamen humains (Andrianarivelo et al., 2021).

Comme pour la perturbation des complexes D1R-NMDAR, l'équipe de Fang Liu a synthétisé un peptide TAT-D2R-IL3-P5 (correspondant aux résidus R220-A234) capable de bloquer l'interaction directe entre D2R et NMDAR. Ils ont en parallèle synthétisé le peptide contrôle TAT-D2R-IL3-P6 qui représente une séquence mélangée aléatoirement n'interférant pas dans cette interaction (**Figure 31**). Les peptides purifiés P1, P2, P3 et P5 présents sur la **figure 31**, sont tous capables de bloquer la liaison D2R-NMDAR car ils contiennent le motif de liaison composé de 10 résidus essentiels (TKRSSRAFRA) à l'interaction D2R-GluN2B (Liu et al., 2006). Cependant, le motif de liaison identifié au sein du domaine D2R-IL3 est une région de 32 acides aminés étroitement conservée au sein de différentes espèces, qui a la particularité d'être adjacente à un domaine de liaison à la CaM (I210-V223) (Bofill-Cardona et al., 2000). Ils ont ainsi fait le choix d'utiliser le motif de liaison du peptide P5 pour bloquer efficacement l'interaction D2R-NMDAR (R220-A234) (Liu et al., 2006). Cependant, le peptide D2R-IL3 utilisé dans cette étude chevauche également une partie de la séquence du D2R qui interagit avec A2AR (Ciruela et al., 2004), responsable de la formation d'hétéromères D2R-A2AR dans le NAc suite à des expositions répétées à la cocaïne (Borroto-Escuela et al., 2017a).

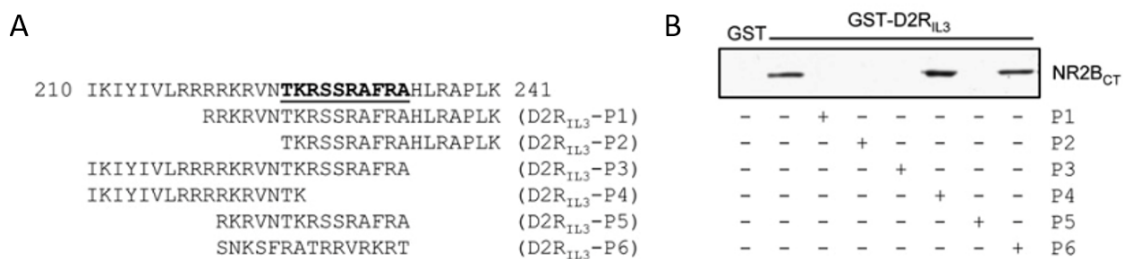


Figure 31 | Identification de la région spécifique de D2R interagissant avec GluN2B *in vitro*.

(A) Représentation de la séquence primaire des 32 premiers acides aminés de D2R_{IL3} et des différents peptides purifiés (P1 à P6) contenant un motif de 10 résidus (TKRSSRAFRA) capables de bloquer la liaison D2R_{IL3} et NR2B_{CT} (= GluN2B). Les lettres soulignées et en gras indiquent le motif de liaison NR2B_{CT} potentiel. (B) Précipitation par GST dans des cultures de neurones striataux montrant le blocage de la liaison NR2B_{CT}-D2R_{IL3} lors de l'ajout de peptides D2R_{IL3} P1, P2, P3 et P5, mais pas P4 et P6, où l'interaction est préservée.

Les auteurs ont ainsi pu montrer que la perturbation de l'interaction D2R-GluN2B réalisée à l'aide du peptide interférant TAT-D2R-IL3-P5, injecté 90 min en intraveineux en amont de l'injection de cocaïne, bloque l'augmentation des niveaux d'hétéromérisation D2R-NMDAR, la réduction de l'interaction entre la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII)-GluN2B et de pGluN2B Ser1303, empêchant ainsi l'inhibition des fonctions NMDAR induite par la stimulation du D2R en réponse à la cocaïne (**Figure 32**) (Liu et al., 2006). Ces résultats montrent donc que l'interaction D2R-NMDAR est nécessaire à l'inhibition des NMDAR induite par la DA dans les D2R-MSN.

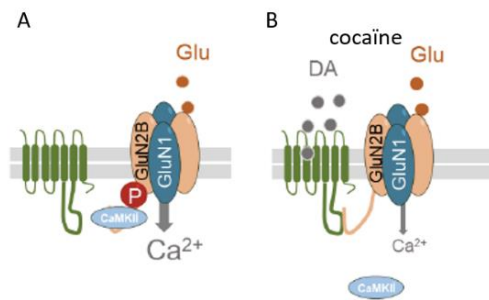


Figure 32 | Schéma représentatif du mécanisme de formation des hétéromères D2R-NMDAR.

(A) Condition basale montrant la liaison entre CaMKII avec la sous-unité GluN2B. (B) Une exposition aiguë à la cocaïne favorise l'hétéromérisation D2R-GluN2B dans le striatum et perturbe la liaison de CaMKII à GluN2B, diminue la phosphorylation de GluN2B sur la Ser1303 et inhibe ainsi les fonctions des NMDAR dans les D2R-MSN. D'après Liu et al., 2006.

Comme décrits précédemment, l'hypothèse prédominante est que les substances addictives entraînent un déséquilibre entre l'activité des D1R- et D2R-MSN du NAc au profit des D1R-MSN qui joueraient un rôle important dans la mise en place des comportements addictifs. La co-stimulation *in vitro* des récepteurs D1R et NMDAR induit la formation d'hétéromères D1R-NMDAR qui participent à la facilitation des fonctions NMDAR par la DA dans les D1R-MSN (Cahill et al., 2014). À l'inverse, l'hétéromérisation D2R-NMDAR permet l'inhibition des NMDAR induite par la DA dans les D2R-MSN (Liu et al., 2006). Suite à ces résultats, l'équipe a fait le postulat que les hétéromères DAR-NMDAR pourraient participer aux déséquilibres des activités D1R- et D2R-MSN *in vivo* et ainsi contrôler certaines des adaptations à long terme induites par la cocaïne.

3. Modulations et fonctions des hétéromères DAR-NMDAR dans les réponses aux psychostimulants

Pour répondre à cette question, Andrianarivelo et collaborateurs ont utilisé le paradigme de la sensibilisation locomotrice induite par des injections répétées de cocaïne chez la souris pour étudier la modulation de ces hétéromères *in vivo* dans le cas des psychostimulants, grâce à la PLA. Dans cette étude, à laquelle j'ai participé activement, nous avons observé que la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne est associée à une hétéromérisation accrue des D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans le NAc (**Figure 33 A**) (Andrianarivelo et al., 2021, en **Annexe I**).

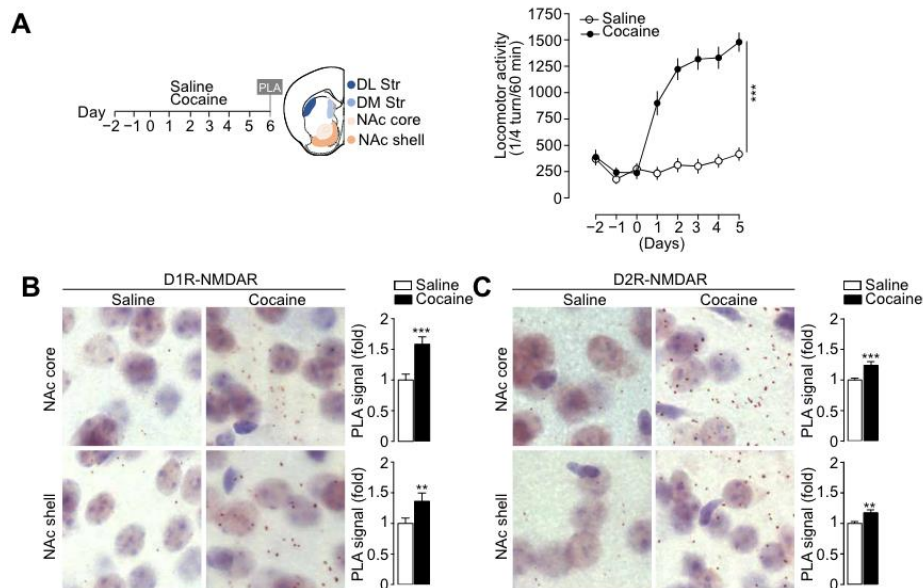


Figure 33 | La sensibilisation locomotrice induite par l'administration chronique de cocaïne module l'hétéromérisation D1R- et D2R-NMDAR.

(A) Sensibilisation locomotrice induite par des injections répétées de cocaïne pendant 5 jours (jour 1 à 5) à 15 mg/kg. Au fil des jours, une augmentation de la locomotion a été observée chez les souris injectées avec de la cocaïne par rapport aux souris témoins ayant reçu une solution saline. La sensibilisation locomotrice est associée à une augmentation des hétéromères D1R-NMDAR (B) et D2R-NMDAR (C) dans le core et le shell du NAc, observées par PLA (Andrianarivelo et al., 2021).

La cocaïne augmente la formation de ces deux types de complexes de récepteurs avec des cinétiques différentes. En effet, nous avons pu montrer que l'hétéromérisation D1R-NMDAR induite par la cocaïne apparaît comme un phénomène transitoire dans le NAc, tandis que l'hétéromérisation D2R-NMDAR au sein de cette même région se maintient sur une période d'abstinence d'au moins une semaine (Andrianarivelo et al., 2021). D'autre part, nous avons établi que l'inhibition du D1R et D2R, avant l'administration de cocaïne, empêche l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR, respectivement.

Pour étudier le rôle de ces complexes *in vivo*, l'équipe a développé une stratégie virale basée sur l'utilisation d'adénovirus adéno-associés de type 9 (AAV9) capables d'exprimer des séquences peptidiques empêchant l'interaction D1R-NMDAR ou D2R-NMDAR, en se basant sur les sites d'interactions connus entre chaque récepteur impliqué dans ces complexes (Cahill et al., 2014; Lee et al., 2002; Liu et al., 2006).

Pour inhiber l'interaction D1R-NMDAR, l'AAV9 développé permet l'expression bicistronique de la **protéine rapporteuse fluorescente rouge (RFP)**, afin de visualiser l'expression virale, et l'expression d'un **peptide qui code la cassette C1 de la partie C-terminale de GluN1** (AAV-Tet-On-C1) qui se lie à D1R (Figure 34 A). Le virus contrôle, qui n'interfère pas avec l'interaction D1R-NMDAR, exprime cette même cassette C1 de GluN1 tronquée sur 9 acides aminés basiques qui sont essentiels à cette interaction (AAV-Tet-On-C1Δ) (Figure 34 B).

Une stratégie similaire a été développée pour altérer l'hétéromérisation D2R-NMDAR. Dans ce cas, l'AAV9 permet l'expression bicistronique de la **RFP** et d'un **peptide codant pour un fragment de la**

troisième boucle intracellulaire de D2R (AAV-Tet-On-D2R-IL3 ; ${}_{225}\text{TKRSSRAFRA}_{234}$) qui se lie à la sous-unité GluN2B du NMDAR (**Figure 34 C**). Afin d'éviter tout biais d'interaction entre D2R et A2AR, l'équipe a raccourci la taille du fragment IL3 décrit par l'équipe de Fang Liu (Liu et al., 2006). En effet, l'étude de Ciruela et collaborateurs a mis en évidence que le D2R interagissait avec A2AR pour former des hétéromères par le biais d'une partie du domaine IL3 de D2R (Ciruela et al., 2004). Le raccourcissement du fragment IL3 permet donc de développer l'AAV interférant avec les interactions D2R-NMDAR et d'éviter d'altérer les complexes D2R-A2AR. Le virus contrôle exprime, quant à lui, un peptide *scramble* (Scr), l'AAV-Tet-On-IL3-Scr (**Figure 34 D**), dont la séquence du fragment IL3 a été redistribuée de manière aléatoire, puisque les acides aminés essentiels à la liaison D2R-GluN2B n'ont pas été caractérisés comme c'est le cas pour D1R-NMDAR. De plus, la séquence *scramble* utilisée ne correspond à aucune autre séquence protéique existante chez la souris.

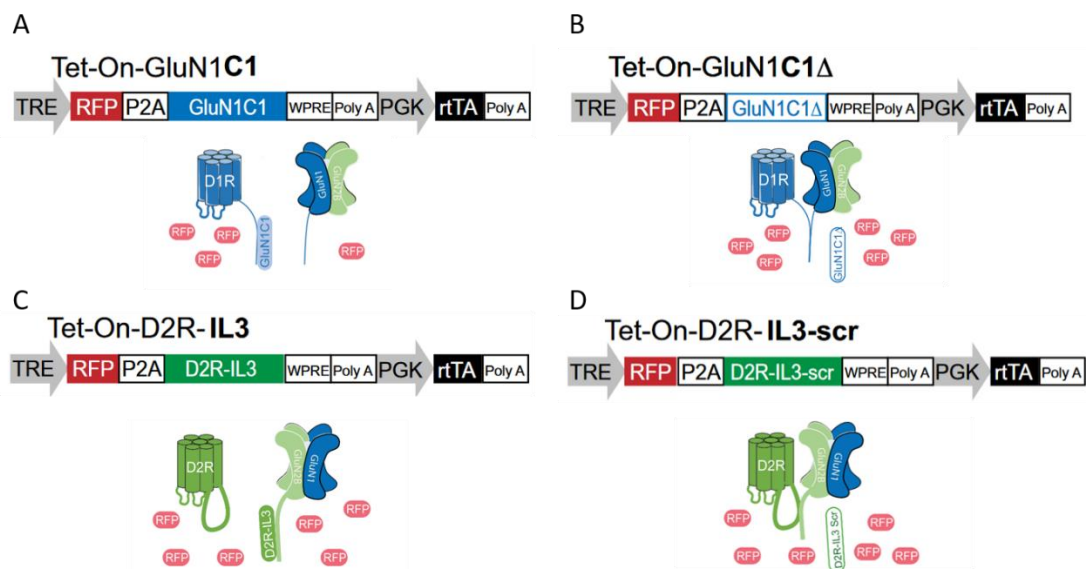


Figure 34 | Stratégie virale pour étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR *in vivo*.

Les virus Tet-On GluN1C1 (A) et Tet-On-D2R-IL3 (C) induisent la perturbation des complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR respectivement. Les virus contrôles Tet-On-GluN1C1Δ (B) et Tet-On-D2R-IL3-Scr (D) ne perturbent pas la formation des hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR respectivement (Andrianarivelo et al., 2021).

La particularité de ces AAV9-Tet-On est d'être sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la doxycycline. Ce système Tet-On s'allume lorsque la doxycycline (un dérivé de la tétracycline) se lie au co-facteur rtTA (une protéine transactivatrice de la tétracycline) qui permet par la suite d'activer le promoteur TRE (élément de réponse à la tétracycline), qui contrôle l'expression bicistronique de la protéine RFP et des séquences peptidiques précédemment décrites. Ainsi, l'expression des virus est contrôlée dans le temps, ce qui a permis à l'équipe d'étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR à différents stades des réponses induites par la cocaïne : le développement, et le maintien des réponses comportementales.

Grâce à l'inhibition contrôlée dans le temps de l'hétéromérisation D1R-NMDAR dans le NAc de souris, l'équipe a pu démontrer que les interactions D1R-NMDAR sont nécessaires pour l'activation de ERK induite par une injection aiguë de cocaïne mais également pour la potentialisation de la transmission glutamatergique (AMPA/NMDA ratio) dans les D1R-MSN induite par des expositions répétées à la cocaïne. D'un point de vue comportemental, l'inhibition de l'hétéromérisation D1R-NMDAR bloque

sélectivement le développement de la sensibilisation locomotrice et de la CPP induites par la cocaïne, mais préserve le maintien de ces comportements (**Figure 35 A et B**) (Andrianarivelo et al., 2021).

À l'inverse, l'inhibition des complexes D2R-NMDAR altère également le maintien de la sensibilisation locomotrice et de la CPP induite par la cocaïne ainsi que la rechute de la CPP (**Figure 35 C et D**) (Andrianarivelo et al., 2021), montrant ainsi que l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans les deux sous-types de MSN joue un rôle distinct dans les différentes phases les adaptations comportementales durables induites par les psychostimulants.

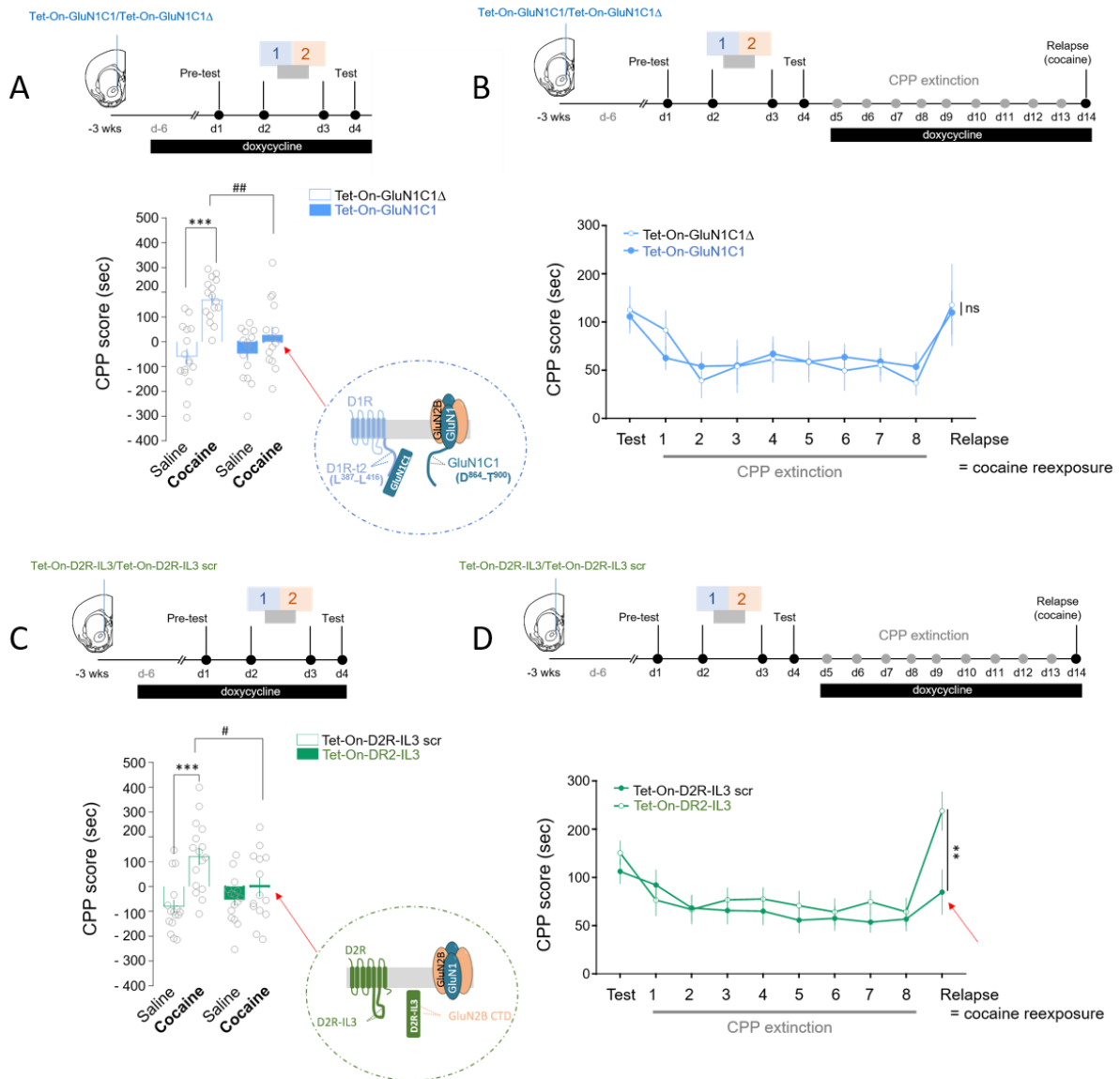


Figure 35 | Rôles différentiel de l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans le contrôle des effets récompensants de la cocaïne.

(A et C) Développement de la CPP induite par deux conditionnements à 15 mg/kg de cocaïne. (B et D) Maintien de la CPP à la cocaïne étudiée après une période d'extinction de 8 jours, nécessaire à l'activation des virus grâce à la doxycycline, et une nouvelle injection de cocaïne (réexposition). La perturbation de l'hétéromérisation D1R-GluN1 grâce au virus Tet-On GluN1C1 bloque le développement de la CPP induite par la cocaïne (A) mais pas son maintien lors d'une réexposition (B). La perturbation de l'hétéromérisation D2R-GluN2B grâce au virus Tet-On-D2R-IL3 bloque à la fois le développement de la CPP induite par la cocaïne (C) et son maintien lors d'une réexposition (D) (Andrianarivelo et al., 2021).

De manière intéressante, l'implication des hétéromères D1R- ou D2R-NMDAR dépend de la nature de la récompense, puisque la perturbation de l'un ou l'autre de ces complexes dans le NAC préserve les comportements induits par la récompense alimentaire (Figure 36) (Andrianarivelo et al., 2021). Ce résultat suggère donc que cibler ces hétéromères préserve les comportements guidés par une récompense naturelle mais altère les réponses induites par les substances addictives, suggérant que cette stratégie puisse avoir un intérêt pour le développement de futures approches pharmacologiques dans le domaine des addictions.

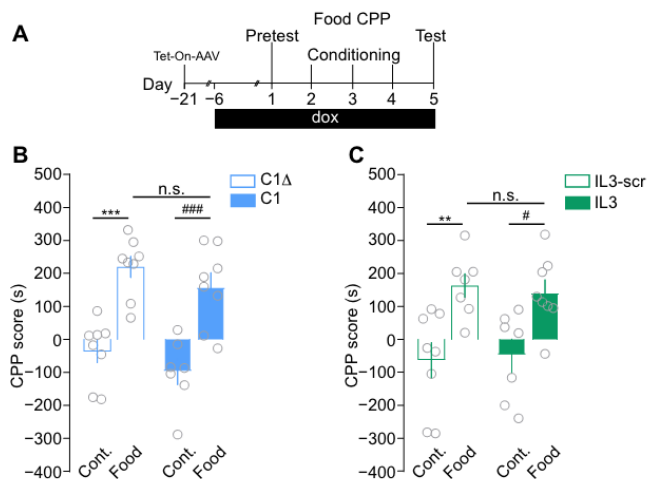


Figure 36 | Le blocage des hétéromères DAR-NMDAR n'altère pas la CPP induite par une récompense naturelle.

(A) Chronologie expérimentale pour étudier les conséquences de l'inhibition de l'hétéromérisation sur le développement de la CPP induite par la nourriture. La perturbation des hétéromères D1R-NMDAR (B) et D2R-NMDAR (C) grâce aux virus C1 et IL3 respectivement, et la doxycycline, n'altère pas la préférence de place conditionnée à la nourriture (Andrianarivelo et al., 2021).

À cet égard, l'implication de l'hétéromérisation D2R-NMDAR dans le contrôle du développement et du maintien des effets psychoactifs et renforçants de la cocaïne, sans altération des comportements liés aux récompenses naturelles, fait de ce type de complexe une cible thérapeutique avec un fort potentiel. Pour renforcer la dimension translationnelle de ces résultats nous avons adapté la technique de PLA pour visualiser les complexes DAR-NMDAR sur des tissus post-mortem humains. Nous avons pu mettre en évidence l'existence de complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR à partir d'échantillons post-mortem de caudé-putamen provenant de sujets ayant un historique de troubles liés à l'utilisation de psychostimulants, et de témoins appariés. Ces résultats montrent une forte diminution de niveau d'expression des protéines D2R (Figure 37 A et B ; PLA D2R single recognition) chez les personnes dépendantes aux psychostimulants, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution de la biodisponibilité de D2R décrite chez les sujets dépendants par imagerie de Tomographie par Émission de Positons (TEP) (Koob and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017; Volkow et al., 2009). Aucun changement n'a été observé quant à l'expression des protéines GluN2B entre les individus témoins et dépendants (Figure 37 C et D). En revanche, malgré la diminution de l'expression de D2R observée, la proportion restante de D2R formant des hétéromères D2R-NMDAR est trois fois plus élevée chez les sujets ayant un usage abusif de psychostimulants par rapport aux sujets témoins appariés (Figure 37 E et F) (Andrianarivelo et al., 2021), ce qui renforce l'idée que le ciblage des hétéromères D2R-NMDAR pourrait être une stratégie à poursuivre pour atténuer les symptômes de l'addiction chez l'être humain.

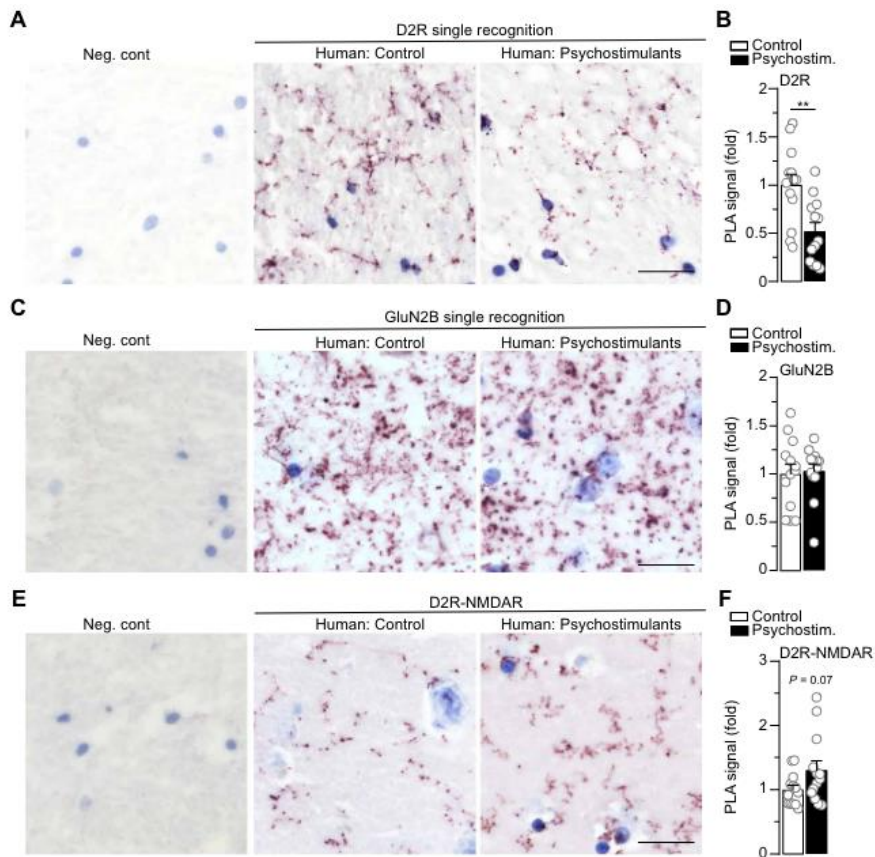


Figure 37 | L'hétéromérisation D2R-NMDAR est accrue dans les échantillons de cerveau post-mortem d'individus souffrant de troubles liés à l'utilisation de psychostimulants, malgré une diminution de l'expression de D2R.

(A-C-E) Images représentatives de la reconnaissance seule de D2R (A) et GluN2B (B) et des hétéromères D2R-NMDAR (E) par PLA chez des sujets humains témoins (control) et ayant souffert de troubles liés à l'utilisation de psychostimulants. (B-D-F) Quantifications du signal PLA normalisé (fold) sur la moyenne des individus control montrant l'expression de D2R (B), de GluN2B (D) et D2R-NMDAR (F) (Andrianarivelo et al., 2021).

Ces résultats montrent donc un rôle central de l'hétéromérisation des DAR-NMDAR dans le NAc dans le contrôle des adaptations pathologiques induites par la cocaïne qui est un psychostimulant. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions, notamment quant à l'implication de ces hétéromères les réponses induites par d'autres classes de substances addictives, telle que la morphine. En effet, l'impact des opioïdes est à ce jour un problème de santé majeur notamment aux Etats-Unis, causant un grand nombre de décès par overdose (Wang, 2019). Dans le chapitre suivant, nous allons nous intéresser aux propriétés addictives, aux symptômes de manque et à l'effet analgésiques produits par la morphine. Nous allons également aborder les différences importantes entre les psychostimulants et les opioïdes, afin de comprendre pourquoi nous avons choisi d'étudier le rôle des hétéromères dans les adaptations à long terme induites par la morphine (voir **Résultats partie II**).

Chapitre 3 : Implication des circuits de récompense et d'aversion dans les comportements addictifs induits par les opioïdes

I. Les opioïdes : enjeu de société et focus sur la morphine

1. Un enjeu de société

Aux États-Unis, l'abus d'opioïdes prescrits sur ordonnance entraîne à lui seul une perte annuelle de plusieurs milliards de dollars pour la société (Wang, 2019). Les opioïdes, tel que la morphine, l'héroïne et le fentanyl (un opioïde synthétique puissant), sont au centre d'une crise de santé publique aux États-Unis. Cette crise, qui dure depuis les années 1990, a entraîné près de 107 000 décès par overdose rien qu'en 2021, et presque 645 000 décès entre 1999 et 2021, d'après le Centre de prévention et de contrôle des maladies américains (Centers for Disease Control, CDC) (Figure 38). Cela est lié à l'augmentation rapide de l'usage à des fins récréatives des opioïdes prescrits avec, entre autres, une transition vers l'abus d'héroïne et, plus récemment, du fentanyl (Compton et al., 2016; Kolodny et al., 2015; Volkow and McLellan, 2016; Voon et al., 2017). Plusieurs facteurs ont contribué à cela, notamment la surprescription d'opioïdes par les médecins, la disponibilité facile de ces médicaments, la promotion agressive de l'industrie pharmaceutique et la désinformation sur la sécurité des opioïdes. La pandémie de COVID-19 a également amplifié la crise en accélérant les décès par surdose à des niveaux sans précédent (Kosten and Petrakis, 2021).

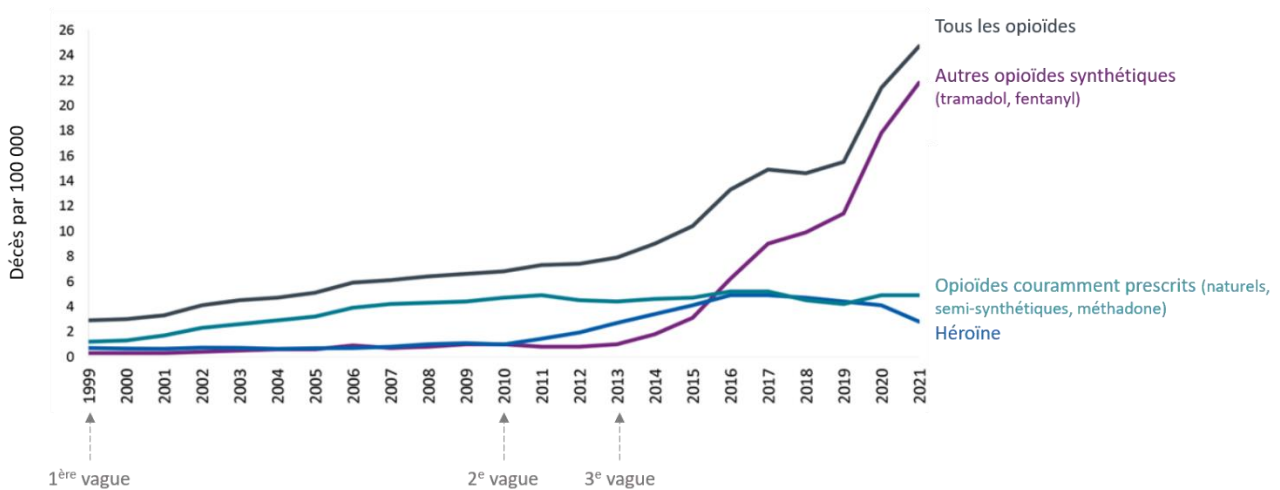


Figure 38 | Taux de décès par overdose aux États-Unis entre 1999 et 2021, ajustés selon l'âge et la catégorie d'opioïdes.

Le nombre de décès par surdose a augmenté de plus de 16 % entre 2020 et 2021. Plus de 75 % des 107 000 décès par surdose survenus en 2021 concernaient un opioïde. Cette augmentation du nombre de décès par overdose d'opioïdes peut être décrite en trois vagues distinctes. La première vague a commencé avec l'augmentation de la prescription d'opioïdes dans les années 1990, les décès par overdose impliquant des opioïdes sur ordonnance (opioïdes naturels, semi-synthétiques et méthadone) augmentant depuis au moins 1999. La deuxième vague a débuté en 2010, avec une augmentation rapide des décès par surdose d'héroïne. La troisième vague a débuté en 2013, avec une augmentation significative des décès par overdose impliquant des opioïdes synthétiques, en particulier le fentanyl de fabrication illicite. Le marché du fentanyl continue d'évoluer et on le trouve en combinaison avec de l'héroïne, des pilules contrefaites et de la cocaïne. D'après le Centre de prévention et de contrôle des maladies américains (CDC).

L'Asie a également été touchée par ce phénomène, même si la situation s'est avérée très hétérogène. Certaines régions, comme l'Asie du Sud-est, ont été historiquement touchées par la production d'opium et le trafic d'héroïne. En effet, la région frontalière de la Birmanie, du Laos et de la Thaïlande, appelée le Triangle d'Or, est une zone importante de production d'opium (pour lecture, [Chouvy, 2004](#)). D'autres pays asiatiques ont connu une augmentation de l'abus d'opioïdes en raison de la disponibilité croissante de ces médicaments et d'une meilleure couverture d'assurance santé. Cette crise de la consommation abusive d'opioïdes a sensibilisé le public à l'addiction aux drogues et entraîné la prolifération de médicaments destinés à traiter la dépendance aux opioïdes. Elle a également suscité de nouvelles politiques publiques ainsi qu'un grand intérêt pour le développement de « meilleurs » opioïdes pour traiter la douleur avec une efficacité élevée et durable sans tolérance, sans menaces de surdose et sans dépendance aux drogues.

2. La morphine, extraite de l'opium

La morphine est un alcaloïde naturel extrait de l'opium en 1805. Elle aurait été mise en évidence par plusieurs chercheurs, mais le mérite de la découverte revient à Friedrich Wilhelm Sertürner en 1831 à travers le prix Montyon de l'Institut de France ([Bachoffner, 1983](#); [Waldhoer et al., 2004](#)). Sa dénomination est issue du dieu grec du sommeil et des rêves, appelé Morphée, en lien avec son effet sédatif. L'opium est confectionnée à partir du latex extrait des graines du pavot à opium (*Papaver somniferum*) ([Figure 39](#)) ([Darcq and Kieffer, 2018](#)).



Figure 39 | Illustration du Pavot à opium.

Appelé également pavot des jardins, le pavot somnifère est une espèce de plante herbacée originaire d'Europe et d'Afrique du Nord, connue pour ses propriétés psychotropes, sédatives, mais également pour ses fins alimentaires et ornementales. D'après *Medical Botany* (1836).

Actuellement, la morphine est largement utilisée en médecine pour soulager la douleur sévère, notamment après une chirurgie, en cas de traumatisme ou pour traiter la douleur liée au cancer ([Volkow and McLellan, 2016](#)). C'est le composé ayant le pouvoir le plus analgésique malgré des effets indésirables graves et un fort potentiel de dépendance ([Darcq and Kieffer, 2018](#)). La tolérance à la morphine se développe rapidement, ce qui signifie que les patients peuvent avoir besoin de doses plus élevées pour obtenir le même soulagement de la douleur. L'usage à long terme de morphine peut entraîner une dépendance physique et psychologique. Son dérivé le plus connu est l'héroïne. Il s'agit de la forme diacétylée de la morphine qui a été commercialisée à l'origine comme le premier opiacé non-addictif pour traiter la toux et l'asthme en 1898. Depuis, la dépendance à l'héroïne représente un problème sociétal majeur ([Darcq and Kieffer, 2018](#)).

II. Le système opioïde endogène et ses effets sur le circuit de la récompense et l'aversion

Le système opioïde comprend trois récepteurs homologues appartenant à la famille des GPCR. Ces trois récepteurs sont exprimés dans le cerveau, la moelle épinière, la peau et le tractus gastro-intestinal, ainsi qu'au niveau des cellules immunitaires ([Stefano et al., 2000](#); [Wang, 2019](#)). Les

récepteurs opioïdes se répartissent donc en trois sous-types : Mu « μ » (MOR), Kappa « κ » (KOR) et Delta « δ » (DOR) et sont codés respectivement par les gènes *Oprm1*, *Oprk1* et *Oprd1* (Charbogne et al., 2014; Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002). Leurs séquences protéiques, identifiées dans les années 1990 grâce au clonage de gènes, ont permis de mettre en évidence de nombreuses homologies entre ces récepteurs (Chen et al., 1993).

Ces récepteurs inhibent l'activité cellulaire par couplage avec les protéines $G_{ai/o}$ (Law et al., 2000). Chacun de ces récepteurs possède des effets analgésiques et une répartition unique dans le cerveau (Waldhoer et al., 2004). En condition physiologique, les récepteurs opioïdes sont stimulés par des peptides opioïdes endogènes, formant une famille comprenant la β -endorphine, les enképhalines et les dynorphines. À la fin des années 1980 et au début des années 1990, trois gènes codant pour des précurseurs peptidiques opioïdes ont été isolés, à savoir, POMC, PENK et PDYN, qui codent respectivement pour la proopiomélanocortine, la préproenképhaline (ou proenképhaline) et la préprodynorphine (ou prodynorphine) (Charbogne et al., 2014; Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002; Wang, 2019). Ce sont les principaux peptides opioïdes endogènes, mais il en existe une trentaine (Akil et al., 1998). Distribués dans tout le système nerveux, les peptides et récepteurs opioïdes réduisent les réponses aux stimuli douloureux et au stress et influencent le traitement des récompenses et l'humeur. Les opioïdes exogènes ainsi que nombre de leurs métabolites peuvent, à travers ces récepteurs, provoquer une sédation, une analgésie, une euphorie et une dépression respiratoire en stimulant les récepteurs opioïdes dans le cerveau. La tolérance et la dépendance aux opioïdes se développent rapidement ; ainsi, les symptômes de sevrage tels que la diarrhée, les douleurs osseuses et les frissons sont très fréquents chez les utilisateurs chroniques (Wang, 2019).

La thérapie comportementale, la thérapie cognitivo-comportementale et d'autres formes de conseils (*counseling*) sont souvent utilisés pour aider les personnes à gérer leur dépendance. Par ailleurs, la *Food and Drug Administration* (FDA) a approuvé l'utilisation de trois médicaments clés pour les troubles liés à l'utilisation d'opioïdes. Ainsi, la méthadone, la buprénorphine et la naloxone ont démontré leur efficacité dans le traitement de la dépendance, chacun exerçant des effets distincts sur les différents récepteurs opioïdes (Thompson et al., 2021). La méthadone et la buprénorphine ciblent les MOR dans le cerveau, réduisant les symptômes de sevrage et l'état de manque, en particulier dans les cas de dépendance aux opioïdes. La méthadone est un agoniste MOR complet tandis que la buprénorphine est un agoniste MOR partiel. La naloxone, quant à elle, est un antagoniste opioïde spécifique ciblant soit les MOR, les KOR et les DOR, et est principalement utilisée pour traiter les overdoses d'opioïdes (Darcq and Kieffer, 2018; Stein, 2016; Wang, 2019). Malgré l'efficacité démontrée des médicaments actuels pour atténuer l'intoxication aux opioïdes et réduire les symptômes de sevrage et l'état de manque, la rechute et la rémission restent des problèmes courants chez les consommateurs d'opioïdes. Ces difficultés sont exacerbées par le développement d'une tolérance au niveau des récepteurs opioïdes et par les altérations neurobiologiques des voies cérébrales résultant d'un abus répété d'opioïdes (Wang, 2019).

1. Le récepteur mu aux opioïdes

Les MOR sont présents dans des régions spécifiques du cerveau (Figure 40), telles que le cortex cérébral, le thalamus et la substance grise périaqueducule (PAG). Ils sont également présents au sein du NAc et de la BLA. La délétion du gène *Oprm1* dans tout le cerveau de la souris est responsable de la suppression des effets analgésiques, récompensants, et des symptômes somatiques liés au sevrage

(Matthes et al., 1996). Les MOR contribuent ainsi aux aspects agréables et incitatifs des stimuli gratifiants, en plus des effets analgésiques, suggérant l'importance des MOR dans les actions thérapeutiques pour soulager la douleur, mais également des effets addictifs indésirables de la morphine.

Le rôle des MOR a initialement été montré dans la modulation du circuit de la récompense. L'utilisation de souris MOR KO a montré une abolition de l'augmentation de la DA extracellulaire dans le striatum induite par la morphine (Cui et al., 2014). Plus précisément, il a été montré que les opioïdes induisent leur effet récompensant en se liant aux MOR exprimés par les interneurons GABAergiques au sein de la VTA, désinhibant ainsi l'activité des neurones DAergiques et provoquant une augmentation de la libération de DA notamment dans le NAc (**voir Chapitre 1, figure 8**) (Fields and Margolis, 2015; Jalabert et al., 2011; Johnson and North, 1992; Thompson et al., 2021).

En plus de leur rôle local dans la VTA sur la modulation de la signalisation DAergique, les MOR sont exprimés au niveau des afférences inhibitrices issues du RMTg projetant sur la VTA. L'inhibition des MOR bloque l'effet excitateur induit par une infusion locale de morphine dans la VTA. Ainsi, l'excitation par la morphine des neurones DAergiques de la VTA *in vivo* met également en jeu les afférences GABAergiques des neurones du RMTg (Jalabert et al., 2011). De plus, l'infusion d'antagonistes AMPAR et NMDAR (CNQX et AP5 respectivement) au sein de la VTA inhibe la CPP induite par la morphine (Harris et al., 2004). Ces données soulignent l'importance des MOR de la VTA et du RMTg ainsi que des NMDAR de la VTA sur l'activité DAergique de la VTA et les réponses comportementales induites par la morphine.

Outre la VTA et le RMTg, les MOR sont largement exprimés dans les différentes populations neuronales du striatum, notamment au niveau des D1R- et D2R-MSN (Cui et al., 2014; Miura et al., 2008; Oude Ophuis et al., 2014). Ils sont également exprimés sur les ChAT et sur les neurones glutamatergiques corticaux ou thalamiques innervant les MSN. Au sein de ces différentes populations neuronales, les MOR sont exprimés de manière différenciée dans les sous-régions du striatum. Par exemple, ils sont exprimés dans les patchs ou striosomes où ils colocalisent avec les D1R-MSN exprimant la dynorphine (Brimblecombe and Cragg, 2017; Miura et al., 2008; Severino et al., 2020). La stimulation des MOR conduit également à une augmentation de la signalisation DAergique grâce à leur expression par les D1R-MSN du NAc projetant sur la VTA (Charbogne et al., 2017; Cui et al., 2014; Xia et al., 2011). En effet, la délétion des MOR spécifiquement dans les D1R-MSN du striatum diminue l'hyperactivité locomotrice et la sensibilisation locomotrice induites par les opioïdes chez la souris. Par ailleurs, la restauration conditionnelle de l'expression des MOR spécifiquement dans les D1R-MSN chez les souris KO restaure la CPP induite par la morphine et partiellement l'auto-administration induite par le rémifentanil (agoniste morphinique MOR d'action rapide) (Cui et al., 2014). Ces données suggèrent l'importance des MOR exprimés dans les D1R-MSN dans les propriétés récompensantes et renforçantes induites par les opioïdes. En revanche, le KO MOR dans les neurones exprimant le récepteur A2AR (correspondant au D2R-MSN du striatum) induit une hyperactivité locomotrice, une sensibilisation locomotrice et un comportement de recherche de drogue associés à la morphine (Severino et al., 2020).

La stimulation des MOR peut également contribuer au développement de comportements addictifs par le biais de la modulation des NMDAR. En effet, la stimulation des NMDAR par le glutamate active

l'enzyme oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) produisant l'oxyde nitrique (NO), impliqué dans la tolérance, la dépendance et la récompense induites par la morphine (Gholami et al., 2003; Mao, 1999; Trujillo, 2002). L'utilisation d'antagonistes des NMDAR, tels que le MK-801, inhibe ces comportements induits par les opioïdes (Ben-Eliyahu et al., 1992; Ribeiro Do Couto et al., 2005; Tomazi et al., 2017), mais induit des effets secondaires importants (Chizh and Headley, 2005; Elliott et al., 1994; Herman et al., 1995; Hoffmann et al., 2003; Parsons, 2001; Zhou et al., 2011), rappelant ce que nous avons vu sur le ciblage pharmacologique classique des récepteurs dans le **Chapitre 2**. Il a été montré que la morphine, via les MOR, potentialise l'activité des NMDAR en augmentant les niveaux de NO (Zhou and Zhu, 2009). La production de NO via la cascade de signalisation NMDAR-nNOS est dépendante de la PSD-95 et dépend également de l'interaction entre PSD-95 et nNOS (Aarts et al., 2002; Brenman et al., 1996; Christopherson et al., 1999). Une étude récente a montré que l'inhibition de l'interaction protéine-protéine entre la PSD-95 et nNOS, via des molécules inhibitrices injectées en systémique, diminuait la récompense induite par la morphine (CPP) et la vulnérabilité à la rechute du comportement d'auto-administration chez le rat, sans altérer l'activité catalytique de nNOS. Cette stratégie aurait l'avantage de ne pas engendrer d'effets secondaires contrairement au MK-801 (Oliva et al., 2022).

Certaines études récentes ont examiné la fonction des MOR en dehors de la VTA et du striatum chez la souris en utilisant des approches génétiques. L'utilisation de souris MOR KO, couplée à de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), a permis de montrer une augmentation du volume de l'habénula, du PFC et de l'amygdale et, entre autre, une diminution du volume du NAc chez la souris (Nasseef et al., 2018). Les MOR sont exprimés de manière dense dans l'habénula médiale (MHb), qui, avec la LHb, forment le complexe habénulaire. Ce complexe est considéré comme un centre de traitement aversif et joue un rôle « anti-récompense » (Boulos et al., 2020; Gardon et al., 2014). Boulos et collaborateurs ont généré une lignée de souris KO conditionnelle MOR dans les neurones Chnr4 (cellules exprimant la sous-unité $\beta 4$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine) (Chnr4-cre x MOR^{fl/fl}), représentant environ 50% des neurones de la MHb exprimant les MOR. L'inactivation conditionnelle de MOR dans ces neurones n'affecte pas les propriétés psychoactives et récompensantes de la morphine, mais entraîne une réduction de l'aversion de place conditionnée (CPA) induite par la naloxone (Boulos et al., 2020). De plus, la stimulation optogénétique des neurones de l'habénula exprimant les MOR engendre un comportement d'évitement pour le compartiment associé à la stimulation (Bailly et al., 2023). Ainsi, outre le système de récompense, les MOR pourraient également réguler le traitement de l'aversion dans d'autres réseaux cérébraux.

Au-delà des réponses aux drogues, il a été montré que les souris KO MOR adultes présentaient un déficit d'interactions sociales ainsi que des comportements de type autistique (Becker et al., 2014), suggérant le rôle des MOR dans les comportements sociaux. Ils ont également été impliqués dans les comportements maternels chez la souris (Moles et al., 2004) ainsi que dans la motivation pour la nourriture et le saccharose lors d'un paradigme d'auto-administration (Papaleo et al., 2007).

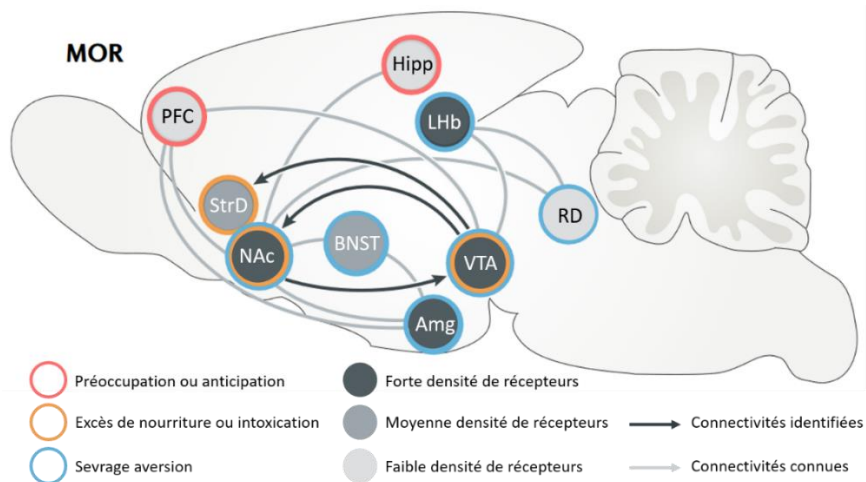


Figure 40 | Fonction et localisation des MOR dans les neurocircuits de l'addiction.

Les MOR localisés dans les interneurons GABAergiques de la VTA facilitent la libération de DA et la récompense induite par la drogue. À l'inverse, les MOR exprimés principalement dans les D1R-MSN du NAc et du striatum dorsal (StrD) régulent à la fois la récompense de la drogue (pour l'alcool et la morphine) et la recherche de l'héroïne. Les adaptations MOR dans le raphé dorsal (RD) conduisent à des états dépressifs et au retrait social en cas d'abstinence prolongée d'héroïne. Les rôles des populations cellulaires exprimant le MOR dans les régions qui modulent les états affectifs négatifs et dans les régions où le récepteur est abondant (LHb, RD, Amg) restent à étudier. Enfin, les MOR sont également exprimés dans les régions cérébrales impliquées dans la mémoire contextuelle et les fonctions exécutives (y compris l'hippocampe (Hipp) et le PFC). Ce schéma simplifié résume les données animales impliquant des approches génétiques ou cellulaires spécifiques pour étudier les récepteurs opioïdes dans les circuits des comportements liés à la dépendance. Les régions du cerveau impliquées dans la toxicomanie sont représentées par des cercles avec leurs connectivités connues (flèches gris clair) et comprennent la plupart des régions étudiées dans la recherche sur la toxicomanie chez les rongeurs. Les cercles sont de couleurs différentes selon que la structure cérébrale a été associée aux stades de préoccupation ou d'anticipation (rouge), de frénésie ou d'intoxication (orange), de sevrage ou d'aversion (bleu). La densité des récepteurs MOR en fonction des structures est représentée dans le cas d'un cerveau de souris naïve. Les voies régulées par les récepteurs opioïdes identifiées dans les études discutées dans cette revue sont indiquées par des flèches noires. D'après Darcq and Kieffer, 2018.

En résumé, les résultats ci-dessus montrent que les MOR sont à la fois impliqués dans les comportements guidés par des récompenses naturelles et dans les comportements de type addictif induits par les opiacés.

2. Le récepteur kappa aux opioïdes

Les KOR sont largement exprimés dans le cerveau, notamment dans les neurones DAergiques de la VTA et les neurones sérotoninergiques (5HT) du raphé dorsal (RD), tous deux projetant vers le NAc (**Figure 41**) (Pomrenze et al., 2022; Tao and Auerbach, 2005). À l'inverse de l'activation des MOR qui désinhibe de façon indirecte les neurones DAergiques de la VTA, il a été montré que l'utilisation d'agoniste des KOR inhibait les terminaisons axonales de ces neurones DAergiques provoquant ainsi une diminution significative de la libération de DA au sein du NAc (Bals-Kubik et al., 1993; Spanagel et al., 1992) et du PFC (Margolis et al., 2006). Leur expression a également été observée au sein de l'amygdale, du cortex (pariétal et temporal), du thalamus, de l'hypothalamus, de la SNc ainsi que dans d'autres régions cérébrales (DePaoli et al., 1994).

De plus en plus de travaux indiquent un lien entre les circuits liés au stress et la consommation répétée d'opioïdes. En effet, l'utilisation d'antagonistes des KOR a permis de prévenir les symptômes dépressifs

notamment l'aversion sociale associée au stress, ainsi que les symptômes de sevrage aux drogues chez les rongeurs, mais également chez l'Homme. À l'inverse, l'utilisation d'agoniste provoque des effets aversifs et entraîne de l'évitement social (Resendez et al., 2016; Robles et al., 2014; Trezza et al., 2011), mais les mécanismes précis par lesquels ils influencent les déficits de sociabilité pendant le sevrage aux opioïdes restent mal compris. En revanche, le système des KOR a été lié à la rechute à de nombreuses substances notamment les opioïdes. Une augmentation significative de KOR a été détectée dans le striatum seulement après une longue période de sevrage (Wasli et al., 2020). De plus, la stimulation des KOR déclenche également une aversion à l'origine d'une dysphorie via une inhibition présynaptique de la libération de DA au niveau du NAc et du PFC (Bals-Kubik et al., 1993; Koob et al., 2014; Koob and Le Moal, 2008; Margolis et al., 2006; Spanagel et al., 1992; Wee and Koob, 2010). La dysphorie étant un trouble psychique caractérisé par une humeur oscillant entre tristesse et excitation.

Au sein du NAc, les KOR sont présents dans les D1R- et D2R-MSN, ainsi qu'aux terminaisons des projections glutamatergiques provenant de la BLA. Les D1R-MSN sont également responsables de la production de dynorphine. Une étude récente a révélé que les KOR régulent de manière distincte deux mécanismes présynaptiques qui influencent les activités des neurones D1R- et D2R-MSN : l'un de ces mécanismes implique la modulation des projections issues de la BLA vers le NAc, tandis que l'autre est de nature locale puisqu'il repose sur la modulation des collatérales inhibitrices réciproques entre les deux sous-population de MSN. Ainsi, l'inhibition présynaptique des KOR par optogénétique diminue la transmission excitatrice de la BLA exercée sur les D1R-MSN et augmente celle exercée sur les D2R-MSN par la BLA, mais également par l'hippocampe ventral (Tejeda et al., 2017). De plus, le blocage des récepteurs KOR par un antagoniste infusé dans la VTA supprime l'aversion de place induite par la stimulation optogénétique prolongée des D1R-MSN (Soares-Cunha et al., 2020). Le NAc, la BLA et l'hippocampe ventral sont initialement impliqués dans la composante récompensante de stimuli naturels ou de drogues (voir Chapitre 1), mais ont récemment été impliqués dans les conséquences comportementales liées au stress (voir Chapitre 4) (Bagot et al., 2015). Ces résultats renforcent la notion émergente selon laquelle les mécanismes de récompense et d'aversion sont fortement mêlés au sein du NAc, spécifiquement au niveau des D1R- et D2R-MSN, et que les KOR régulent de manière différentielle l'activité de ces neurones (Al-Hasani et al., 2015).

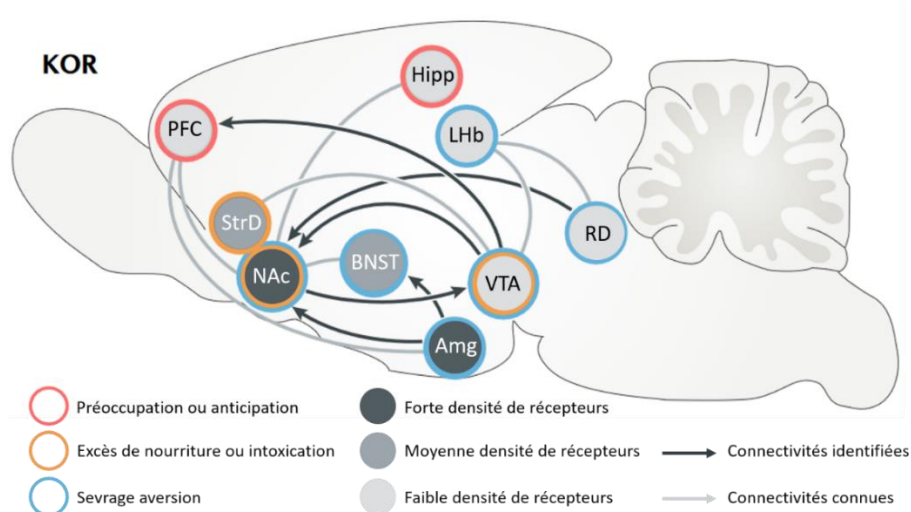


Figure 41 | Fonction et localisation des KOR dans les neurocircuits de l'addiction.

Les KOR des neurones DAergiques de la VTA s'opposent à l'activité stimulant des MOR au niveau des terminaisons dans le NAc et le PFC, et perturbent l'inhibition comportementale. Les KOR dans les MSN du NAc contrôlent de

manière différentielle les activités des D1R- et D2R-MSN et leurs entrées provenant de l'amygdale (Amg) pour réguler négativement les processus motivationnels. Les KOR dans les neurones 5-HT du RD favorisent la réintégration induite par le stress de la recherche de cocaïne. Dans les neurones excitateurs de la BLA projetant vers le noyau du lit de la strie terminale (BNST), les KOR favorisent l'anxiété. De plus, dans les interneurons GABAergiques de l'Amg centrale, les KOR contribuent à la consommation excessive d'alcool, probablement par le biais d'interactions avec les systèmes de facteurs de libération de la corticotropine. Enfin, tout comme les MOR, les KOR sont également exprimés dans les régions du cerveau impliquées dans la mémoire contextuelle et les fonctions exécutives (Hipp et PFC). D'après Darcq and Kieffer, 2018.

3. Le récepteur delta aux opioïdes

Contrairement aux MOR et KOR, les rôles de la signalisation dépendante des DOR dans l'addiction ont été moins étudiés. L'utilisation de souris KO DOR n'a pas montré d'altérations de la récompense dans des modèles d'auto-administration (Charbogne et al., 2014; Darcq and Kieffer, 2018; Lutz and Kieffer, 2013). En revanche, les souris KO DOR présentent une altération de l'association drogue-contexte dans le paradigme de CPP induite par la morphine, empêchant le développement de la préférence pour le compartiment associé à l'administration de morphine (Le Merrer et al., 2011). Ces données révèlent le rôle des DOR dans les souvenirs liés au contexte associé à la drogue et dans les mécanismes de rechute. Des études récentes ont mis en avant le rôle anxiolytique et antidépresseur des KOR à l'aide d'approches génétiques cellules-spécifiques (Chu Sin Chung et al., 2015) et de modèles de souris KO (Filliol et al., 2000). Ils ont également été impliqués dans le phénotype dépressif induit par l'abstinence prolongée à l'héroïne (Lutz et al., 2014) ainsi que dans la douleur chronique (Spahn and Stein, 2017) (**Chapitre 3-V-1**). Finalement, le blocage des DOR par l'infusion d'un antagoniste dans le VP (mais pas dans la VTA) bloque la CPA induite par la stimulation optogénétique prolongée des D2R-MSN (Soares-Cunha et al., 2020). Ces données suggèrent un rôle thérapeutique important des KOR dans plusieurs domaines (Gendron et al., 2016; Pradhan et al., 2011).

En résumé, les données expérimentales issues de la recherche animale ont mis en évidence le rôle central du système opioïde dans le traitement de la récompense et de l'aversion, ainsi que l'hypothèse selon laquelle la dérégulation de la neurotransmission des opioïdes est un moteur important de l'abus de drogues et plus particulièrement des opiacés. Les MOR, KOR et DOR contribuent chacun de manière spécifique à différents aspects de l'addiction, mais tous modulent la motivation.

III. Le circuit de la récompense et les symptômes de manque liés au sevrage aux opioïdes

1. Les symptômes de manque induits par un sevrage aigu ou prolongé aux opioïdes

La consommation abusive d'opioïdes repose à la fois sur les puissants effets renforçants liés à leur consommation mais également sur les symptômes extrêmement déplaisants liés au sevrage qui poussent l'individu à en consommer de nouveau pour les éviter (Wise and Koob, 2014). En effet, la tolérance se développe rapidement et conduit à une consommation accrue et incontrôlée combinée à un besoin impérieux de minimiser les symptômes de sevrage provoquant alors une dépendance aux opioïdes. Les sentiments euphoriques s'estompent facilement à mesure que la tolérance se développe, mais les symptômes de sevrage persistent. Les patients présentant une dépendance sévère aux opioïdes éprouvent des sensations terribles et inconfortables telles que des douleurs musculaires, des douleurs osseuses, des larmoiements, un écoulement nasal, des bâillements, de la diarrhée ou constipation, des crampes abdominales, de l'agitation et de la transpiration pendant le sevrage aux opioïdes. Une anxiété, une hyperalgésie et un évitement social ont également été reportés (Goeldner et al., 2011; Lutz et al., 2014; Pantazis et al., 2021; Strang et al., 2020; Volkow and Blanco, 2023; Wang,

2019; Welsch et al., 2020). Ainsi, les mois, voire les années, d'abstinence qui suivent l'arrêt de la consommation d'opioïdes (sevrage prolongé) représentent une période à haut risque de rechute en raison de cette série de symptômes négatifs associés, qui poussent à poursuivre la prise d'opioïdes (Darcq and Kieffer, 2018; Koob and Le Moal, 1997; Wise and Koob, 2014). Par ailleurs, les périodes d'isolement social, comme celles qui ont été précipitées par la pandémie de COVID-19, augmentent le risque de rechute et d'overdose mortelle (Christie et al., 2021; Volkow, 2020), révélant l'importance de conditions sociales stables. L'héroïne et la morphine ont une demi-vie relativement courte : 2 à 3 minutes et 2 à 3 heures, respectivement. Les symptômes de sevrage surviennent quelques heures plus tard. Le traitement substitutif par agonistes opioïdes peut réduire l'intensité de l'euphorie et du sevrage et possède une demi-vie plus longue, ce qui permet de stabiliser la vie des utilisateurs chroniques (Wang, 2019).

2. Protocole de sevrage aux opioïdes et effets comportementaux associés

Le sevrage aigu et l'abstinence prolongée des opioïdes sont tous deux associés à des états émotionnels négatifs qui peuvent être modélisés chez les rongeurs (Goeldner et al., 2011), et qui impliquent des circuits légèrement différents (Ozdemir et al., 2023).

Le modèle de sevrage le plus largement utilisé dans la littérature est celui de l'administration à des doses croissantes d'opioïdes au fil des jours, bien que les protocoles varient en fonction du modèle animal utilisé (souris, rat, modèle génétique), de la drogue employée, et de son mode d'administration (intrapéritonéale, sous-cutanée, systémique ; une ou plusieurs fois/jour), et de la réponse comportementale étudiées. Le sevrage peut être effectué spontanément, c'est-à-dire naturellement par l'arrêt de l'administration d'opioïdes, ou précipitamment, à travers l'injection d'antagoniste tel que la naloxone ou d'agoniste comme la buprénorphine (Bagley et al., 2005; Becker et al., 2017; Befort et al., 2008; Contarino and Papaleo, 2005; Goeldner et al., 2011; Le Merrer et al., 2012; Matthes et al., 1996; Smith et al., 2016; Zanos et al., 2014, 2016a).

Les signes somatiques tels que les sauts, les tremblements de chien mouillé (*wet dog shake*), les tremblements des pattes avant (*paw tremor*) et la diarrhée apparaissent après l'injection de naloxone (Kaplan et al., 1994). Ces symptômes apparaissent également après un sevrage spontané, mais plus tardivement (Contarino and Papaleo, 2005; Papaleo et al., 2007). La précipitation du sevrage aux opioïdes, comme avec la naloxone, provoque une augmentation de l'intensité, de la fréquence et le moment d'apparition des signes somatiques induits par le sevrage (Linseman, 1977; Mucha et al., 1979; Ruiz et al., 1996), que l'on ne retrouve pas lors d'un sevrage spontané, naturel. L'usage de composés antagonistes engendre également des changements comportementaux et cérébraux qui diffèrent de ceux observés dans les conditions de sevrage spontané (Fukunaga et al., 1996; Fukunaga and Kishioka, 2000). Étant donné que la naloxone est à ce jour, et depuis de nombreuses années, employée comme antidote contre la surdose d'opioïdes, il est important d'en étudier les effets. Il convient également de noter que des différences d'expression des signes somatiques liés au sevrage ont été reportées entre les rongeurs mâles et femelles, qui sont masqués par le sevrage précipité à la naloxone (Blum et al., 1976; Cicero et al., 2002; Papaleo and Contarino, 2006). Lors d'un sevrage spontané, les mâles affichent une perte de poids de manière dépendante de la dose, contrairement aux femelles. En revanche, hormis pour le nombre de sauts plus important chez les mâles, les femelles présentent des signes somatiques, tels que les *wet dog shake* et *paw tremor*, plus importants et qui diminuent moins rapidement que chez les mâles (Papaleo and Contarino, 2006). Des études cliniques

ont également montré que les femmes étaient plus vulnérables que les hommes aux propriétés addictives et aux sevrages induits par les opioïdes (Anglin et al., 1987; Chen et al., 1998; Greenfield et al., 2003).

Chez la souris, l'administration répétée de morphine induit également des stéréotypies motrices (Pollock and Kornetsky, 1989; Walter and Kuschinsky, 1989). Contrairement au sevrage à la cocaïne, l'abstinence à la morphine provoque un toilettage excessif (*grooming*) accompagné de redressement (*rearing*) de l'animal (Becker et al., 2017). Par ailleurs, en ce qui concerne le sevrage à la morphine, les animaux montrent une anxiété plus importante lors du test de comportement d'enfouissement des billes (*marble burying test*). Ce test est utilisé pour mesurer les comportements répétitifs et liés à l'anxiété chez les rongeurs lorsqu'ils rencontrent des objets inconnus. En revanche, ces animaux explorent davantage les bras ouverts que leurs homologues salins dans le test du labyrinthe surélevé (*elevated-plus maze*, EPM), ce qui indique à l'inverse une anxiété réduite. Ainsi, dans cette étude, ils concluent sur des niveaux d'anxiété plus importants chez les animaux en période de sevrage à la morphine, la nicotine, le THC et l'alcool, mais pas en sevrage de cocaïne (Becker et al., 2017). Dans l'ensemble, ces données indiquent qu'il existe des différences notables entre la dépendance aux opioïdes et la dépendance aux psychostimulants tels que la cocaïne.

De plus, un sevrage prolongé aux opioïdes engendre le développement de symptômes de type dépressif incluant le retrait social. Ces modifications comportementales sont renforcées ou réduites par l'inactivation génétique des récepteurs opioïdes delta et kappa, respectivement (Lutz et al., 2014). Ces comportements seraient modulés par une signature transcriptionnelle dans l'amygdale, semblable à la nicotine, le THC et l'alcool, contrairement à la cocaïne qui conduit à des adaptations distinctes de ces quatre drogues. En effet, l'abstinence à la cocaïne ne produit qu'une diminution modérée de l'intérêt social, réduit les niveaux d'anxiété et entraîne des régulations transcriptionnelles opposées à celles induites par l'abstinence à la morphine. Les souris abstinentes à la morphine présentent un comportement social altéré (Becker et al., 2017). Ces données sont cohérentes avec des travaux antérieurs selon lesquels l'abstinence prolongée d'un traitement chronique et progressif aux opioïdes entraîne des déficits de comportement social chez les rongeurs (Ayranci et al., 2015; Goeldner et al., 2011; Zanos et al., 2014), ainsi qu'avec des études cliniques décrivant des déficits de cognition sociale chez des patients sous traitement aux opioïdes (Johnson et al., 2014; McDonald et al., 2013). Ainsi, en plus des symptômes de manque physiques, le sevrage aux opioïdes présente également une charge cognitive émotionnelle chez la souris, mais également chez l'Homme (pour revue, Ozdemir et al., 2023) (Figure 42) qui favorisent la rechute.

Ces différences entre la cocaïne et la morphine peuvent s'expliquer par une différence dans la réactivité neuronale traduite par l'expression de l'IEG c-fos, qui est diminuée dans la VTA suite à un sevrage à la morphine, à l'inverse de la cocaïne qui présente une augmentation de c-fos (Becker et al., 2017). La diminution de l'activation neuronale dans cette région, qui résulte probablement d'une stimulation soutenue pendant l'exposition aux drogues et pendant le sevrage (Lüscher and Malenka, 2011), réduit la libération de DA au niveau du striatum et peut contribuer à une moindre sensibilité à la récompense dans l'addiction (Volkow et al., 2010). Ces données peuvent expliquer le déficit d'interaction sociale qui émerge à la suite d'un sevrage à la morphine. De plus, une diminution de la réactivité dans le RD, une région impliquée dans la récompense sociale, a été mise en évidence lors d'un sevrage à la morphine (Becker et al., 2017; Dölen et al., 2013).

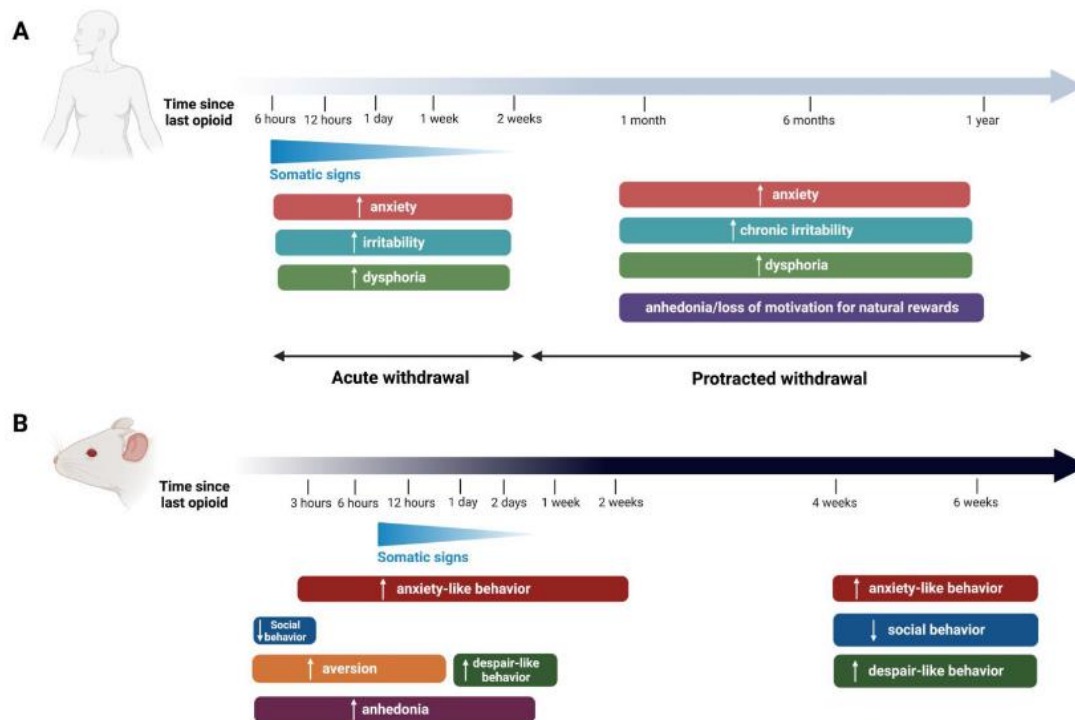


Figure 42 | Schéma chronologique comparatif des symptômes négatifs induits par le sevrage aigu et prolongé aux opioïdes chez l'Homme (A) et les rongeurs (B).

(A) La phase aiguë correspond à la période qui s'écoule jusqu'à la résolution des signes somatiques induits par le sevrage spontané (allant de 6 heures à 2 semaines chez l'Homme). Une anxiété élevée figure parmi les signes couramment signalés, notamment durant la phase aiguë, et qui peut être modulée pendant la phase d'abstinence prolongée. Une irritabilité accrue est également observée pendant la phase aiguë, ainsi qu'une irritabilité chronique pendant la phase prolongée. En revanche, la dysphorie peut être présente pendant les deux phases du sevrage. L'anhédonie et la perte de motivation pour les récompenses naturelles ont été décrites durant la phase prolongée. (B) Chez les rongeurs, les signes somatiques de sevrage débutent à 8 heures suivant la dernière administration et perdurent jusqu'à 80 heures. Des comportements anxieux ont été observés entre 3 heures et 6 jours suivant le début du sevrage. L'aversion a été notée dans les procédures de conditionnement contextuel associées au sevrage aigu précipité (0h) ou spontané (16h). Une anhédonie a également été relaté durant un sevrage précipité et jusqu'à 4 jours après la dernière administration. Enfin, une aversion sociale a été démontrée à la suite d'une abstinence aiguë (30 min) et prolongée (4 et 6 semaines). Des comportements de désespoir ont également été modélisés chez la souris dans les tests de nage forcée et de suspension de la queue pendant les phases de sevrage aigu (1 et 3 jours) et prolongé (4 et 7 semaines) (Ozdemir et al., 2023).

3. Implication du circuit de la récompense et de l'aversion dans le sevrage aux opioïdes

Hormis le rôle des multiples afférences reçues par le NAc sur la régulation de la récompense induite par la morphine, leur rôle dans la phase d'abstinence a également été mis en avant. En effet, il a été décrit que les projections PVT-NAc jouent un rôle clé dans l'apparition des signes physiques et dans la mémoire aversive induite par le sevrage aux opioïdes (Zhu et al., 2016). Une étude a montré que l'exposition chronique à des doses croissantes de morphine induisaient des comportements aversifs associés au sevrage à travers une potentialisation de la voie PVT-D2R-MSN du NAc. Il a été montré que la dépotentialisation de la voie PVT-NAc par optogénétique (voir **Chapitre 2-II**) restaure la transmission de ces synapses et supprime les comportements négatifs induits par un sevrage aux opioïdes précipité par la naloxone (Zhu et al., 2016).

De plus, il a été montré que l'inhibition des projections du PVT sur l'amygdale centrale (CeA) altère le développement de la CPP. Ainsi, l'activité PVT-CeA est impliquée dans l'association contexte-drogue

durant la CPP induite par la morphine. En revanche, l'inhibition de la voie PVT-NAc par chémogénétique durant l'acquisition n'altère pas la préférence lors du premier test, mais prévient la rechute observée sur des tests ultérieurs, et persiste pendant au moins 8 jours (Keyes et al., 2020). Le PVT est également impliqué dans la rechute à la consommation grâce à des projection indirectes sur l'hypothalamus latérale (LH) via le NAc (Keyes et al., 2020). Ces données suggèrent l'importance du PVT dans l'acquisition et le maintien des souvenirs associés à la consommation d'opioïdes. Outre le PVT, la LHb, qui code pour des stimuli aversifs (Chapitre 1), a également été impliquée dans les états émotionnels négatifs se produisant lors du sevrage aux opioïdes, notamment la morphine. Une altération de la transmission excitatrice de la LHb associée aux symptômes négatifs dans le contexte de la dépression et à l'addiction a été rapportée (Meyer et al., 2017). Dans un protocole de sevrage à la morphine précipité par la naloxone chez la souris, une réduction du ratio AMPA/NMDA induit par le sevrage a en effet été observée dans la MHb, sans altérer la libération présynaptique glutamatergique ni l'expression des NMDAR. Cette réduction perdure jusqu'à 30 jours dans le cas d'un sevrage spontané non précipité (Valentinova et al., 2019). D'autre part, le sevrage précipité induit une réduction de la préférence sociale chez la souris, qui fait partie des symptômes négatifs liés au sevrage, et qui est corrélée à une réduction du ratio AMPA/NMDA dans la MHb (Valentinova et al., 2019). Ces données suggèrent que la diminution de la force synaptique de la MHb prédit les déficits de sociabilité induits par le sevrage à la morphine. Les déficits de sociabilité induits par le sevrage chez la souris seraient également médiés par une activation des KOR en pré-synaptique au sein du NAc par la dynorphine libérée par les afférences 5-HT du RD, normalement libérée lors d'une interaction sociale (Pomrenze et al., 2022). Ainsi, l'action de la dynorphine via les KOR spécifiquement dans le NAc est un médiateur clé des déficits de sociabilité associés au sevrage. Ces données mettent en évidence le recrutement de structures cérébrales impliquées dans l'aversion, telles que le PVT, la LHb et le RD (Nagai et al., 2020), et leurs rôles dans les effets négatifs induits par un sevrage aux opioïdes.

IV. Différences et similitudes entre psychostimulants et opioïdes : focus sur le NAc

Même si les mécanismes d'action des substances addictives dans le cerveau diffèrent, elles provoquent toutes une libération de DA dans le NAc (Chapitre 1, Figure 8) (Chiara and Imperato, 1988) et déclenchent des altérations comportementales similaires et durables. La plupart des études visant à déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les comportements addictifs ont été réalisées en utilisant des psychostimulants (cocaïne et amphétamine majoritairement), alors que les mécanismes impliqués dans l'addiction aux opioïdes restent moins connus (Hearing et al., 2018).

Une hypothèse qui prévaut dans le domaine des addictions est qu'un déséquilibre de l'activité des D1R-MSN et des D2R-MSN au profit des D1R-MSN induit par les drogues contribue au développement des comportements addictifs (Lobo and Nestler, 2011; Salery et al., 2020). Dans ce paragraphe, nous allons voir que la cocaïne et la morphine, sont toutes deux capables d'induire ce déséquilibre de l'activité des deux sous-populations de MSN, mais que les mécanismes sous-jacents sont différents.

De nombreuses études, notamment du groupe de C. Lüscher, ont établi que l'exposition à la cocaïne entraîne une facilitation de la transmission glutamatergique sur les D1R-MSN par un mécanisme dépendant de la DA (pour revue, Salery et al., 2020). Cette facilitation prend place au niveau d'afférences glutamatergiques d'origines distinctes selon le type de comportement testé et les phases de comportements analysées, et repose sur l'insertion des AMPAR n'exprimant pas la sous-unité GluA2

au niveau de synapses spécifiques. Des approches optogénétiques, visant à empêcher cette modulation des projections glutamatergiques projetant sur les D1R-MSN par la cocaïne, ont permis d'établir un lien causal entre cette plasticité synaptique sélective des D1R-MSN et les réponses comportementales induites par cette drogue (Pascoli et al., 2018, 2014, 2012). À l'inverse, la transmission glutamatergique des D2R-MSN ne semble pas être impactée, à l'exception de souris soumises à un protocole d'auto-administration d'une forte dose de cocaïne qui produit une incubation du « craving » (Terrier et al., 2016).

Dans le cas de la morphine, le groupe de Y. Dong a montré que, lors d'un sevrage à la morphine, une augmentation des synapses silencieuses était observable au niveau des D2R-MSN. Il a été établi que l'augmentation du nombre de ces synapses était liée à une internalisation accrue des AMPAR, associée à une diminution de la densité en épines dendritiques dans cette population de MSN. Un lien causal a pu également être établi entre cette internalisation des récepteurs AMPAR dans les D2R-MSN et les réponses comportementales durables induites par la morphine (Graziane et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats montre donc que la cocaïne et la morphine sont toutes deux capables d'induire un déséquilibre de l'activité des D1R-MSN et D2R-MSN au profit des D1R-MSN. La cocaïne induit un tel déséquilibre en augmentant l'activité des D1R-MSN alors que la morphine va diminuer l'activité des D2R-MSN. Ainsi, les psychostimulants et les opioïdes ont des mécanismes d'actions différents et impliquent des sous-circuits qui se chevauchent pour promouvoir les comportements addictifs (Badiani et al., 2011; Crummy et al., 2020), bien que les adaptations comportementales soient similaires, révélant la difficulté de trouver une stratégie thérapeutique commune.

V. Lien entre le circuit de la récompense et l'analgésie induite par les opioïdes

1. Les douleurs chroniques

Outre le besoin d'analgésique pour traiter la douleur dans le cas d'accident ou suite à une opération, les opioïdes peuvent être utilisés dans le cas de douleur pathologique chronique. À l'heure actuelle, 20 % de la population mondiale est atteinte de douleur chronique (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators, 2015). Les patients souffrant de maladies incurables ont également une charge émotionnelle importante, combinée à la perspective de vivre avec une douleur et une souffrance quotidienne, pouvant être invalidante. Cela peut conduire à des troubles mentaux (Gilam et al., 2020) voir même le suicide de ces patients (Calati et al., 2015). C'est pourquoi la douleur est définie comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle » par l'*International Association for the Study of Pain (IASP)* (Mercer Lindsay et al., 2021; Mitsi and Zachariou, 2016). L'hyperalgésie et l'allodynie sont deux des principales caractéristiques des douleurs chroniques, qui peuvent être identifiées grâce à des tests nociceptifs. L'hyperalgésie se caractérise par une sensibilité excessive à un stimulus nociceptif, c'est-à-dire manifester une réponse douloureuse exacerbée. Elle peut être primaire et résulter d'une sensibilisation périphérique au niveau de la lésion ou de la zone inflammatoire, ou secondaire et refléter une hyperexcitabilité centrale en dehors de cette zone. À l'inverse, l'allodynie est une sensation douloureuse déclenchée par un stimulus non-nociceptif, qui ne devrait pas provoquer de douleur.

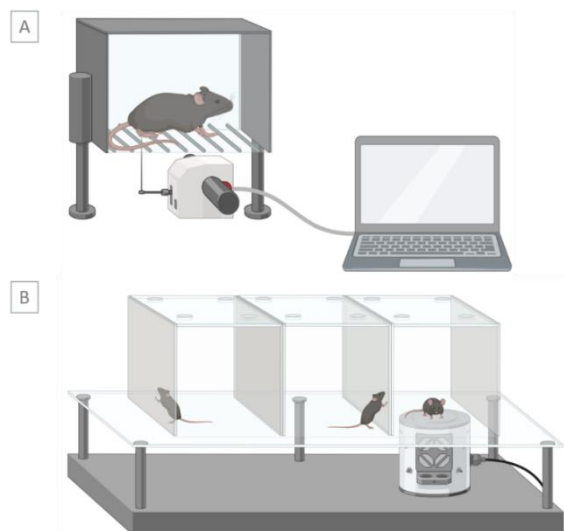
La majorité des études fondamentales et cliniques se focalisent sur la compréhension des mécanismes et les cibles du système nerveux périphérique (SNP), ainsi que sur la recherche d'analgésiques

efficaces. Une grande partie de nos connaissances sur les mécanismes de la douleur chronique concerne des études sur les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière ou la voie modulatrice descendante classique, qui implique des neurones du tronc cérébral et du mésencéphale (Mercer Lindsay et al., 2021; Mitsi and Zachariou, 2016). Le SNP détecte pour chaque organe une multitude de stimuli environnementaux ainsi que les potentiels dysfonctionnements internes à travers des récepteurs de la douleur, appelés les nocicepteurs. Ces récepteurs sont de plusieurs types, certains sont sensibles à la température, d'autres à la pression mécanique ou encore à une lésion, etc. Une fois qu'un nocicepteur est activé, il génère un signal électrique transmis le long des fibres nerveuses nociceptives vers la moelle épinière, qui peut transmettre l'information nociceptive à d'autres neurones pour moduler ou amplifier la douleur. À ce stade, des réflexes de retrait involontaires peuvent apparaître. Les signaux de douleur qui ne sont pas traités au sein de la moelle épinière sont transmis vers le cerveau, à travers le tronc cérébral, c'est ce qu'on appelle la transmission ascendante. Le cerveau intègre l'intensité et la localisation de la douleur, et en fonction, peut déclencher diverses réponses physiologiques, émotionnelles, et comportementales.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la nociception périphérique sont variés et complexes. Cependant, le ciblage des nocicepteurs pour traiter certains types de douleurs peut être très compliqué. En effet, chaque type de douleur nécessite un traitement spécifique. De plus, il est difficile de reproduire chez l'animal en laboratoire ces douleurs chroniques retrouvées chez les humains, telles que la lombalgie. Parmi les tests les plus couramment employés chez le rongeur, on retrouve principalement le test de sensibilité tactile grâce à des monofilaments de Von Frey et le test plantaire ou Hargreaves (Figure 43), qui permettent d'étudier la sensibilité à un stimulus dit douloureux ou tout du moins désagréable. Ils permettent en outre d'évaluer l'hyperalgésie, l'allodynie et l'hypoalgésie mécaniques et thermiques dans la recherche sur la douleur et de participer à la compréhension des mécanismes sous-jacents. De plus, il est de plus en plus reconnu que différentes douleurs peuvent coexister, ce qui complique davantage le ciblage des processus biologiques périphériques pour chaque type de douleur (Mercer Lindsay et al., 2021).

Figure 43 | Représentation schématique de protocoles d'évaluation de la sensibilité à la douleur chez le rongeur.

(A) Le test de Von Frey consiste à présenter un stimulus ponctuel à l'aide d'un monofilament flexible, généralement à l'extrémité de la patte de l'animal sur la surface plantaire, et enregistrer à quelle intensité de la stimulation un réflexe de retrait se produit. Cela permet de définir le seuil de Von Frey qui mesure ainsi le moment où l'animal prend conscience de la présence d'un stimulus mécanique. (B) Le test de Hargreaves est un test thermique où un stimulus infrarouge ou chauffant nocif est appliqué indirectement à travers un plancher en verre solide sur la face interne de la patte, afin de mesurer le seuil nociceptif de l'animal en fonction du moment où il retire sa patte de la source de chaleur. Schéma réalisé avec BioRender.



2. Implications du NAc dans la perception de la douleur

Des données récentes suggèrent que le circuit DAergique du mésencéphale joue un rôle important dans la modulation de la perception de la douleur, mais également dans l'apparition de l'anxiété et de la dépression comorbides induites par la douleur. Il a été montré que les douleurs chroniques entraînent des altérations de la plasticité neuronale et de la connectivité fonctionnelle dans différentes parties du cerveau liées au système de récompense, notamment le NAc, la VTA et le PFC (Baliki and Apkarian, 2015; Le Magnen et al., 1980; Mitsi and Zachariou, 2016; Oluigbo et al., 2012).

En effet, un dysfonctionnement des régions DAergiques mésolimbiques, telles que le striatum et la VTA, entraînent une douleur excessive (Saadé et al., 1997). Plusieurs pathologies associées à une transmission DAergique aberrante sont comorbides avec la douleur chronique, y compris la maladie de Parkinson (Sophie and Ford, 2012), l'addiction et la dépression (Jarcho et al., 2012). Les douleurs dorsales chroniques entraînent une augmentation de l'activité dans le PFC qui est fortement liée à l'intensité de la douleur (Baliki et al., 2006). De plus, la connectivité fonctionnelle du PFC vers le NAc est plus forte lors de douleur dorsale chronique (Baliki et al., 2010), suggérant que la force de la connectivité entre le PFC et le NAc est proportionnelle à l'ampleur de la douleur. Les modèles de douleur neuropathique chez les rongeurs révèlent également des changements dans la connectivité fonctionnelle du NAc avec le striatum dorsal et le PFC médian et orbital (Chang et al., 2014). Ces données montrent que les douleurs chroniques ne modifient pas seulement l'activité neuronale, mais également la connectivité au sein de structures appartenant au circuit de la récompense. Ce circuit est influencé par diverses entrées venant du système limbique et du cortex, qui jouent un rôle dans la mémorisation des expériences passées, des valeurs, des attentes et de la saillance des stimuli (Baliki and Apkarian, 2015). De plus, ces données aident à comprendre pourquoi la sensibilité à la douleur varie d'une personne à l'autre, et mettent en lumière l'impact des facteurs environnementaux et des maladies neurologiques sur les réponses aux stimuli douloureux. Par ailleurs, le cortex moteur primaire, qui est impliqué dans le contrôle volontaire du mouvement, a montré une implication dans la modulation de la douleur chez l'Homme (Frot et al., 2013) et chez la souris, notamment à travers sa connexion avec le NAc via le thalamus médio-dorsal (Gan et al., 2022).

Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 1 (II-2)**, les neurones DAergiques de la VTA codent pour des stimuli à la fois récompensants et aversifs (**Figure 6**) (Brischoux et al., 2009; Ungless et al., 2004), mais il existe également des différences en fonction de la région du NAc ciblée par la VTA, comme vu dans le **Chapitre 2**. Une étude effectuant une microdialyse dans le NAc chez le rat a montré qu'immédiatement après l'arrêt d'un choc à la patte (*footshock*), les niveaux de DA extracellulaire étaient augmentés dans le shell du NAc, sans changement dans le core (Kalivas and Duffy, 1995). Les mêmes observations ont été faites dans le cas d'un stimulus nocif thermique aigu (Becerra et al., 2001). Ces données rappellent que la douleur est un stimulus aversif, tandis que le soulagement de la douleur est un stimulus gratifiant. La motivation à éviter la douleur et à chercher à la soulager est générée par les efférences DAergiques de la VTA et de la SNc, en particulier vers le NAc, pour susciter un renforcement négatif du comportement (De Felice et al., 2013; Kim, 2013).

De plus, il a été montré qu'une lésion (ligature nerf spinal) augmentait la chimiokine CCL2, qui cible le récepteur CCR2 localisé dans les D1R- et D2R-MSN du NAc, et provoquait des comportements nociceptifs et dépressifs chez la souris. Ces comportements ont été abolis à la suite de l'inhibition de CCR2 dans le NAc par un lentivirus. De manière intéressante, les données électrophysiologiques de

cette étude ont montré que la ligature entraînait une augmentation des courants calciques NMDAR dans les MSN du NAc shell induite par une stimulation du PFC, et que l'inhibition du CCR2 par shRNA réduisait ces courants préférentiellement dans les NMDAR contenant la sous-unité GluN2B. Plus précisément, ils ont montré une co-localisation entre GluN2B et CCR2. Ils ont observé également que la lésion de CCR2 provoquait la phosphorylation de GluN2B, accompagnée d'une activation de ERK dans le NAc. Enfin, il a été établi que l'injection dans le shell du NAc d'un antagoniste de GluN2B ou d'un inhibiteur de la voie ERK empêchait l'hypersensibilité à la douleur et les comportements dépressifs induits par la ligature (Wu et al., 2018). Une autre étude a montré une augmentation sélective de l'excitabilité des D2R-MSN dans un modèle murin de douleur neuropathique induite par une lésion nerveuse provoquant une allodynie mécanique exacerbée. En outre, l'allodynie a été abolie suite à l'inhibition des D2R-MSN, révélant le rôle de ces neurones dans la représentation centrale de la douleur et l'activité des voies nociceptives ascendantes (Ren et al., 2016). Ces données sont corrélées avec une augmentation de l'expression de différentes protéines présynaptiques et kinases associées à une augmentation de la libération de glutamate à la suite d'une lésion nerveuse, dont ERK et CaMKII (Hung et al., 2014). Une étude plus récente a montré une diminution de l'activation de la protéine $G_{i/o}$ couplée au D2R, ainsi que la diminution de l'expression de D2L, spécifiquement dans le core du NAc et la VTA, chez des rats injectés en intra-plantaires pendant 14 jours avec de la formaline. La formaline produit une nécrose locale et correspond à un modèle de neuropathie chez le rat qui persiste pendant deux semaines. À l'inverse, cette étude a montré une diminution de l'activité de l'AC stimulée par D1R dans le core du NAc uniquement, sans altération de l'expression des D1R (Selley et al., 2020). En résumé, de nombreuses études mettent en évidence l'importance du circuit de la récompense et notamment des MSN, ainsi que des NMDAR, dans la modulation de la perception de la douleur.

Toutefois, il existe très peu d'informations sur les actions des analgésiques opioïdes dans le circuit cérébral de la récompense en cas de douleur chronique. L'une des premières études a montré que l'infusion d'un antagoniste sélectif des MOR, le méthylaltréxone, dans la VTA empêche les effets analgésiques de la morphine dans le modèle de la formaline chez le rat (Altier and Stewart, 1996). De plus, l'infusion d'un analogue de la substance P ou de morphine dans la VTA provoque une analgésie, qui est bloquée par l'infusion d'antagoniste spécifique des DAR (raclopride ou SCH23390) dans le NAc (Altier and Stewart, 1998). Ces données suggèrent l'importance du système DAergique mésolimbique dans l'inhibition tonique de la douleur chez l'animal. Ce circuit a également été impliqué dans le cas de douleurs dorsales chroniques chez l'Homme grâce à l'imagerie TEP et l'utilisation de radioligand sélectif des D2R/D3R. Plus précisément, cette étude a mesuré la disponibilité des récepteurs (potentiel de liaison) et de la libération de DA. Ils ont constaté une plus faible libération de DA associée à une activation de la neurotransmission DA D2R/D3R dans le NAc au moment de la douleur (Martikainen et al., 2015). De plus, la réponse anti-nociceptive ascendante induite par l'injection aiguë de capsaïcine dans la patte antérieure gauche chez le rat est bloquée par l'application d'antagonistes des MOR dans le NAc, suggérant l'importance du NAc dans les voies modulatrices ascendantes. L'injection d'agoniste des MOR dans le NAc supprime également l'hyperalgésie mécanique induite par des injections répétées de prostaglandine E2 dans la patte arrière (Miranda et al., 2015). Ces données suggèrent qu'une interaction entre la DA et le système opioïde endogène est impliquée dans la physiopathologie ainsi que dans le traitement de la douleur.

Pour finir, nous savons que la morphine a un effet analgésique puissant et efficace sur différents types de douleurs, ce qui explique son utilisation répandue aujourd'hui. Cependant, l'utilisation à long terme de la morphine peut entraîner une tolérance, limitant son application clinique. Les mécanismes complexes qui sous-tendent l'évolution de l'analgésie induite par la morphine vers la tolérance impliquent de multiples régions dans le cerveau, notamment la VTA. Des études montrent que les DAR et les récepteurs aux opioïdes participent à la tolérance à la morphine par le biais de l'altération des activités des neurones DAergiques et/ou non-DAergiques dans la VTA. Plusieurs circuits neuronaux liés à la VTA sont également impliqués dans la régulation de l'analgésie morphinique et le développement de la tolérance à la drogue, dont le NAc. L'examen des cibles cellulaires et moléculaires spécifiques et des circuits neuronaux associés peut fournir de nouvelles stratégies de précaution pour la tolérance à la morphine (Wang, 2019). Cette tolérance nécessite d'augmenter les doses d'analgésiques pour soulager la douleur. Il convient toutefois de prendre en compte que l'arrêt de traitement de type opioïdes peut entraîner des symptômes de sevrage parfois difficile à gérer.

Nous avons montré que cibler les hétéromères DAR-NMDAR permettait de contrecarrer les effets de la cocaïne sur la plasticité synaptique et structurale induite au niveau des D1R-MSN, ainsi que les propriétés renforçantes de cette drogue (Andrianarivelo et al., 2021). Aux vues de tous les points communs entre l'addiction aux psychostimulants et aux opioïdes, et malgré des mécanismes d'action différents sur l'activité des MSN, l'une des hypothèses de ma thèse a été de déterminer si l'implication des hétéromères DAR-NMDAR dans le développement et le maintien de l'addiction aux psychostimulants pouvait être également applicable à l'addiction aux opioïdes, incluant l'ensemble de ses aspects comprenant les propriétés addictives, les symptômes de manques liés au sevrage et l'analgésie (voir **Résultats partie II**).

Chapitre 4 : La dépression

I. Les comorbidités entre l'addiction et les désordres mentaux liés au stress

Ces dernières années, il a été mis en évidence que les psychoses et les troubles associés à l'abus de substance (SUD) étaient intimement liés. L'apparition de ces troubles mentaux coïncide et favorise l'apparition de la pathologie concomitante. D'après l'*Institut National de l'Abus des Drogues* (NIDA), la notion de comorbidité se définit par la présence de deux ou plusieurs troubles ou maladies survenant chez la même personne. Ils peuvent survenir simultanément ou l'un après l'autre. La comorbidité implique également des interactions entre les maladies qui peuvent aggraver l'évolution des deux pathologies concernées ([National Institute on Drug Abuse, 2018](#)).

Les études épidémiologiques indiquent que les personnes souffrant d'un type de trouble mental ont un risque accru de développer ultérieurement d'autres types de troubles mentaux ([McGrath et al., 2020](#)). En outre, ces études ont montré que les maladies psychiatriques, incluant les désordres mentaux (schizophrénie, dépression etc) et les désordres liés à l'abus de substance (addiction), sont communes chez l'adulte et l'adolescent, et hautement comorbides ([Kelly and Daley, 2013](#)). Plus précisément, en 2005, la proportion de personnes souffrant d'au moins un trouble psychiatrique était de 27 % contre 47 % de personnes souffrant de deux ou plus troubles psychiatriques ([Kessler et al., 2005](#)). En 2018, près de 7,7 millions d'adultes souffraient à la fois de troubles mentaux et de SUD, sans savoir si l'un était à l'origine de l'autre et lequel s'était manifesté en premier. Toutefois, sur une population de 20,3 millions de personnes souffrant de SUD, 37,9% présentaient également une maladie mentale. À l'inverse, parmi les 42,1 millions de personnes atteintes de maladies mentales, 18,2% d'entre elles présentaient un trouble lié à la consommation de substance ([National Institute on Drug Abuse, 2018](#)).

Les patients atteints de comorbidités, contrairement à ceux souffrant d'un seul trouble, possèdent une augmentation des comportements à risque, avec des conséquences néfastes pour le patient lui-même et pour la société ([Greenberg and Rosenheck, 2014](#); [Langås et al., 2011](#); [Quello et al., 2005](#)). Les personnes souffrant de troubles de l'humeur sont environ 4 fois plus susceptibles de mourir d'une overdose, notamment due aux opioïdes ([Brady et al., 2017](#)). Cela est malheureusement évident à la lumière de l'épidémie d'opioïdes qui a touché et touche encore les États-Unis, où l'abus d'opioïdes est fortement associé à la dépression majeure et fait chuter l'espérance de vie à son niveau le plus bas par rapport aux dernières décennies ([Rosoff et al., 2021](#)).

La présence de comorbidité est parfois sous-estimée et peu traitée dans son ensemble, même si l'on sait qu'une rechute provoque un important niveau de stress, et inversement ([Ross and Peselow, 2012](#)). Ces données suggèrent que le diagnostic des comorbidités est la clé pour traiter chacune de ces pathologies et révèlent la nécessité de trouver des thérapies ciblant plusieurs pathologies psychiatriques ([Kelly and Daley, 2013](#); [Ross and Peselow, 2012](#)). Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les troubles de l'humeur et des SUD comorbides afin de guider et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. L'*Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies* (EMCDDA) souligne dans son rapport de 2016 que la présence de troubles de l'humeur associés aux SUD est également devenue une question importante dans la politique européenne en matière de drogues et de traitement, avec une préoccupation croissante concernant

la disponibilité des drogues, notamment des opioïdes (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2016).

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la forte co-occurrence des troubles de l'humeur et des SUD (Quello et al., 2005; Volkow, 2004). La comorbidité pourrait refléter des adaptations partagées au sein de systèmes cérébraux qui se chevauchent, ce qui expliquerait que certaines approches comme par exemple les stimulations cérébrales profondes au niveau du NAc ont un effet thérapeutique pour l'addiction et la dépression résistante au traitement (Bewernick et al., 2010; Pierce and Vassoler, 2013).

Il est important de noter que, tout comme les substances addictives, des défaites sociales répétées induisent un phénotype de type dépressif chez la souris (voir Chapitre 4-V-2), et conduisent à une augmentation des niveaux de DA dans le striatum et le NAc (voir Chapitre 4-VI-2) (Barik et al., 2013; Tidey and Miczek, 1996). Comme dans les modèles précliniques d'addiction, ces changements de niveaux de DA induits par le stress chronique peuvent moduler de façon persistante la transmission du glutamate sur les MSN (Christoffel et al., 2015; Nicola et al., 2000), déclenchant ainsi des adaptations pathologiques.

Les rôles distincts des deux populations de MSN dans les comportements liés à la récompense font l'objet d'un débat intense (Salery et al., 2020; Soares-Cunha et al., 2020, 2020). Une hypothèse dominante est que l'augmentation de la DA provoquée par la cocaïne stimule le D1R et active les D1R-MSN, ce qui favorise le renforcement. En revanche, l'inhibition des D2R-MSN médiée par le D2R empêche leur action anti-récompense. Cela explique pourquoi une valeur de récompense élevée d'un stimulus est atteinte lorsque le D1R et le D2R sont tous les deux stimulés. Bien que les mécanismes qui sous-tendent l'impact de la morphine sur le NAc soient différents de ceux de la cocaïne, puisqu'ils impliquent principalement des adaptations cellulaires atténuant l'activité des D2R-MSN (Graziane et al., 2016), le changement net induit par les deux classes de médicaments est une dominance de la voie D1R-MSN par rapport à la voie D2R-MSN (Graziane et al., 2016). Ce type de déséquilibre entre voie D1R- et D2R-MSN semble aussi être mis en jeu dans des modèles précliniques de dépression, suite à des défaites sociales répétées chez la souris par exemple, fournissant ainsi des mécanismes et des substrats cérébraux communs contribuant potentiellement à la forte comorbidité entre les différents troubles psychiatriques (Fox and Lobo, 2019; Volkow et al., 2013).

II. Définition, épidémiologie et enjeux sociétaux de la dépression

La dépression (ou dépression majeure) est une maladie psychiatrique qui touche 280 millions de personnes dans le monde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2023 avec une estimation de 1 personne sur 5 qui a souffert ou qui souffrira au moins une fois au cours de sa vie de cette maladie en France. D'après l'OMS, plus de 700 000 personnes meurent chaque année par suicide à cause de la dépression et 200 000 ont fait une tentative. On comptabilise environ 9 000 décès/an en France, ce qui représente l'un des taux les plus élevés d'Europe (Ortiz et al., 2023). Le suicide est la quatrième cause de mortalité chez les 15-29 ans. Comme pour l'addiction (Chapitre 1), le diagnostic de la dépression répond à 9 critères définis par le DSM-V et le CIM-10 (Box 2) (Nestler et al., 2002).

Box 2 | Les 9 symptômes caractéristiques de la dépression définis par le DSM-V et le CIM-10

Pour diagnostiquer une dépression, le patient doit présenter au moins 5 de ces symptômes, presque tous les jours, depuis au moins deux semaines, dont obligatoirement l'un des deux premiers de la liste ci-dessous :

- Une tristesse quasi-permanente, avec parfois des pleurs (humeur dépressive)
- Une perte d'intérêt et du plaisir à l'égard des activités quotidiennes, même celles habituellement plaisantes (anhédonie)
- Un sentiment de dévalorisation et de culpabilité excessif ou inapproprié
- Des idées de mort ou de suicide récurrentes, le sentiment que la vie ne vaut pas la peine d'être vécue
- Un ralentissement psychomoteur
- Une fatigue (asthénie), souvent dès le matin
- Une perte d'appétit, souvent associée à une perte de poids
- Des troubles du sommeil avec en particulier des insomnies matinales
- Des difficultés attentionnelles, de concentration et de mémorisation

Si les patients présentent entre 5 et 7 de ces symptômes, la dépression est décrite comme légère à modérée. En revanche, si plus de 8 symptômes sont présents, elle est considérée comme sévère.

Ainsi, la dépression se traduit par une perte de plaisir ou d'intérêt pour les activités plaisantes pendant de longues périodes. Elle est associée à la chronicité, à la rechute et à la récurrence des symptômes. Elle est généralement traitée par des interventions comportementales ou pharmacologiques, ou par une combinaison des deux (Ortiz et al., 2023).

De plus, d'après l'OMS, la prévalence de cette maladie est deux fois plus élevée chez les femmes comparées aux hommes. Dans le monde, plus de 10 % des femmes enceintes et des femmes qui viennent d'accoucher souffrent de dépression. Ces données suggèrent qu'il existe des différences liées au sexe de l'individu dans les circuits neuronaux. Malgré ce décalage évident entre les sexes, la majorité des recherches pré-cliniques notamment chez le rongeur ont été menées sur des mâles (Lopez and Bagot, 2021; Ortiz et al., 2022; Thériault et al., 2021).

Selon l'*Organisation de coopération et de développement économique* (OCDE), les troubles liés à la santé mentale engendrent un coût de 80 milliards d'euros annuels en France et environ 600 milliards d'euros en Europe rien qu'en 2018. L'impact économique de ces troubles ne cesse d'augmenter, notamment depuis la pandémie de la COVID-19. En effet, la crise sanitaire de la COVID-19 a eu un impact majeur sur les individus vulnérables souffrant d'anxiété, de dépression, ou de syndrome de stress post-traumatique (PTSD). Dès le printemps 2020, de nombreuses alertes ont été lancées par des professionnels de santé, révélant une hausse générale entre 2019 et 2020 de la prévalence des troubles psychiques, en particulier chez les enfants et les jeunes adultes. D'après un rapport de 2021 réalisé par la *Direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques* (DREES), 22 % des jeunes entre 15 et 24 ans présentaient un syndrome dépressif en mai 2020 suite au premier confinement, contre 10 % en 2019. L'émergence de ces syndromes dépressifs durant la crise sanitaire est notamment liée aux difficultés économiques, à l'état de santé et aux possibles tensions familiales, mais également aux conséquences de l'isolement social ainsi que du travail à la maison, augmentant la sédentarité et réduisant la frontière entre vie personnelle et vie professionnelle.

III. Facteurs de risques de la dépression

Les conséquences de cette crise sanitaire sur la santé mentale de la population suggèrent que les facteurs environnementaux favorisent le développement d'un syndrome dépressif. La réponse émotionnelle d'un individu suite à un stress aigu et grave (traumatisme, acte terroriste) ou un stress chronique (divorce, perte d'emploi, décès, trouble hormonal) peut être déterminée, en plus des facteurs environnementaux, par des facteurs génétiques (Krishnan et al., 2007; Nestler et al., 2002). Ainsi, des études d'association pangénomiques (*Genome-wide association study*, GWAS ; *Genome-wide sequencing*, GWS) ont établi des corrélations entre certains polymorphismes et la dépression chez des patients (Shadrina et al., 2018). Cependant, nous ne pouvons ici parler que de prédisposition, la composante génétique étant polygénique et complexe. De plus, il faut également souligner qu'à l'instar d'autres pathologies psychiatriques, il existe une hétérogénéité inter-individuelle dans la physiopathologie des troubles dépressifs (Shadrina et al., 2018).

À ces prédispositions génétiques sont associés des facteurs environnementaux « déclencheurs ». D'après l'OMS, les personnes qui ont été victimes d'abus, de pertes graves ou d'autres événements stressants sont plus susceptibles de développer une dépression. De plus, le déroulement de ces expériences négatives pendant l'enfance ou l'adolescence augmente le risque de dépression à l'âge adulte (Fava and Kendler, 2000; Heim and Nemeroff, 2001; Kelleher et al., 2008), et potentialise également les réponses comportementales induites par les psychostimulants et les opiacés chez l'homme et les modèles animaux (Lu et al., 2003; Sinha, 2009).

Ainsi, le terrain familial génétique et la vulnérabilité induite au cours d'événements traumatisants ou stressants sont des facteurs qui augmentent le risque de souffrir de dépression ou de trouble anxieux (Fava and Kendler, 2000; Heim and Nemeroff, 2001; Nestler et al., 2002). Il est en revanche important de noter que la majorité des personnes exposées à des événements stressants ne développent pas forcément des signes cliniques de dépression (Krishnan et al., 2007; Yehuda, 2004), bien que les mécanismes qui sous-tendent cette « résilience » ne soient pas encore élucidés.

IV. Traitements actuels et nouvelles approches

D'après l'OMS, bien qu'il existe des traitements pour les troubles mentaux, plus de 75 % des personnes vivant dans des pays à faibles revenus ne reçoivent pas encore de traitement. De plus, jusqu'à 30 % des patients souffrant de dépression sont résistants aux traitements mis en place à ce jour. Malgré la différence de vulnérabilité à la dépression entre les femmes et les hommes, la plupart des recherches précliniques ont été réalisées sur des modèles mâles, ce qui a entravé le développement de traitement efficace contre la dépression chez les femmes (Ortiz et al., 2022).

Les antidépresseurs basés sur les monoamines comme des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la norépinephrine (fluoxétine, imipramine ou venlafaxine) (Berton et al., 2006; Muscat et al., 1992; Papp et al., 2023), sont à ce jour couramment utilisés pour traiter la dépression. Chez le rongeur, ils diminuent classiquement la résignation dans les tests de nage forcée (FST) et de suspension de la queue (TST) (voir **Chapitre 4-V-1**), et ils améliorent l'interaction sociale chez les animaux présentant un phénotype dépressif suite à un stress chronique (voir **Chapitre 2-V-2**) (Berton et al., 2006). Toutefois, ces traitements possèdent des délais importants entre le traitement et les effets thérapeutiques, et une large proportion de patients demeurent résistants (Ortiz et al., 2023).

En quête de nouvelles molécules aux propriétés antidépressives, des études récentes indiquent que des modulateurs du système glutamatergique produiraient un effet antidépresseur plus rapide et plus soutenu que les antidépresseurs classiques modulant les systèmes monoaminergiques (Pałucha-Poniewiera and Pilc, 2016). En effet, les NMDAR occupent un rôle central dans les mécanismes liés à la dépression. De nombreuses études précliniques ont mis en évidence le rôle antidépresseur des antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA (MK-801, kétamine, PCP, ACPC (acide 1-aminocyclopropanecarboxylique) ou encore CGP37849) dans des modèles animaux de dépression (Ortiz et al., 2023; Papp and Moryl, 1994). La concentration de D-sérine, un co-agoniste des NMDAR, se trouve diminuée dans le NAc de souris présentant un phénotype dépressif lors d'un protocole de stress chronique (voir Chapitre 2-V-2). L'injection de D-sérine dans le NAc a présenté des effets antidépresseurs en régulant la plasticité synaptique dans le NAc à travers les NMDAR (Chen et al., 2021).

Un problème majeur dans l'utilisation des modulateurs du système glutamatergique est le risque d'abus lors d'administrations répétées ainsi que les hallucinations, la somnolence voire le coma (Ortiz et al., 2023; Papp and Moryl, 1994; Zanos et al., 2016b). Malgré ces effets secondaires importants, la kétamine agit très rapidement et son effet antidépresseur perdure jusqu'à une semaine. La kétamine est un antagoniste non-compétitif des NMDAR qui se lie sur un site spécifique du récepteur réduisant l'afflux d'ions Ca^{2+} au travers des canaux, affectant ainsi l'excitabilité neuronale et l'activité des réseaux cérébraux. Elle est également utilisée à des fins récréatives pour ses effets dissociatifs et hallucinogènes, provoquant d'importants effets indésirables tels que des troubles cognitifs, des hallucinations et même des déficits cognitifs durables (Ates-Alagoz and Adejare, 2013; Ballard and Zarate, 2020; Cichon et al., 2023; Colla et al., 2021; Zanos et al., 2016b). En plus d'être un antagoniste des NMDAR, la kétamine, sous son usage récréatif addictif, agit sur les MOR et les KOR pour les activer et entraîner un comportement d'auto-administration chez le rat via l'activation du NAc. L'administration de naltrexone, qui inhibe ces récepteurs, permet de prévenir ce comportement, révélant que l'usage abusif de la kétamine semble agir via les récepteurs aux opioïdes (Levinstein et al., 2022).

Le NAc serait particulièrement impliqué dans les effets antidépresseurs de la kétamine, avec notamment un rôle dans l'effet préventif sur l'anhédonie chez des souris soumises à un stress chronique. Une étude récente a montré que le stress chronique, induit par un traitement prolongé aux glucocorticoïdes, provoque une diminution de la force des synapses excitatrices, en provenance du PFC médial et de l'hippocampe ventrale, sur les D1R-MSN dans le NAc. Une seule injection de kétamine dans ce modèle permet de bloquer cet effet (Lucantonio et al., 2023). De plus, il semblerait que l'effet antidépresseur induit par la kétamine chez des souris adolescentes dépendrait de l'activité de la voie VTA-NAc (mais pas l'activité VTA-PFC) (Parise et al., 2021).

Des recherches sont en cours pour développer des médicaments plus sélectifs capables de reproduire les effets antidépresseurs de la kétamine sans ses effets secondaires. La FDA américaine a récemment autorisé l'énantiomère S de la kétamine (eskétamine) comme traitement pour les patients atteints de dépression majeure (Ballard and Zarate, 2020; Liu et al., 2023; Polis et al., 2019; Zanos et al., 2016b). D'autres analogues de la kétamine ou PCP ont été étudiés tels que le 4-F-PCP qui présente une structure similaire à la kétamine et qui possède également un effet antidépresseur en traitement aigu

ou chronique, sans effets secondaires observés chez la souris (effet cognitif) (Pałucha-Poniewiera and Pilc, 2016).

V. Modèles animaux pour étudier la dépression

1. Vue d'ensemble des modèles animaux

La relation entre le stress et la maladie est complexe et la sensibilité au stress varie d'une personne à l'autre, d'où la nécessité de comprendre dans quelle mesure le stress affecte les individus. En revanche, l'étude du stress chez les rongeurs est difficile car leur pensée n'est pas directement accessible. Il est donc primordial de trouver une mesure indirecte et objective telle que des critères comportementaux pour étudier les effets du stress liés aux troubles de l'humeur.

Ainsi, plusieurs composantes comportementales de la dépression peuvent être analysées chez les modèles rongeurs. En premier lieu, on peut étudier la résignation : l'animal peut être placé dans un environnement où il ne peut s'échapper comme dans le test de nage forcée (*Forced-Swim Test* ; FST) ou suspendu par la queue (*Tail-Suspension Test* ; TST). L'anhédonie, qui correspond à la perte de la capacité à ressentir du plaisir, peut être étudiée grâce au test de préférence au sucrose : l'animal est anhédonique lorsqu'il perd sa préférence pour le sucrose par rapport à l'eau. Enfin, la perte d'intérêt pour l'interaction sociale peut également être observée, grâce à des tests d'interaction sociale (SIT) (avec un nouveau congénère ou un congénère juvénile, par exemple).

Pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la dépression, il est possible d'utiliser des modèles animaux présentant un phénotype dépressif. Trois grands types de modèles peuvent être distingués :

- Les modèles génétiques d'une part : exemple rat Flinders, souris H/Rouen.
- Les modèles pharmacologiques : exemple traitements aux glucocorticoïdes.
- Les modèles environnementaux reposant sur des protocoles de stress chroniques :
 - La séparation maternelle provoque un stress précoce ou *early-life stress*, permettant d'étudier l'impact d'un stress lors de la phase de développement sur la phase adulte.
 - Le protocole de stress léger chronique imprévisible (*Unpredictable Chronic Mild Stress* ; UCMS).
 - Le protocole de stress chronique lié à la défaite sociale (*Chronic Social Defeat Stress* ; CSDS) que j'ai utilisé durant ma thèse et qui sera détaillé dans les parties suivantes.

2. Le stress chronique de défaite sociale

Le CSDS consiste à placer une souris expérimentale (dans notre cas de fond C57Bl/6) dans la cage d'un résident mâle CD1. Cela induit des comportements d'attaque de la part du résident qui est parfois désigné comme « agresseur ». Un point essentiel, pour ce test, l'agresseur est généralement plus âgé que la souris expérimentale et a servi au préalable de mâle reproducteur assurant ainsi un niveau élevé d'agressivité et une victoire assurée lors des confrontations avec les souris expérimentales. À la suite d'une défaite de 5 minutes, la souris expérimentale est maintenue pendant 24h dans la cage de l'agresseur, séparée par une barrière permettant un contact visuel et olfactif. Une nouvelle défaite par un nouvel agresseur aura lieu le lendemain et ceci pendant 10 jours d'affilés. Ces dernières années, ce paradigme a été adapté pour l'étude chez les femelles. Pour cela, l'urine de CD1 mâle est collectée et appliquée sur les parties génitales des femelles à agresser.

Ce protocole de stress (**Figure 44**) permet d'induire plusieurs changements comportementaux réminiscent de la dépression chez l'Homme. Ainsi, les souris ayant subi des défaites répétées montrent en moyenne une diminution de l'intérêt pour interagir avec d'autres souris, elles présentent également une anhédonie que l'on peut mesurer dans un test de préférence au sucrose, d'une anxiété accrue (mesurée dans un labyrinthe surélevé ou dans une tâche de boîte clair/obscur). Ces paramètres sont ceux que j'ai étudié durant ma thèse. Un point important, l'évitement social induit par ce stress est conservé plusieurs semaines après le CSDS, et peut être bloqué grâce à des traitements antidépresseurs (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Autre fait intéressant, les animaux soumis au CSDS peuvent être divisés en deux groupes. En effet, environ 2/3 des souris dites « susceptibles » vont présenter un intérêt moindre pour un congénère que pour un objet inanimé dans le test d'interaction sociale. À l'inverse, 1/3 des souris ayant subi le CSDS vont maintenir un intérêt pour une interaction sociale et sont dites « résilientes ». Un enjeu de la recherche dans laquelle s'inscrit ma thèse consiste à identifier des mécanismes favorisant la résilience dans ce modèle.

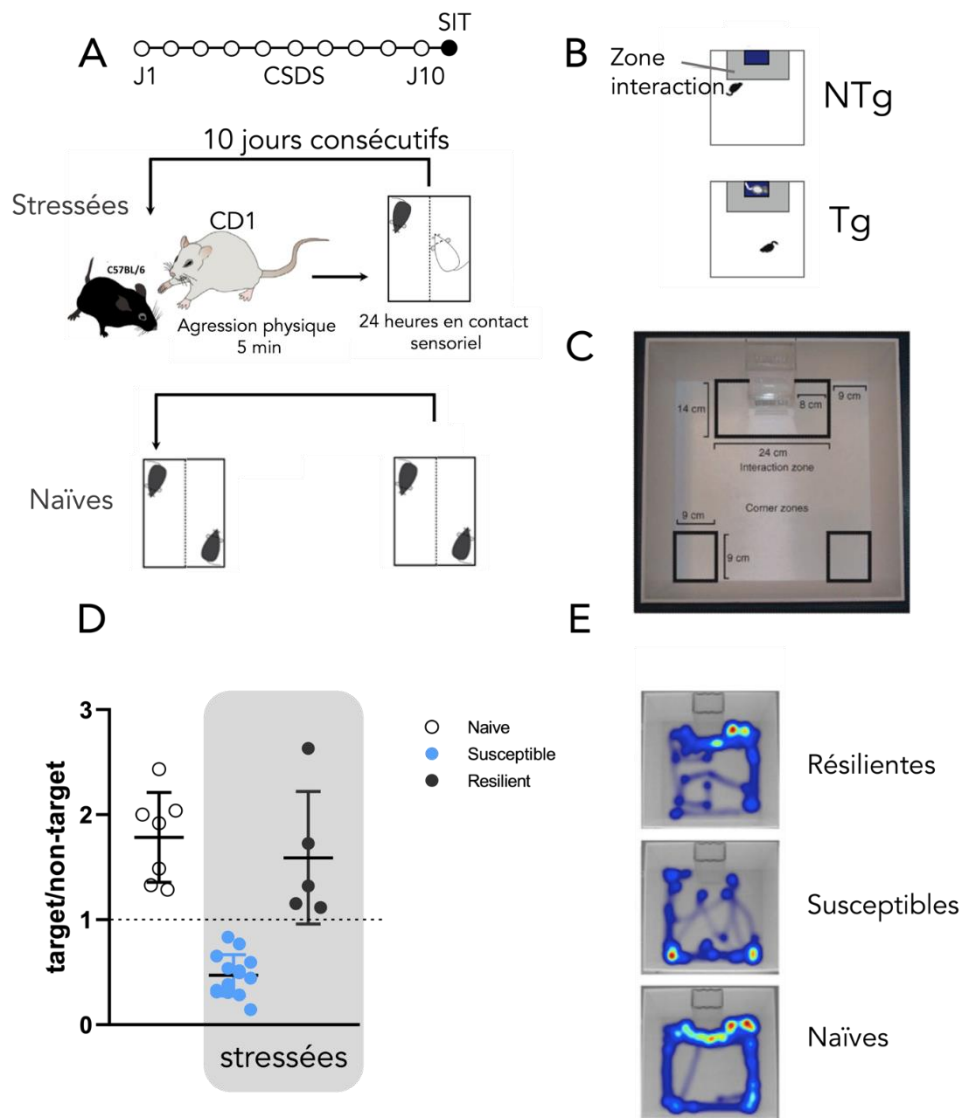


Figure 44 | Protocole de stress chronique lié à la défaite sociale (CSDS).

(A) Chronologie du paradigme de CSDS du jour 1 (J1) au jour 10 (J10), suivi d'un test d'interaction sociale (SIT) (panel du haut). Les souris dites stressées subissent 5 minutes d'agression physique par un agresseur mâle CD1

(blanc) puis sont confinées 24 heures en contact sensoriel dans la *homecage* de l'agresseur séparé par un plexiglas. Le jour suivant, les souris rencontrent un nouvel agresseur et cela pendant 10 jours (panel du milieu). Les souris contrôle naïves sont simplement placées deux par cage avec une autre souris naïves séparées par un plexiglas et sont intervertis chaque jour pendant 10 jours. Elles ne subissent aucune agression (panel du bas). (B) Lors du test d'interaction sociale au jour 11, chaque souris est placée dans un *openfield* dont les dimensions sont précisées en (C), en présence d'une boîte vide pendant 2 minutes 30 (*Non-target* ; NTg), puis en présence d'une CD1 inconnue à nouveau pendant 2 minutes 30 (*Target* ; Tg). (D) Le ratio d'interaction sociale est calculé en divisant le temps que la souris a passé dans la zone d'interaction sociale définie autour de la boîte en présence de la CD1, confinée, par rapport au temps passé dans cette même zone lorsque la boîte est vide : Tg/NTg . Lorsque le ratio est >1 , la souris passe plus de temps à interagir avec le congénère que la boîte vide, c'est le cas des souris naïves et les souris dites résilientes au stress (cercles blanc et noir respectivement). Lorsque ce ratio est <1 , les souris passent plus de temps dans la zone d'interaction lorsque la boîte est vide. Elles font de l'aversion sociale comme c'est le cas pour les souris susceptibles au stress (cercles bleu). (E) *Heatmap* représentatives du temps passé par chaque phénotype autour de la zone d'interaction sociale en présence d'un nouveau congénère.

VI. Dépression et circuit de la récompense

1. La susceptibilité et la résilience au stress

La susceptibilité et la résilience au stress sont deux concepts étroitement liés à la capacité d'un individu à faire face et à s'adapter aux défis de la vie. La résilience fait référence à la capacité de rebondir face à l'adversité et de maintenir son bien-être mental et émotionnel. Les personnes résilientes sont capables de gérer les facteurs de stress en adoptant une attitude positive et des stratégies d'adaptation efficaces. En revanche, la susceptibilité au stress fait référence à la vulnérabilité d'un individu aux effets négatifs du stress. Bien que la résilience et la susceptibilité au stress soient toutes deux influencées par une série de facteurs tels que la génétique, l'environnement et les expériences de vie, le développement de la résilience par le biais d'habitudes saines, d'un soutien social et d'un discours positif sur soi peut aider les individus à mieux gérer et à surmonter les facteurs de stress (Charney, 2004; Russo et al., 2012). De nombreuses études ont porté sur les mécanismes biologiques et neuronaux qui sous-tendent la résilience et la sensibilité au stress chez la souris, principalement dans le modèle de CSDS.

Nous avons vu précédemment que, suite au paradigme de CSDS, les souris stressées présentent un phénotype susceptible ou résilient, défini sur la capacité des animaux à continuer ou non de faire de la préférence sociale. Des caractéristiques plus complètes de ces deux sous-groupes sont détaillées dans cette étude (Krishnan et al., 2007). Un point intéressant à relever ici, seules les souris susceptibles au stress semblent montrer une CPP à de faibles doses de cocaïne (Krishnan et al., 2007; Tovar-Díaz et al., 2018), suggérant une vulnérabilité accrue dans la réponse aux drogues et un lien potentiel entre dépression et addiction.

a. Voies dopaminergiques

La libération phasique de DA par la VTA, connue pour coder les signaux de récompense (Grace et al., 2007; Schultz, 2010; Tsai et al., 2009) est également augmentée par le CSDS chez les souris susceptibles (Cao et al., 2010; Krishnan et al., 2007), et est complètement abolie par des traitements chroniques aux antidépresseurs comme la fluoxétine (Cao et al., 2010). De plus, l'augmentation artificielle de cette libération phasique par optogénétique facilite l'apparition du phénotype susceptible dans le paradigme de CSDS, et permet également de rendre susceptible des souris exprimant auparavant un phénotype résilient (Chaudhury et al., 2013).

Le CSDS induit une augmentation de l'anxiété chez la souris indépendamment du statut de résilience (Krishnan et al., 2007), suggérant l'existence de mécanismes neuronaux distincts entre les comportements de type anxieux et l'aversion sociale. L'utilisation de virus rétrogrades injectés dans la BLA et le NAc a permis d'observer des populations de neurones DAergiques relativement ségréguées projetant soit vers le NAc, soit vers l'amygdale. Alors que ces premiers ne sont pas impliqués dans le phénotype anxieux, l'inhibition de la voie VTA-Amygdale augmente l'anxiété (Morel et al., 2022; Nguyen et al., 2021). De plus, des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* de neurones DAergiques de la voie VTA-BLA ont montré une diminution de leur excitabilité aussi bien chez des souris susceptibles que résilientes, suggérant que le CSDS altère les propriétés intrinsèques dans les deux groupes (Morel et al., 2022).

Concernant l'interaction sociale, l'activation optogénétique de la voie VTA-NAc permet l'apparition du phénotype susceptible, tandis que son inhibition favorise la résilience (Chaudhury et al., 2013). En revanche, l'inhibition de la voie VTA-PFC médial favorise le phénotype susceptible, tandis que son activation optogénétique favorise la résilience (Covington et al., 2010). Ces données révèlent le rôle central de la VTA dans l'exposition au stress chronique avec un rôle opposant entre les voies VTA-NAc et VTA-PFC concernant l'interaction sociale et une implication de la voie VTA-Amygdale dans l'anxiété (Chaudhury et al., 2013; Friedman et al., 2014; Tye et al., 2013; Walsh et al., 2023).

De manière intéressante, une étude récente du comportement pendant le paradigme de CSDS a montré que les souris mâles qui adoptent une posture moins soumise pendant les agressions physiques présentent moins d'aversion sociale. Cela suggère qu'il existe des stratégies d'adaptations pour atténuer les effets du stress qui sont mises en place par la souris lors des agressions réalisées par la CD1, leur conférant une résilience au stress. En revanche, ces comportements ne sont pas associés à la résilience chez les femelles. De plus, les souris susceptibles éprouvent plus d'aversion lors de la rencontre avec l'agresseur et plus de soulagement lorsque la rencontre se termine. Ces résultats, observés par photométrie (DAT::GCaMP6f), sont associés à une augmentation des réponses du NAc au moment de la fuite ou de la fin de l'attaque par l'agresseur, contrairement aux souris résilientes dont la réponse du NAc augmente au moment de la riposte face à l'agresseur (Willmore et al., 2022). Ces données suggèrent un lien entre l'activité DAergique, la résilience et le comportement associé à la résilience pendant l'exposition au stress.

Enfin, il est important de noter que le stress chronique peut conduire à une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et à une libération excessive des hormones glucocorticoïdes (GC) (Shadrina et al., 2018) dont le récepteur (GR) est exprimé abondamment dans le cerveau, y compris dans le système mésocorticolimbique. L'utilisation de mutants conditionnels a permis de mieux comprendre le rôle du GR dans la modulation des comportements liés au stress. En effet, l'inactivation du GR dans l'ensemble du cerveau (souris GR^{NesCre}) provoque une baisse de l'activité spontanée des neurones DAergiques de la VTA. De plus, malgré des taux circulants de GC augmentés, ces souris présentent moins d'anxiété et moins de comportement de résignation lors du FST (Tronche et al., 1999; Ambroggi et al. 2009). De façon intéressante, l'effet de l'inactivation du GR cérébral sur l'activité des neurones DAergiques ne semble pas lié à une action directe au niveau des neurones DAergiques, mais à l'activation du GR au niveau post-synaptique. En effet, l'inactivation du GR dans les structures innervées par ces neurones chez les souris GR^{D1Cre} produit une diminution de l'activité des neurones DAergiques de la VTA similaire à celle observée chez les souris GR^{NesCre}. Cet effet est

probablement causé par une dérégulation du rétrocontrôle exercé par les D1R-MSNs au niveau de la VTA (Ambroggi et al., 2009; Parnaudeau et al., 2014). D'un point de vue comportemental, les souris GR^{D1Cre} ne présentent plus d'aversion sociale à la suite d'un CSDS et sont majoritairement résilientes. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité des neurones DAergiques induite par le CSDS est également supprimée dans ce modèle (Barik et al. 2013). De plus, les souris GR^{D1Cre} présentent également une diminution des réponses comportementales induites par la cocaïne et l'amphétamine (Barik et al., 2010; Parnaudeau et al., 2014), illustrant ainsi certaines similitudes dans les mécanismes sous-jacents aux comportements de type dépressif et addictif.

b. Les voies glutamatergiques innervant le NAc

En dehors des afférences DAergiques, les afférences glutamatergiques vers le NAc sont également modulées par le stress. Les souris résilientes au CSDS présentent une diminution de l'activité hippocampe-NAc et l'induction d'une LTD dans cette voie par optogénétique favorise la résilience. En revanche, la stimulation de cette voie produit l'effet inverse (Bagot et al., 2015). Par ailleurs, une augmentation de la transmission des afférences thalamiques excitatrices projetant sur le NAc a également été observée chez les souris susceptibles au CSDS, associée à une augmentation des ratio AMPA/NMDA (Christoffel et al., 2015).

c. Modification moléculaires et cellulaires des neurones du NAc

La littérature indique que l'exposition à un stress chronique augmente la densité et l'arborisation dendritique au sein de la VTA, du NAc (core et shell) et de l'amygdale chez les souris susceptibles, tandis qu'elle les diminue dans le PFC médial et l'hippocampe (gyrus denté et CA3) (Qu et al., 2018; Russo et al., 2012). Il a été montré qu'un stress chronique entraîne un remodelage synaptique au sein du NAc (Christoffel et al., 2011; Golden et al., 2013).

En effet, l'expression moléculaire, la plasticité synaptique ainsi que les changements de plasticité dans les MSN du NAc sont impliqués dans les symptômes induits par la dépression (Krishnan and Nestler, 2008; pour revue, Qiao et al., 2016). Contrairement aux drogues, peu d'études se sont intéressées à la régulation des D1R- et D2R-MSN en réponse au stress. En outre, les drogues et le stress sont capables de remodeler la plasticité synaptique en augmentant entre autres la densité en épines dendritiques au sein des MSN du NAc. Des analyses morphologiques réalisées chez des souris stressées ont démontré que les souris susceptibles au stress présentaient une augmentation de la densité en épines dans les D1R-MSN (Francis et al., 2017) et dans les D2R-MSN (Fox et al., 2020), associée à une fréquence accrue des courants postsynaptiques excitateurs miniatures (mEPSC) des MSN (Christoffel et al., 2011). En différenciant les deux sous-populations de MSN du NAc, il a été montré plus précisément que les D1R-MSN ont une fréquence réduite de mEPSC tandis que les D2R-MSN ont une fréquence accrue de mEPSC chez les souris susceptibles (Francis et al., 2015). Des analyses corrélatives entre la transmission excitatrice distincte des MSN et le ratio d'interaction sociale ont permis de révéler que la fréquence des mEPSC des D2R-MSN était négativement corrélée avec le temps d'interaction sociale, contrairement au cas des D1R-MSN pour lesquels aucune corrélation n'a pu être observée entre ces deux paramètres, suggérant que seul le changement de fréquence de décharge des D2R-MSN peut expliquer les résultats obtenus dans l'étude de Christoffel (Francis and Lobo, 2017). En revanche, les D1R-MSN présentent une corrélation positive entre le ratio d'interaction sociale et l'excitabilité intrinsèque, modulée uniquement dans les D1R-MSN (Francis and Lobo, 2017). L'activation des D1R-MSN via la stimulation optogénétique bloque l'aversion sociale, tandis que leur

inactivation pharmacogénétique a conféré une susceptibilité au stress. En revanche, la manipulation positive ou négative de l'activité des D2R-MSN n'a pas réussi à modifier les réponses comportementales induites par le CSDS (Francis et al., 2015). Ces différences de réactivité D1R-MSN et D2R-MSN ont également été observées en utilisant l'exposition à de légers chocs répétés du pied (Pignatelli et al., 2021). En parallèle, une étude a montré une réduction de marqueurs de la synapse inhibitrice (vGAT, le transporteur vésiculaire du GABA, et la géphyrine, une protéine d'échafaudage) dans le NAc de patients souffrant de dépression majeure non-traitée. Ils ont également montré une diminution de la fréquence des mini-courants postsynaptiques inhibiteurs (mIPSC) dans le NAc chez les souris susceptibles. Ces observations suggèrent une diminution du nombre de synapses inhibitrices dans le NAc, associé à un comportement dépressif. Dans l'ensemble, ces résultats pointent vers une réduction commune du tonus inhibiteur dans le NAc, associée à la dépression et à la susceptibilité au stress (Heshmati et al., 2020).

D'une part, la transmission synaptique excitatrice est altérée après un stress dans de nombreuses régions du cerveau, dont le PFC et l'hippocampe (McEwen et al., 2015). Récemment, une étude a montré qu'un stress aigu par contention pouvait altérer les ratios AMPA/NMDA ainsi que la mémoire à long-terme lors d'un test de reconnaissance d'objets, et cela de manière dépendante du sexe de l'individu (Torrissi et al., 2023). En outre, il a été démontré qu'un stress, induit par une contention chronique, diminuait les ratios AMPA/NMDA, donc favorisait la LTD dans les D1R-MSN, tandis que les D2R-MSN restaient inchangés (Lim et al., 2012). Une étude a montré que le CSDS diminuait les entrées synaptiques excitatrices des D1R-MSN et augmentait celles des D2R-MSN chez les souris susceptibles (Francis et al., 2015). À l'inverse, une augmentation du ratio AMPA/NMDA a été constatée dans les D1R-MSN, reflétant une augmentation des courants AMPAR sans altération des réponses médiées par les NMDAR, chez les souris exposées au stress par rapport aux naïves. Ces renforcements synaptiques induits par le stress au niveau des synapses D1R-MSN se sont produits spécifiquement au niveau des connexions provenant de l'hippocampe ventral, et ont été associés à l'apparition d'anhédonie et d'une adaptation passive (Pignatelli et al., 2021). De manière intéressante, ces modifications de la plasticité synaptique n'ont pas été observées dans les D2R-MSN (Pignatelli et al., 2021).

D'autre part, la régulation épigénétique distincte par les D1R- et D2R-MSN pourrait moduler l'équilibre entre la résilience et la susceptibilité au stress, notamment à travers l'acétylation et la méthylation du gène FosB (Hamilton et al., 2018; Lobo et al., 2013; Vialou et al., 2013). De plus, l'exposition à un stress aigu ou chronique engendre une augmentation de p-ERK dans le NAc provenant des afférences glutamatergiques du PVT (Contesse et al., 2021). Comme nous l'avons vu au cours du **Chapitre 2**, l'augmentation de p-ERK nécessite l'activation des D1R-MSN ainsi que des NMDAR contenant la sous-unité GluN2B, révélant un mécanisme commun entre l'addiction et la dépression. Ainsi, comme pour les drogues, il semble qu'il y ait un rôle différentiel des D1R- et D2R-MSN dans le NAc en réponse au stress ou à un événement aversif (pour revue, Allichon et al., 2021 en annexe X ; Francis and Lobo, 2017), avec à ce jour un rôle des D1R-MSN important dans les réponses induites par le stress.

Enfin, les stimuli aversifs sont également responsables d'une modification de l'expression génique et épigénétique, responsables de changements comportementaux à long-terme (Kim et al., 2016; Nestler and Carlezon, 2006). Comme la cocaïne, le stress est capable d'induire des cascades de signalisation dont celle de la PKA et permettre le recrutement de protéines clés telles que Δ FosB et CDK5. En effet,

l'inactivation de CDK5 spécifiquement dans les D1R-MSN provoque une augmentation des niveaux d'AMPC et de l'activité de la PKA, associées à un phénotype résilient au CSDS (Plattner et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la résilience et la sensibilité au stress chez les souris sont associées à des différences fondamentales dans les fonctions cérébrales, l'expression des gènes et impliquent des réseaux neuronaux et des populations neuronales importantes pour les comportements addictifs.

2. Détournement du circuit de la récompense par le stress

En conclusion, tout comme pour les drogues, l'exposition à un stress est capable d'augmenter la libération de DA dans le NAc (Barrot et al., 1999). La DA joue un rôle fonctionnel central dans la régulation comportementale, depuis la recherche de récompense jusqu'à l'adaptation pathologique au stress en réponse à l'adversité. Ainsi, la dépression est associée à une perturbation de la libération de DA, ce qui peut affecter la capacité à ressentir du plaisir. Les médicaments antidépresseurs visent souvent à rétablir l'équilibre de la DA. La VTA, qui fait partie du circuit de la récompense, code pour des stimuli récompensants, mais également aversifs (Lammel et al., 2014, 2012; Morales and Margolis, 2017; Ungless et al., 2010). Les anomalies dans le fonctionnement des neurones DA de la VTA et les cibles qu'ils influencent sont impliquées dans plusieurs troubles neuropsychiatriques importants, notamment l'addiction et la dépression (Lammel et al., 2014), suggérant l'existence de mécanismes communs entre ces deux troubles psychiatriques hautement comorbides.

Les rôles fonctionnels des neurones DAergiques de la VTA ont fait l'objet de recherches intensives car ils constituent la principale source de DA dans les structures cibles telles que le PFC et le NAc, qui jouent des rôles importants dans un large éventail de comportements motivés et de troubles neuropsychiatriques (Bromberg-Martin et al., 2010; Schultz, 2007). La VTA reçoit un apport excitateur et inhibiteur de zones cérébrales distinctes (Bromberg-Martin et al., 2010; Sesack and Grace, 2010). Ainsi, différentes sous-populations de neurones VTA DAergiques et GABAergiques peuvent remplir différentes fonctions (Berridge et al., 2009; Bromberg-Martin et al., 2010; Lammel et al., 2011; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Sesack and Grace, 2010). La modulation à long-terme des synapses sur les cellules DAergiques provoquée *in vivo* par des stimuli gratifiants et aversifs n'est pas uniforme. Au contraire, cette modulation varie considérablement en fonction des structures cibles respectives sur lesquelles les neurones DAergiques se projettent. En effet, il a été montré que les synapses excitatrices des sous-populations de neurones DAergiques, ayant différentes cibles de projections axonales, étaient distinctement modifiées après une expérience enrichissante avec la cocaïne par rapport à une expérience aversive (Brischoux et al., 2009; Bromberg-Martin et al., 2010; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Ungless et al., 2010). Les synapses des neurones DAergiques se projetant sur le shell médian du NAc ont été modifiées sélectivement par un stimulus gratifiant, tandis que les synapses des neurones DAergiques se projetant vers le PFC médial ont été modifiées uniquement par un stimulus aversif. En revanche, les synapses des cellules DAergiques se projetant sur le shell latéral du NAc sont modulées par des stimuli à la fois gratifiants et aversifs (Lammel et al., 2011), ce qui suggère que cette modulation pourrait coder pour l'apparition d'un stimulus saillant indépendamment de sa valence. Ces résultats sont cohérents avec l'idée selon laquelle les circuits mésocorticolimbiques DAergiques peuvent comporter plusieurs circuits parallèles, chacun codant des aspects distincts d'un stimulus motivationnel, qu'il s'agisse de sa valence (gratifiante ou aversive) ou de sa saillance (Bromberg-Martin et al., 2010). De manière intéressante, les synapses excitatrices des neurones

DAergiques, se projetant vers le PFC médial, ne semblent pas être modifiées par la cocaïne, mais présentent clairement des modifications en réponse à des expériences aversives (Lammel et al., 2011).

Dans la dépression, il y a souvent une diminution de la sensibilité aux récompenses, ce qui signifie que les activités qui étaient auparavant agréables deviennent moins gratifiantes, c'est ce qu'on appelle l'anhédonie. Les personnes dépressives peuvent avoir du mal à ressentir du plaisir, ce qui peut contribuer à une perte d'intérêt pour les activités quotidiennes. Les neurones DAergiques attribuent aux stimuli environnementaux une valeur appétente et prédisent les récompenses et les événements motivants (Schultz, 2010). Il a été démontré que la dépression et l'anhédonie sont associées à une réponse striatale réduite à la récompense (Belujon and Grace, 2017).

L'ensemble de ces données mettent en partie en évidence le détournement du circuit de la récompense par le stress à travers une modulation de la transmission glutamatergique par la DA au sein du NAc, responsable de comportements pathologiques comme dans le cas de l'addiction. En revanche, dans le cas du stress, la contribution des D1R- et D2R-MSN nécessite d'être approfondie ainsi que les mécanismes par lequel le dialogue DA et glutamate confère un phénotype susceptible ou résilient. Face à la forte prévalence de comorbidités entre l'addiction et d'autres troubles psychiatriques comme la dépression, les nouvelles études devraient se concentrer sur l'identification de mécanismes communs. Dans ce contexte, mon travail de thèse a été de comprendre l'impact du stress sur la plasticité induite dans les D1R- et D2R-MSN du NAc ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents impliqués, notamment le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans les réponses comportementales induites par le stress (voir [Article I](#)).

Objectifs

La relation étroite entre les systèmes DAergique et glutamatergique au sein du circuit de la récompense, et en particulier dans le NAc, joue un rôle important dans le développement et la persistance des adaptations à long terme induite par les psychostimulants. En effet, l'augmentation de la concentration de DA provoquée par les psychostimulants dans NAc module la transmission glutamatergique au sein du circuit de récompense, et engendre de multiples altérations moléculaires, cellulaires et comportementales durables.

Des études antérieures menées au laboratoire ont mis en évidence que la synergie entre les voies de signalisation D1R et NMDAR contrôle, au moins en partie, les réponses induites par la cocaïne (Pascoli et al., 2011). Le laboratoire a ensuite établi 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 NMDA *in vitro* sur cultures de neurones striataux (E. Cahill et al., 2014), alors que d'autres équipes ont établi que l'interaction D2R-NMDAR permet l'inhibition des NMDAR par la DA dans les D2R-MSN (Liu et al. 2006). Plus récemment, une étude à laquelle j'ai participé a montré que l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR, induites par la cocaïne dans le NAc, jouaient un rôle clé dans les adaptations moléculaires, cellulaires et comportementales induite par ce psychostimulant.

Article I : Des altérations de la transmission glutamatergiques par la DA au sein du NAc étant rencontrées aussi bien dans des modèles précliniques d'addiction que de dépression (Allichon et al., 2021), nous avons émis l'hypothèse que l'hétéromérisation DAR-NMDAR pourraient être un substrat moléculaire commun à ces deux pathologies. Ce travail collaboratif avec l'équipe du Dr Jacques Barik, qui a réalisé notamment les expériences d'électrophysiologies, nous a permis de montrer, aussi bien chez la souris que chez l'homme, que l'apparition de symptômes dépressifs était associée à une hétéromérisation D1R-NMDAR accrue dans le NAc, dont l'inhibition empêche le développement et le maintien des symptômes dépressifs, et les effets du stress sur la physiologie des D1R-MSN et D2R-MSN.

Résultats partie II : Nous avons souhaité déterminer si le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans les adaptations induites par les psychostimulants pouvait être généralisé à une autre classe de drogue que sont les opioïdes. J'ai pu montrer que le développement des propriétés hédoniques de la morphine était associé à une hétéromérisation D2R-NMDAR, mais pas D1R-NMDAR dans le NAc, dont le blocage prévient le développement des propriétés renforçantes induites par la morphine. En revanche, cibler ces hétéromères n'impacte pas les propriétés psychoactives de cette drogue observées chez les souris. J'ai également développé des approches expérimentales qui me permettront d'étudier la modulation et le rôle de ces complexes de récepteurs dans les symptômes de sevrage induits par l'arrêt de l'exposition à la morphine, ainsi que sur les propriétés analgésiques de cette drogue.

Résultats

Résultats Article I – Synaptic imbalance in the striatum confers vulnerability to depression

Résultats partie II – Rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations cellulaires et comportementales induites par la morphine

Résultats Article I

Résultats Article I

Synaptic imbalance in the striatum confers vulnerability to depression

Vanesa Ortiz^{1,2*}, Paula Pousinha^{1,2*}, Marie-Charlotte Allichon^{3-5*}, Daiana Rigoni^{1,2}, Faustine Arrivet³⁻⁵, Marion Violain^{1,2}, Stéphane Martin^{1,2}, Gwenola Poupon^{1,2}, Andry Andrianarivelo³⁻⁵, Nicolas Heck³⁻⁵, Gustavo Turecki⁶, Naguib Mechawar⁶, Peter Vanhoutte^{3-5#}, Jacques Barik^{1,2#}.

¹Université Côte d'Azur, Nice, France

²Institut de Pharmacologie Moléculaire & Cellulaire, CNRS UMR7275, Valbonne, France

³CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

⁴INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005, Paris, France

⁵Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

⁶Douglas Mental Health University Institute, Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, QC, Canada.

*These authors equally contributed to the work

#Co-last and Co-corresponding authors: barik@ipmc.cnrs.fr; peter.vanhoutte@sorbonne-universite.fr.

Short title: **Striatal dysregulation in depression**

ABSTRACT

The pervasive influence of social stressors underscores their pivotal contribution in shaping mental health outcomes. They have consistently emerged as potent risk factors for the development of major depression. Although depression is intricately linked to dysregulation of reward processing, the underlying cellular and molecular mechanisms are far from being understood. We employed the chronic social defeat preclinical model of depression and uncovered marked subpopulation-specific changes in the physiology of medium-sized spiny neurons (MSNs) from the nucleus accumbens (NAc). These cellular adaptations involved altered gating properties of glutamate NMDA receptors (NMDAR) in dopamine 1 receptor (D1R)-expressing MSN, which correlates with the intensity of depressive-like symptoms in mice vulnerable to stress. We causally demonstrate that increased NMDAR function is driven by their heteromerization with D1R. Temporally-controlled NMDAR-D1R complexes disruption in socially-stressed mice, both prevent and rescue social withdrawal and anhedonia. Human brain samples from depressed patients show increased receptor heteromerization, therefore uncovering new avenues and potential targets for the development of innovative approaches to treat depression.

INTRODUCTION

Major depressive disorder (MDD) is the leading cause of disability adjusted life years worldwide (W.H.O.), and has significant impact on psychological well-being and on health systems. (1, 2). In contemporary urban societies, high population density, persistent sensory overstimulation and rapid pace constitute a breeding ground for heightened social stress sensitivity predisposing to mental illnesses, including MDD (3). MDD is comorbid with several other psychiatric conditions and a large spectrum of somatic disorders. Patients with MDD exhibit impairments across multiple facets of reward processing encompassing responding to natural hedonic stimuli such as food and social interactions (4). These dysregulations can be modelled in mice exposed to chronic social stress (CSD), which allows to recapitulate key behavioral features that are reminiscent of human depression in both males and females (5–7). Indeed, CSD induces enduring avoidance of social contacts and marked anhedonia in mice susceptible to stress, while a subgroup of mice phenotypically differs and shows stress resilience (6, 7). The cellular and molecular mechanisms that shape resilience remain largely overlooked (8). Yet, when contrasted with individuals susceptible to stress, unraveling these mechanisms might serve as a pivotal step in crafting novel treatments for individuals with MDD and, on a broader scale, for those suffering from stress-related psychiatric conditions.

The major hallmarks of depression have been causally linked to the dysregulation of dopamine (DA) neurons from reward centers (4, 7, 9–11). In fact DA neurons projecting from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc) exhibit a hyperactive state in mice susceptible to CSD but not in resilient ones (9, 10). A social confrontation with a dominant aggressor triggers a significant and sustained release of DA within the NAc (10), and susceptible and resilient mice exhibit different profiles of neuronal dynamics of VTA DA fibers in the NAc (12). DA released from VTA neurons selects specific sets of excitatory glutamatergic inputs converging onto the NAc shaping the activity of GABAergic medium-sized spiny neurons (MSN) thereby influencing their synaptic outputs (13). Integration of converging DA and glutamate signals in the NAc is achieved by the two segregated subpopulations of MSNs expressing either the DA receptor (DAR) type 1 (D1R) or type 2 (D2R) (14). D1R- and D2R-MSNs constitute a cornerstone of the basal ganglia circuits and prevailing models propose that they drive opponent aspects of valenced behavioral outcomes notably in models of neuropsychiatric conditions such as addiction and depression (15, 16). However, this dichotomic view has been increasingly challenged (16, 17), and changes in the intra-striatal organization of collaterals between MSNs (18), although poorly addressed, could be key for sustaining dysregulations of NAc function in depression. Our objectives were (i) to identify the cellular neuroadaptations, molecular underpinnings, and intra-striatal plasticity that underly the appearance and persistence of depressive-like symptoms, (ii) to test in depressed patients the pertinence of our findings for translational value, and (iii) to provide proof of concepts that targeting the identified molecular dysregulations can alleviate depressive-like symptoms and thus pave the way for potential new targets to combat MDD.

RESULTS

Increased NMDA functions in D1R-MSNs correlates with susceptibility to depression

To investigate the impact of chronic stress on the integration of glutamate synaptic inputs by NAc D1R- or D2R-MSN, we employed the chronic social defeat (CSD) paradigm, which is one of the most used preclinical models that triggers depressive-like symptoms reminiscent of the human condition, including social withdrawal, anxiety and anhedonia (4). A virally-mediated tagging of D1R- or D2R-MSN (19) was performed in mice subjected to 10 days of social defeat (Fig. 1A), followed by a social interaction behavioral test to discriminate susceptible from resilient mice (Fig. 1B). We next challenged the two MSN populations at different imposed depolarizing current steps (0, 20, 50 and 100pA) in order to increase discharge probability triggered by nearby electric pulses delivered at 10hz frequency. We found that D1R-MSN from susceptible, but not resilient, mice showed a significant increase in discharge probability compared to naïve animals (Fig. 1C-E), whereas D2R-MSN displayed the inverse cellular phenotype in both susceptible and resilient mice (Fig. 1F-H). These effects cannot be attributed to differences in intrinsic excitability properties since they were similar in susceptible and resilient mice (Fig. S1A-F). Because D1R-MSN showed increased synaptic signal integration specifically in susceptible CSD mice, we further investigated the underlying cellular mechanism. We first analyzed the spontaneous glutamatergic inputs at physiological membrane potential, in D1R-MSN. Both amplitude and frequency of spontaneous events were similar among groups (Fig. S1G-K), therefore excluding a putative role of AMPAR-mediated transmission on the observed stress-evoked cellular maladaptation. By contrast, pharmacologically isolated NMDAR excitatory post-synaptic currents (EPSCs) from D1R-MSN displayed an increased decay time in susceptible mice compared to naïve ones (Fig. 1I, J), suggesting an increase of synaptic GluN2B-containing NMDAR. Notably, we also evidenced altered NMDAR gating properties in susceptible mice (Fig. 1K, M), with a disinhibition of NMDAR at negative voltages that negatively correlates with the social interaction score in defeated mice (Fig. 1N). Altogether, these data indicate that the development of stress-induced depressive-like symptoms correlates with an increased function of NMDAR in D1R-MSN.

From mice to humans, depressive-like symptoms are associated with an increased D1R-NMDAR heteromerization in the NAc.

Since the DA increase induced by CSD in the NAc (10) is associated with a potentiation of NMDAR functions in D1R-MSN in susceptible mice (Fig.1), we hypothesized that these mice may display an increased D1R-NMDAR heteromerization in this striatal subregion. Indeed, we and others established that DAR-NMDAR heteromers are integrators of DA and glutamate signals whereby the binding of D1R to GluN1 subunits of NMDAR mediates the facilitation of NMDAR currents by DA in D1R-MSN (20), while the binding of D2R to GluN2B is required for the inhibition of NMDAR functions by DA in D2R-MSN (21). Endogenous D1R-NMDAR complexes were therefore detected *in situ* in the striatum through Proximity Ligation Assay (PLA) (19,20) 24h after the last social defeat session followed by

social interaction assessment. We found a significant increase of the D1R-NMDAR PLA signal in all NAc, but not dorsal striatum, subregions selectively in susceptible mice (Fig. 2 A, B). By contrast, D2R-NMDAR heteromers were decreased in the whole striatum, which may not account for the vulnerability to social defeat as it occurs in both susceptible and resilient mice (Fig. 2C,D). To test the translational potential of these observations in a preclinical model of depression, we analyzed DAR-NMDAR heteromerization levels in human post-mortem samples from individuals having suffered of major depression and matched controls (Table S1). We established that patients diagnosed with major depressive disorder also display a respective increase and decrease of D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromers in the ventral striatum (Fig. 2E -H), therefore supporting the validity of our preclinical findings.

Disruption of D1R-NMDAR heteromerization in the NAc reverts depressive-like behavior and cellular maladaptation.

We next investigated the functional role of CSD-induced D1R-NMDAR heteromerization in the NAc in the appearance of depressive-like behaviors and associated cellular maladaptation. To this aim, a cohort of mice was injected in the NAc with the Tet-On-GluN1C1 virus, which drives a doxycycline (dox)-dependent bicistronic expression of the fluorescent reporter protein RFP together with a peptide corresponding to the C1 cassette of GluN1 NMDAR that binds to D1R. This approach allows a timely-controlled uncoupling of D1R-NMDAR interactions *in vivo* upon supplementation of the drinking water with dox, without interfering with the functions of individual receptors independently on their heteromerization (19). The control group was injected with the related control virus (Tet-On-GluN1C1 Δ) expressing a truncated version of the C1 peptide that preserves D1R-NMDAR interactions (19,20). These mice were supplemented with dox prior and during CSD (Fig. 3A) to uncouple D1R-NMDAR interactions during the defeat sessions. As expected, mice injected with the control virus developed a significant social withdrawal (Fig. 3A), increased anxiety (Fig. 3B) and anhedonia (Fig. 3C). By contrast, disrupting D1R-NMDAR heteromerization prevented the appearance of social avoidance (Fig. 3A) and anhedonia (Fig. 3C), but not of increased anxiety (Fig. 3B). In female mice, a beneficial trend was also observed when D1R-NMDAR heteromers were uncoupled (Fig. S2 A-D). In accordance with the anti-depressive effects provided by the disruption of D1R-NMDAR complexes, we also observed a rescue of the aberrant synaptic signal integration of virally-tagged D1R-MSN from mice subjected to CSD (Fig. 3D-F), as well as a normalization NMDAR gating properties (Fig. 2SI). This implies that CSD-evoked D1R-NMDAR heteromerization in the NAc indeed drives the depressive-like symptoms and their cellular correlates. Since D2R-MSNs contribute to anxiety-like behaviors (22), we asked whether the inhibition of D2R-NMDAR interaction could prevent the increased anxiety observed in CSD mice. To address this issue, we employed a viral strategy previously validated to efficiently disrupt of D2R-NMDAR interactions *in vivo* (19). Mice were injected with interfering virus (AAV-Tet-On-D2R-IL3) or its related control (Tet-On-D2R-IL3-scr) and exposed to

dox prior and during CSD. We found that D2R-NMDAR disruption had no impact on any of the depressive-like symptoms tested (Fig. S2F-H), which is consistent with the decreased D2R-NMDAR PLA signal observed in both susceptible and resilient mice, and human tissues from depressed subjects (Fig.2 .C-D, G-H). Because CSD triggers long-lasting behavioral adaptations that persist after withdrawal from social stress (23), we interrogated whether D1R-NMDAR heteromerization in the NAc could outlast a withdrawal from CSD. We found that it was the case since the D1R-NMDAR PLA signal was still significantly higher in CSD mice compared to naive ones after a 8 day-withdrawal from chronic stress (Fig.3G). To evaluate the role of this persistent D1R-NMDAR heteromerization in the maintenance of depressive-like behavior, mice were injected with Tet-On-GluN1C1 virus or it related control. They were first subjected to the CSD paradigm in the absence of doxycycline (dox) and tested for social interaction. Doxycycline was then added to the drinking water to disrupt D1R-NMDAR during the withdrawal period (Fig.3h). Remarkably, the inhibition of D1R-NMDAR was able to prevent the persistence of both social withdrawal and anhedonia (Fig.3I,J), therefore showing that targeting D1R-NMDAR heteromerization is an efficient strategy to dampen already established depressives-like symptoms. Accordingly, we observed that an acute inhibition of D1R-NMDAR after the CSD paradigm reversed the increased function of NMDAR observed in susceptible mice (Fig.S2I). To acutely disrupt D1R-NMDAR complexes after chronic stress we added the C1 peptide in the patch pipette 24 after the CSD paradigm. As a control, the C1 Δ peptide was added to the pipette intracellular solution. NMDAR I-V curves obtained from naïve and CSD susceptible mice, by collecting C1 and C1 Δ data in D1R-MSN from slices of the same animal, showed the acute D1R-NMDAR disruption after chronic stress normalized NMDAR I-V curve profile (Fig. S2I).

The beneficial effect provided by the targeting of D1R-NMDAR on the maintenance depressive-like symptoms and associated cellular maladaptation posit these receptor complexes as targets of potential interest for the development of future therapeutic strategies. This is further reinforced by our previous findings showing that targeting DAR-NMDAR heteromerization also blocks cocaine's rewarding effect, while sparing natural reward processing (19). DAR-NMDAR heteromerization therefore appears as a common molecular switch for addiction and depression, potentially explaining the high rate of comorbidity between these two psychiatric conditions. Consequently, targeting these receptor complexes may provide a therapeutic benefit for both depression and comorbid addictions, which is important in view of clinical observations showing that treating comorbid psychiatric disorders separately holds poor efficacy (24,25).

Disrupting D1R-NMDAR heteromerization prevents the impact of chronic stress on both NAc D1R- and D2R-MSN.

Though D2R-MSN decreased synaptic signal integration may not account for the development of depressive-like behaviors, disrupting D1R-NMDAR heteromerization provides a complete rescue of CDS-induced social withdrawal and anhedonia, whereas stress still impacts D2R-MSN physiology. This

led us to investigate whether targeting D1R-NMDAR complexes could rescue the CSD-evoked changes in synaptic signal integration of D2R-MSN. To this aim, we virally-tagged D2R-MSN and co-injected virus to disrupt D1R-NMDAR interaction or its related control during the CSD paradigm (Fig.4A). We first confirmed the decreased discharge probability of D2R-MSN from mice injected with the control virus (Fig. 4A). Unexpectedly, we found that uncoupling D1R from NMDAR prevented the decreased glutamate signal integration in D2R-MSN, therefore suggesting that D1R-MSN may decrease D2R-MSN activity upon chronic stress exposure (Fig. 4B) through a GABA A receptor-independent mechanism, as we performed these experiments in the presence of picrotoxin (50 μ M). We therefore hypothesized that D1R-MSN increased discharge probability could modulate glutamate synaptic inputs on D2R-MSN. We performed a 3D-analysis of dendritic spine density in D2R-MSN in naïve or stressed mice upon disruption of receptor heteromers in D1R-MSN and observed an increase of dendritic spine density in D2R-MSN from susceptible mice relative to naïve and resilient ones, which was blocked upon disruption of D1R-NMDAR heteromerization (Fig. 4D-F). Altogether, these data support that stress-mediated D1R-NMDAR heteromerization in the NAc drives the appearance of depressive-like symptoms through a modulation of both D1R- and D2R-MSN. Because the targeting of D1R-NMDAR does not directly affect synaptic plasticity in D2R-MSN (20), these result supports that chronic stress may remodel the NAc microcircuit, brought about reciprocal collaterals between MSN, to increase the inhibitory control of D1R-MSN on D2R-MSN.

Chronic social defeat promotes a cellular imbalance in the NAc

Electrophysiological confirmation of functional GABAergic synapses between MSNs has been shown a decade ago (26). This local network of inhibitory synapses between MSNs can suppress MSN excitability and output (27), and was recently shown to be modulated by dopamine levels (28). Since the targeting of DAR-NMDAR in D1R-MSN prevents the impact of stress on both MSN populations, we interrogated whether CSD may alter reciprocal inhibitory MSN collaterals between D1R-MSN and D2R-MSN. We used a viral-mediated approach to specifically express light activated opsine (channel rhodopsin 2, ChR2) in one MSN subtype and obtain optically-triggered inhibitory synaptic currents (oIPSCs) in the other MSN subtype (Fig. 5A, D). We observed increased connectivity of D1R-MSN onto D2R-MSN in susceptible mice, relative to naïve and resilient mice (Fig. 5B), without impact on oISCs amplitude (Fig. 5C), suggesting that chronic stress induces a morphological remodeling of these specific collaterals, rather than a functional one. By contrast, both naïve and susceptible mice show similar D2R-MSN onto D1R-MSN connectivity (Fig. 5E, F). These data suggest that CSD promotes NAc cellular imbalance towards the prevalence of D1R-MSN.

Our findings constitute a significant breakthrough in the understanding of molecular and cellular foundations behind the development and persistence of depressive-like symptoms in mice. The translational value of our results is underscored by the identification of comparable molecular patterns in humans affected by depression. Targeting these molecular changes not only prevents but also rescues

depressive-like symptoms in mice, therefore opening avenues for exploring new potential targets to combat MDD.

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)).

Social defeat stress procedures

The CSDS paradigm was performed as previously (10). Mice were subjected to 10 consecutive days of social defeat by former CD1 breeder male mice. Each experimental mouse faced a new CD1 every day and sessions of defeat were limited to a maximum of 5 min. Mice were then maintained in sensory, but not physical, contacts with the dominant male through a semi-permeable barrier. Undefeated mice (Naive) were not confronted with a dominant male but lived in similar housing conditions, separated by a semi-permeable barrier.

The chronic social defeat procedure for females was performed as previously described (29,30). The only difference with males is that female mice were impregnated with urine of male CD1 mice immediately before each defeat session. To collect urine, we followed the method described previously (30). The urine samples were applied immediately after the collection or stored at 4 °C for 24 h. We obtained urine from a new male CD1 mouse every day. These mice were not used as resident CD1 aggressors. Cotton swabs were employed to apply urine around the vaginal orifice, tail and lower back of females.

Social Interaction test

The social interaction (SI) test was performed in a low luminosity environment (7 ± 2 lux). Experimental mice were exposed to two consecutive sessions (180 s each) in an open-field containing initially an empty perforated box (No target “NTg” condition), which was then replaced by a box containing an unfamiliar CD1 mouse (Target “Tg” condition). The time spent in the interaction zone surrounding the box was recorded and used as an index of social interaction. The performance of each mouse was expressed as ratio: [time spent in the interaction zone during Tg / time spent in the interaction zone during NTg], with a ratio < 1 as index of susceptibility and a ratio > 1 as an index of resilience.

Elevated zero maze

Anxiety levels were examined in the O-maze test. We employed a circular maze consisting of two open arms and two closed arms alternating in quadrants (width of walking lane: 5 cm, total diameter: 55 cm, height of the walls: 12 cm, elevation above the floor: 60 cm) with an ambient light of 200 lux in the open

arms. Mice were placed in it and movements were recorded during 5 min. An experimenter blind to the experimental groups scored the time spent in the open arms. The percentage of time spent in the open arms ($[\text{time spent in the open arms} / (\text{time spent in open arms} + \text{time spent in closed arms})] \times 100$) was calculated for each mouse.

Non-alcoholic beer preference

Considering Dox solution contains sucrose, non-alcoholic beer (NB) consumption was employed to test anhedonia. NB is highly accepted by rodents and they also have a remarkable preference for it compared to water (31,32). NB (Heineken, 0% alcohol, 21 Kcal/100 ml) was decarbonated by stirring vigorously for at least 2 h, and presented in bottles fitted with sipper spouts at room temperature. Throughout this procedure, mice were not subjected to either food or water deprivation.

NB preference was measured in a two-bottles choice procedure. Mice were acclimatized to two bottles containing water for 48 h before the test. Following the O-Maze, mice were allowed to freely drink from a bottle of water or NB during 12 h (overnight). The bottles were weighed and preference was calculated as follow $[\text{volume of NAB consumed} / (\text{volume of NAB} + \text{volume of water consumed})] \times 100$.

Viral constructions

All AAV recombinant genomes were packaged in serotype 9 capsids, except for optogenetic experiments. AAV-Tet-On-GluN1C1 expresses bicistronically the fluorescent reporter protein RFP and the C1 cassette of the GluN1 subunit (₈₆₄DRKSGRAEPDPKKKATFRAITSTLASSFKRRRSSKDTSDT₉₀₀) upon doxycycline (dox) treatment. The related control virus AAV-Tet-On-GluN1C1 Δ expresses a truncated version of C1 that is deleted from a stretch of 9 positively charged amino acids (₈₉₀SFKRRRSSK₈₉₈), which are required for D1R-NMDAR interaction (20, 33). The AAV-Tet-On-D2R-IL3 encodes a sequence of the third intracellular loop of the D2R (₂₂₅TKRSSRAFR₂₃₄) interacting with GluN2B. The control 9AAV-Tet-On-D2R-scr expresses a scrambled sequence (KFARRTSASR) of the D2R-IL3 (full AAV sequences are available upon request). All Tet-On AAV were injected bilaterally by infusing 0.7 μl of a solution at $5 \cdot 10^{13}$ viral genomes/ml per hemisphere for the NAc (2 μl for the dorsal striatum). The AAV-PPTA-Cre and AAV-PPE-Cre contain 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 (19,34,35). AAV PPTA-cre or AAV-PPE-cre were co-injected with the AAV-pCAG-DIO-eGFP-WRPE or AAV-pCAG-DIO-dtTomato (Upenn) expressing flexed eGFP or dtTomato under the CMV/actin hybrid promoter (CAG). All viruses were diluted in PBS pluronic 0.001%.

For cell-type-specific optogenetic activation of D1R-MSN or D2R-MSN, the serotype 5 AAV-pCAG-DIO-ChR2-eYFP (Addgene) co-injected with AAV PPTA-cre and AAV-PPE-cre, respectively.

Dox treatments

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

Proximity ligation assay, image acquisition, and analysis

Proximity ligation assay (PLA) on mouse brain sections (30 µm-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 µm-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 (Anti-D1R #D2944, Sigma; Anti-NMDAR1 #Ab17345 Abcam; Anti-D2R #ABN462, Millipore; Anti-NMDAR2B, #MAB5782, Millipore) 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. For brightfield PLA nuclei were counterstained using the duolink nuclear stain.

For PLA staining, whole-slice images were taken using Zeiss AxioScan with a 40X magnification and z-stack with a 0.85 µm step interval. For section from human subjects, 25 regions of interest of 500 µm x 500 µm were taken in the Nac. For mouse brain sections, 6 regions of interest of 100 µm x 100 µm were taken for each striatal subregions in each hemisphere. The image stacks were exported as TIFF files using the image export plugin of the ZEN Blue edition lite software (Zeiss, version 3.1).

Human and mouse PLA images were then analyzed using an ImageJ homemade macro. Since brightfield image stacks contain out of focus signal, they were merged into a single, in focus, image using the plugin Extended depth of field (<https://github.com/Biomedical-Imaging-Group/EDF-Extended-Depth-of-Field>) before detection of the PLA punctate with Find Maxima command implemented in FIJI.

Patch clamp recordings

Mice were anesthetized [ketamine (150 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg)] and transcardially perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for slice preparation. Coronal 250-µm slices containing the NAc were obtained in bubbled ice-cold 95% O₂/5% CO₂ aCSF containing 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 234 mM sucrose, and 26 mM NaHCO₃, using a HM650V vibratome (Microm, France). Slices were then incubated in aCSF containing 119 mM NaCl,

2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 11 mM glucose, at 37°C for 1 hour, and then kept at RT. Slices were transferred and kept at 31°C – 32°C in a recording chamber superfused with aCSF (2 ml/min). Neurons were visualized by combined epifluorescent and infrared/differential interference contrast visualization using an Olympus upright microscope holding 5× and 40× 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). For all the electrophysiology experiments, the recording pipette solution contained (in mM): 135 gluconic acid (potassium salt: K-gluconate), 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 MgATP and 0.4 NaGTP (pH 7.25; osmolarity 280–290 mOsm), except when pharmacological isolated NMDAR EPSCs were assessed. In that case the recording pipette was filled with an internal solution containing 117.5 mM Cs-gluconate, 15.5 mM CsCl, 10 mM TEACl, 8 mM NaCl, 10 HEPES, 0.25 mM EGTA, 4 mM MgATP and 0.3 NaGTP (pH 7.3; osmolarity 290–300 mOsm).

The resting membrane potential (V_m) was first measured in the absence of any spontaneous firing, and only cells more negative than –61 mV were considered. The membrane resistance was obtained in current-clamp mode by injecting –100pA of current (400ms duration). The hyperpolarization peak was used to calculate the resistance value by Ohm's law.

Neuron intrinsic excitability (relationship between firing frequency and current input) was accessed by maintaining the neuron at physiological E_m (I_h=0pA) and then challenge the neuron with injected pulses of increased intensity in steps of 50 pA (from -200 to 400 pA, 400 ms duration).

For measurement of EPSPs, synaptic potentials were recorded in current-clamp mode. Subthreshold EPSPs were elicited by an electric stimulus of intensity that was approximately one-quarter of the stimulus required for evoking an action potential, thus obtaining EPSP with similar amplitude in the different studied neurons (~5 to 10 mV). All recordings used cells with a resting membrane potential more negative than –61 mV and did not change by >2 mV during an experiment. Average resting membrane potentials were similar between neurons within each experimental condition.

To study the glutamatergic synaptic signal integration, we recorded EPSPs triggered by 10 pulses at 10 Hz frequency stimulation, in the presence of 50 μM picrotoxin (Sigma-Aldrich, France, dissolved in DMSO) to block GABAergic transmission. We challenged the neurons with this frequency stimulation protocol at increased imposed current (0, 20, 50 and 100pA), in order to increase the probability of neuron firing (discharge probability). We measured discharge probability, considering the value of '1' whenever an AP was observed and '0' in absence of an AP, for each step of imposed current.

Before starting current – voltage (I-V) relationship measurements, stimulus intensity was set to evoke an EPSC of approximately 150 pA at –60 mV, normalizing the response and thus the number of recruited fibers. Liquid junction potential was not corrected for whole-cell voltage-clamp recordings. After, pharmacologically isolated NMDAR EPSCs were obtained in the presence of 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 100 μM dissolved in 1% DMSO, Sigma-Aldrich) and of 50 μM

microtoxin (Sigma-Aldrich, France, dissolved in DMSO). NMDAR EPSCs amplitudes were calculated by averaging 15 consecutive EPSCs recorded at voltages ranging from -80 mV to $+40$ mV in 10 mV steps. I-V relationships were normalized to the NMDAR EPSC amplitude at $+40$ mV (as + 1). The rescue of I-V curve was performed as follows: to acutely interfere with D1R-GluN1 complexes we added a peptide corresponding to the C1 cassette (D864-T900) of GluN1 that binds to D1R (C1) to the pipette intracellular solution. As a control peptide (C1 Δ), we eliminated nine aminoacids that are involved in the electrostatic interaction between D1R and GluN1 fragments *in vitro* (33). NMDAR I-V curves were obtained from naïve and CSDS susceptible mice, by collecting C1 and C1 Δ data in D1R-MSN from slices of the same animal.

Pharmacologically isolated EPSC NMDAR decay time, recorded from cells voltage clamped at $+40$ mV, in the presence of 50 μ M microtoxin (Sigma-Aldrich, France, dissolved in DMSO) to block GABAergic transmission, and of DNQX (10 μ M) to block AMPA receptors. Currents were 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: $\tau_w = [(af \cdot \tau_f) + (as \cdot \tau_s)] / (af + as)$, where af and as are the relative amplitudes of the two exponential components, and τ_f and τ_s are the corresponding time constants.

Photocurrents (oIPSCs) were recorded with $V_m = -40$ mV, in the presence of DNQX to block AMPA currents, induced by optical illumination (0.1 Hz) with 5 ms blue light (473 nm) pulses delivered by a Cool LED p100 through the objective light path. Twenty sweeps were averaged offline, and peak amplitude was measured to assess light-evoked current size. Recorded oIPSCs presented a reversal potential at approximately voltage holding (V_h) -62 mV and were blocked by microtoxin (50 μ M, Sigma, France).

Offline analyses were performed using Clampfit 10.2 (Axon Instruments, USA) and Prism (GraphPad, USA).

Dendritic spines image acquisition and analysis

Twenty-four hours after the CPP paradigm, mice were perfused and brains were sliced as described above. Dendrites from D2R-MSN labeled with GFP, but Tag-RFP negative, were analyzed. Image stacks were acquired with confocal Zeiss LSM980 Airyscan II equipped with a 63×1.4 numerical aperture objective. High resolution SR mode was used, with pixel size of 43 nm and z-step of 150 nm. The excitation wavelength was 488 for GFP and 561 for RFP, with emission range 495 - 550 nm and 573 - 627 nm. Raw image stacks were deconvolved with Huygens software (Scientific Volume Imaging), using experimental point spread function obtained from image stacks of fluorescent beads. Neuronstudio software was used to reconstruct the dendrite and detect dendritic spines with manual correction. Spine density is defined as the number of dendritic spines normalized for a 10 μ m dendritic segment.

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 (36).

Dissections of ventral striatum were performed by expert brain bank staff with the guidance of a human brain atlas (37) 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 1.5 hr each, followed by clearing in 3 changes of 100% xylene (2 hr, 2x1.5 hr). The samples were then infiltrated in 3 changes molten paraffin, 3hrs each before embedding. Slices of 6 μm thickness were then prepared with microtome at the histology facility of the ICM institute (Paris).

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 or two-way ANOVA were performed followed by Tuckey or a Bonferroni Post-hoc test as indicated in the legends. Data distribution was assumed to be normal and variances were assumed to be homogenous. For the comparison of PLA signals from depressed individuals and matched controls a two-sided Mann-Whitney test was employed. The main effect and post-hoc statistical significances are given in the appropriate figure legend for each experiment.

REFERENCES

1. K. M. Scott, M. Von Korff, J. Alonso, M. C. Angermeyer, E. Bromet, J. Fayyad, G. de Girolamo, K. Demyttenaere, I. Gasquet, O. Gureje, J. M. Haro, Y. He, R. C. Kessler, D. Levinson, M. E. Medina Mora, M. Oakley Browne, J. Ormel, J. Posada-Villa, M. Watanabe, D. Williams, Mental–physical comorbidity and its relationship with disability: results from the World Mental Health Surveys. *Psychol. Med.* **39**, 33–43 (2009).
2. A. Steffen, J. Nübel, F. Jacobi, J. Bätzing, J. Holstiege, Mental and somatic comorbidity of depression: a comprehensive cross-sectional analysis of 202 diagnosis groups using German nationwide ambulatory claims data. *BMC Psychiatry.* **20**, 1–15 (2020).
3. F. Lederbogen, P. Kirsch, L. Haddad, F. Streit, H. Tost, P. Schuch, S. Wüst, J. C. Pruessner, M. Rietschel, M. Deuschle, A. Meyer-Lindenberg, City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. *Nature.* **474**, 498–501 (2011).
4. S. J. Russo, E. J. Nestler, The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **14** (2013), doi:10.1038/nrn3381.
5. O. Berton, C. A. McClung, R. J. DiLeone, V. Krishnan, W. Renthal, S. J. Russo, D. Graham, N. M. Tsankova, C. A. Bolanos, M. Rios, L. M. Monteggia, D. W. Self, E. J. Nestler, Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science.* **311**, 864–868 (2006).
6. V. Krishnan, M.-H. Han, D. L. Graham, O. Berton, W. Renthal, S. J. Russo, Q. LaPlant, A. Graham, M. Lutter, D. C. Lagace, S. Ghose, R. Reister, P. Tannous, T. A. Green, R. L. Neve, S. Chakravarty, A. Kumar, A. J. Eisch, D. W. Self, F. S. Lee, C. A. Tamminga, D. C. Cooper, H. K. Gershenfeld, E. J. Nestler, Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell.* **131**, 391–404 (2007).
7. V. Ortiz, R. Costa Campos, H. Fofó, S. P. Fernandez, J. Barik, Nicotinic receptors promote susceptibility to social stress in female mice linked with neuroadaptations within VTA dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology*, 1–10 (2022).
8. F. Cathomas, J. W. Murrough, E. J. Nestler, M.-H. Han, S. J. Russo, Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. *Biol. Psychiatry.* **86**, 410–420 (2019).
9. D. Chaudhury, J. J. Walsh, A. K. Friedman, B. Juarez, S. M. Ku, J. W. Koo, D. Ferguson, H.-C. Tsai, L. Pomeranz, D. J. Christoffel, A. R. Nectow, M. Ekstrand, A. Domingos, M. S. Mazei-Robison, E. Mouzon, M. K. Lobo, R. L. Neve, J. M. Friedman, S. J. Russo, K. Deisseroth, E. J. Nestler, M.-H. Han, Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature.* **493**, 532–536 (2013).
10. J. Barik, F. Marti, C. Morel, S. P. Fernandez, C. Lanteri, G. Godeheu, J.-P. Tassin, C. Mombereau, P. Faure, F. Tronche, Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons. *Science.* **339**, 332–335 (2013).
11. C. Morel, S. P. Fernandez, F. Pantouli, F. J. Meye, F. Marti, S. Tolu, S. Parnaudeau, H. Marie, F. Tronche, U. Maskos, M. Moretti, C. Gotti, M.-H. Han, A. Bailey, M. Mameli, J. Barik, P. Faure, Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. *Mol. Psychiatry* (2017), doi:10.1038/mp.2017.145.
12. L. Willmore, C. Cameron, J. Yang, I. B. Witten, A. L. Falkner, Behavioural and dopaminergic signatures of resilience. *Nature.* **611**, 124–132 (2022).
13. C. R. Gerfen, Segregation of D1 and D2 dopamine receptors in the striatal direct and indirect pathways: An historical perspective. *Front. Synaptic Neurosci.* **14** (2023) (available at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2022.1002960>).
14. M. Sality, P. Trifilieff, J. Caboche, P. Vanhoutte, From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type-Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biol. Psychiatry.* **87**, 944–953 (2020).
15. T. C. Francis, R. Chandra, D. M. Friend, E. Finkel, G. Dayrit, J. Miranda, J. M. Brooks, S. D. Iñiguez, P. O'Donnell, A. Kravitz, M. K. Lobo, Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress. *Biol. Psychiatry.* **77**, 212–222 (2015).
16. M.-C. Allichon, V. Ortiz, P. Pousinha, A. Andrianarivelo, A. Petitbon, N. Heck, P. Trifilieff, J.

Barik, P. Vanhoutte, Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse. *Front. Synaptic Neurosci.* **13** (2021) (available at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2021.799274>).

17. C. Soares-Cunha, B. Coimbra, N. Sousa, A. J. Rodrigues, Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **68**, 370–386 (2016).
18. D. A. Burke, H. G. Rotstein, V. A. Alvarez, Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition. *Neuron.* **96**, 267–284 (2017).
19. A. Andrianarivelo, E. Saint-Jour, P. Pousinha, S. P. Fernandez, A. Petitbon, V. De Smedt-Peyrusse, N. Heck, V. Ortiz, M.-C. Allichon, V. Kappès, S. Betuing, R. Walle, Y. Zhu, C. Joséphine, A.-P. Bemelmans, G. Turecki, N. Mechawar, J. A. Javitch, J. Caboche, P. Trifilieff, J. Barik, P. Vanhoutte, Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Sci. Adv.* **7**, eabg5970.
20. E. Cahill, V. Pascoli, P. Trifilieff, D. Savoldi, V. Kappès, C. Lüscher, J. Caboche, P. Vanhoutte, 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. X.-Y. Liu, X.-P. Chu, L.-M. Mao, M. Wang, H.-X. Lan, M.-H. Li, G.-C. Zhang, N. K. Parekar, E. E. Fibuch, M. Haines, K. A. Neve, F. Liu, Z.-G. Xiong, J. Q. Wang, Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron.* **52**, 897–909 (2006).
22. R. Correia, B. Coimbra, A. V. Domingues, M. Wezik, N. Vieitas-Gaspar, R. Gaspar, N. Sousa, L. Pinto, A. J. Rodrigues, C. Soares-Cunha, Involvement of nucleus accumbens D2–medium spiny neurons projecting to the ventral pallidum in anxiety-like behaviour. *J. Psychiatry Neurosci.* **48**, E267–E284 (2023).
23. O. Berton, C.A. McClung, R.J. Dileone, V. Krishnan, W. Renthal, S.J. Russo, D. Graham, N.M. Tsankova, C.A. Bolanos, M. Rios, L.M. Monteggia, D. W Self, E.L. Nestler, Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science.* **311**, 864–868 (2006)
24. S. Ross, E. Peselow, Co-Occurring Psychotic and Addictive Disorders: Neurobiology and Diagnosis. *Clin. Neuropharmacol.* **35**, 235–243 (2012).
25. T. M. Kelly, D. C. Daley, Integrated Treatment of Substance Use and Psychiatric Disorders. *Soc. Work Public Health.* **28**, 388–406 (2013).
26. R. R. Lalchandani, S. Vicini, Inhibitory collaterals in genetically identified medium spiny neurons in mouse primary corticostriatal cultures. *Physiol. Rep.* **1**, e00164 (2013).
27. L. K. Dobbs, J. C. Lemos, V. A. Alvarez, Restructuring of basal ganglia circuitry and associated behaviors triggered by low striatal D2 receptor expression: implications for substance use disorders. *Genes Brain Behav.* **16**, 56–70 (2017).
28. D. A. Burke, V. A. Alvarez, Serotonin receptors contribute to dopamine depression of lateral inhibition in the nucleus accumbens. *Cell Rep.* **39** (2022), doi:10.1016/j.celrep.2022.110795.
29. A. Z. Harris, P. Atsak, Z. H. Bretton, E. S. Holt, R. Alam, M. P. Morton, A. I. Abbas, E. D. Leonardo, S. S. Bolkan, R. Hen, J. A. Gordon, A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. *Neuropsychopharmacology.* **43**, 1276–1283 (2018).
30. V. Ortiz, C. Campos, H. Foto, S.P. Fernandez, J. Barik, Nicotinic receptors promote susceptibility to social stress in female mice linked with neuroadaptations within VTA dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology.* **47**, 1587–1596 (2022).
31. W. M. Cox, J. E. Mertz, A test for successive incentive contrast effects with a highly preferred fluid reward. *Bull. Psychon. Soc.* **23**, 418–420 (1985).
32. V. Ortiz, V. A. Molina, I. D. Martijena, Effect of a positive reinforcing stimulus on fear memory reconsolidation in ethanol withdrawn rats: Influence of d-cycloserine. *Behav. Brain Res.* **315**, 66–70 (2016).
33. A. S. Woods, F. Ciruela, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferré, Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J. Mol. Neurosci.* **26**, 125–132 (2005).
34. T. Hikida, K. Kimura, N. Wada, K. Funabiki, S. Nakanishi, Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron.* **66**,

896–907 (2010).

35. M. Dos Santos, M. Salery, B. Forget, M. A. Garcia Perez, S. Betuing, T. Boudier, P. Vanhoutte, J. Caboche, N. Heck, Rapid Synaptogenesis in the Nucleus Accumbens Is Induced by a Single Cocaine Administration and Stabilized by Mitogen-Activated Protein Kinase Interacting Kinase-1 Activity. *Biol. Psychiatry*. **82**, 806–818 (2017).

36. A. Dumais, A. d. Lesage, M. Alda, G. Rouleau, M. Dumont, N. Chawky, M. Roy, J. j. Mann, C. Benkelfat, G. Turecki, Risk Factors for Suicide Completion in Major Depression: A Case-Control Study of Impulsive and Aggressive Behaviors in Men. *AJP*. **162**, 2116–2124 (2005).

37. J. K. Mai, G. Paxinos, T. Voss, *Atlas of the human brain* (Elsevier, Acad. Press, Amsterdam, 3. ed., 2008)

ACKNOWLEDGMENTS

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 Côte d'Azur, Agence Nationale pour la Recherche (ANR-18-CE37-0003-02 to J.B and P.V ; ANR-19-CE16-0003-01 to NH and PV); Institut de Recherche en Santé publique (IReSP) Aviesan APP-addiction 2019 (to P.V and J.B) ; the fondation pour la recherche médicale (FRM; DEQ20180339159 to J.B). The Douglas-Bell Canada Brain Bank is funded by platform support grants from the RQSHA and HBHL (CFREF). M.C.A is 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, Paris).

MAIN FIGURES AND LEGENDS

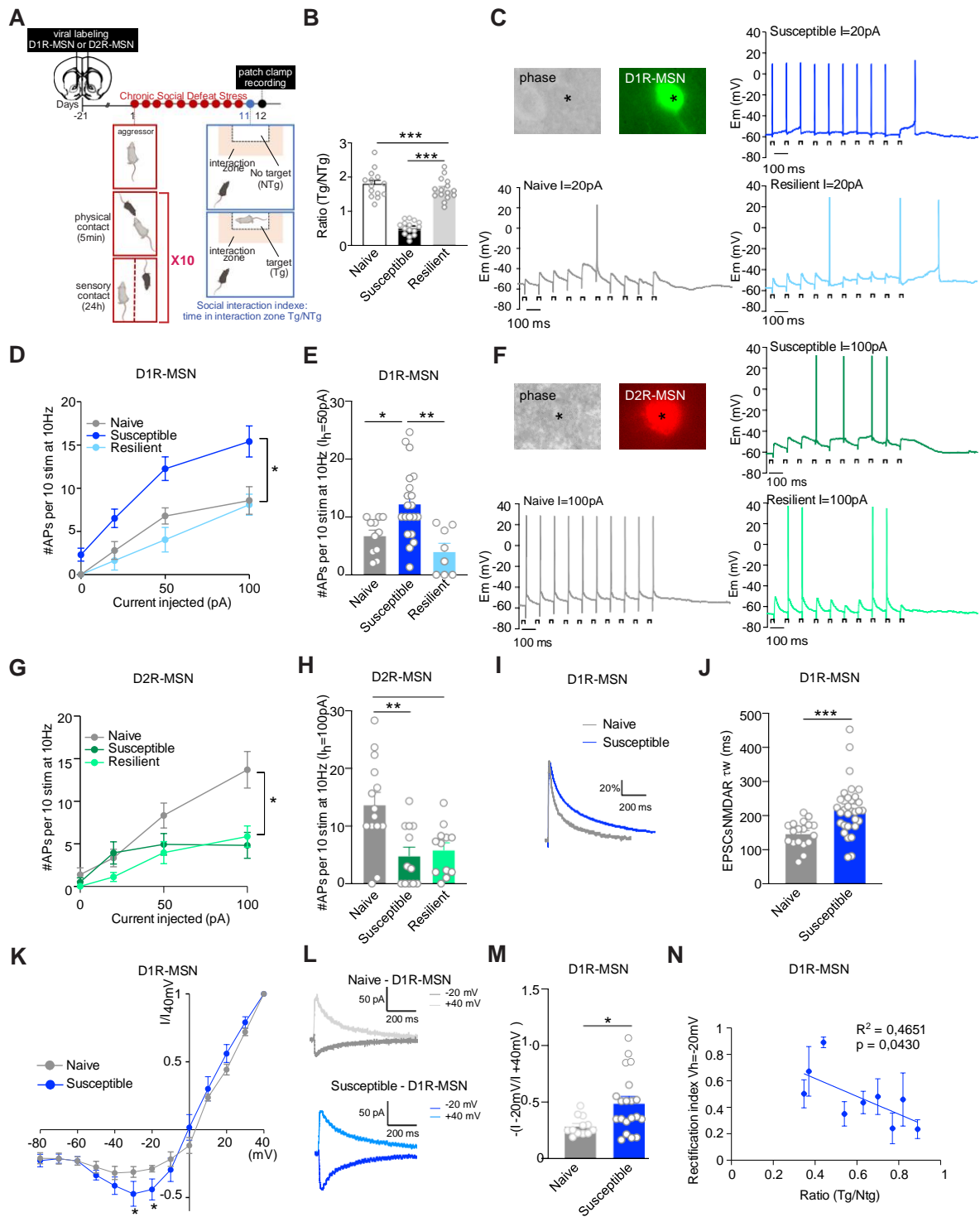


Figure 1 – Increased NMDAR function in D1R-MSN correlates with susceptibility to depression.

A. Schematic of the experimental timeline with social defeat procedure. **B.** Susceptible mice displayed social avoidance, while resilient males showed similar social interaction ratio than naive mice ($F(2,41)=71.54$, $***P<0.0001$, One-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n=14$ to 15 mice per group). **C.** Example trace of synaptic signal integration in neurons (asterisk) expressing

GFP [i.e., D1R-MSN], from the different mice groups. **D.** Susceptible mice show increased discharge probability profile, relative to naïve and resilient mice, at the different imposed depolarizing current steps [$F(1.237, 3.712)=17,69$, $*P=0.0148$, Repeated measures One-Way ANOVA, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=11$ to 20 cells per group), as shown in **E.** with holding current (I_h) = 50pA ($F(2,36) = 8.878$, $*P=0.0182$, $**P=0.0013$, One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=11$ to 20 cells per group). **F.** Example trace of synaptic signal integration in neurons (asterisk) expressing RFP [i.e., D2R-MSN], from the different mice groups. **G.** Susceptible and resilient mice show decreased discharge probability profile, relative to naïve mice, at imposed depolarizing current steps higher than 50pA [$F(2,6)=6.922$, $*P=0.0225$, Repeated measures One-Way ANOVA, $n= 3$ to 4 mice per group and $n=12$ to 14 cells per group), as shown in **H.** with holding current (I_h) = 100pA ($F(2,35) = 8.066$, $**P=0.0025$, One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n= 3$ to 4 mice per group and $n=12$ to 14 cells per group). **I.** Comparison of representative NMDAR EPSCs, normalized to the peak amplitude (in %), in D1R-MSN, from naïve and susceptible mice, illustrating differences in deactivation kinetics. **J.** NMDAR EPSC in D1R-MSN from susceptible mice show significant increase in τ_{weighted} constant, (i. e. deactivation time course) in comparison to naïve mice [$F(30,17) = 4.082$, $***P=0.0006$, Unpaired t test, two-tailed ($t=3.688$, $df=47$), $n=6$ to 9 mice per group and $n=18$ to 31 cells per group]. **K.** Current–voltage relationship from pharmacologically isolated NMDAR EPSCs in D1R-MSN from susceptible and naïve mice. Amplitudes of currents were normalized to the value measured at +40 mV (I_{norm}); points are mean \pm SEM. **L.** Representative currents recorded from the D1R-MSN shown in K in response to hyperpolarizing and depolarizing steps at -20 and $+40$ mV. **M.** The NMDAR EPSC $-20\text{mV}/+40\text{mV}$ ratio is significantly increased in D1R-MSN from susceptible mice [$F(19, 11)=9.752$, $*P=0.0145$, Unpaired t test, two-tailed ($t=2.595$, $df=30$), $n=4$ to 7 mice per group and $n=12$ to 20 cells per group]. **N.** Pearson correlation between social avoidance score and averaged NMDAR EPSCs rectification index at $V_h=-20\text{mV}$. All data are expressed as the mean \pm SEM.

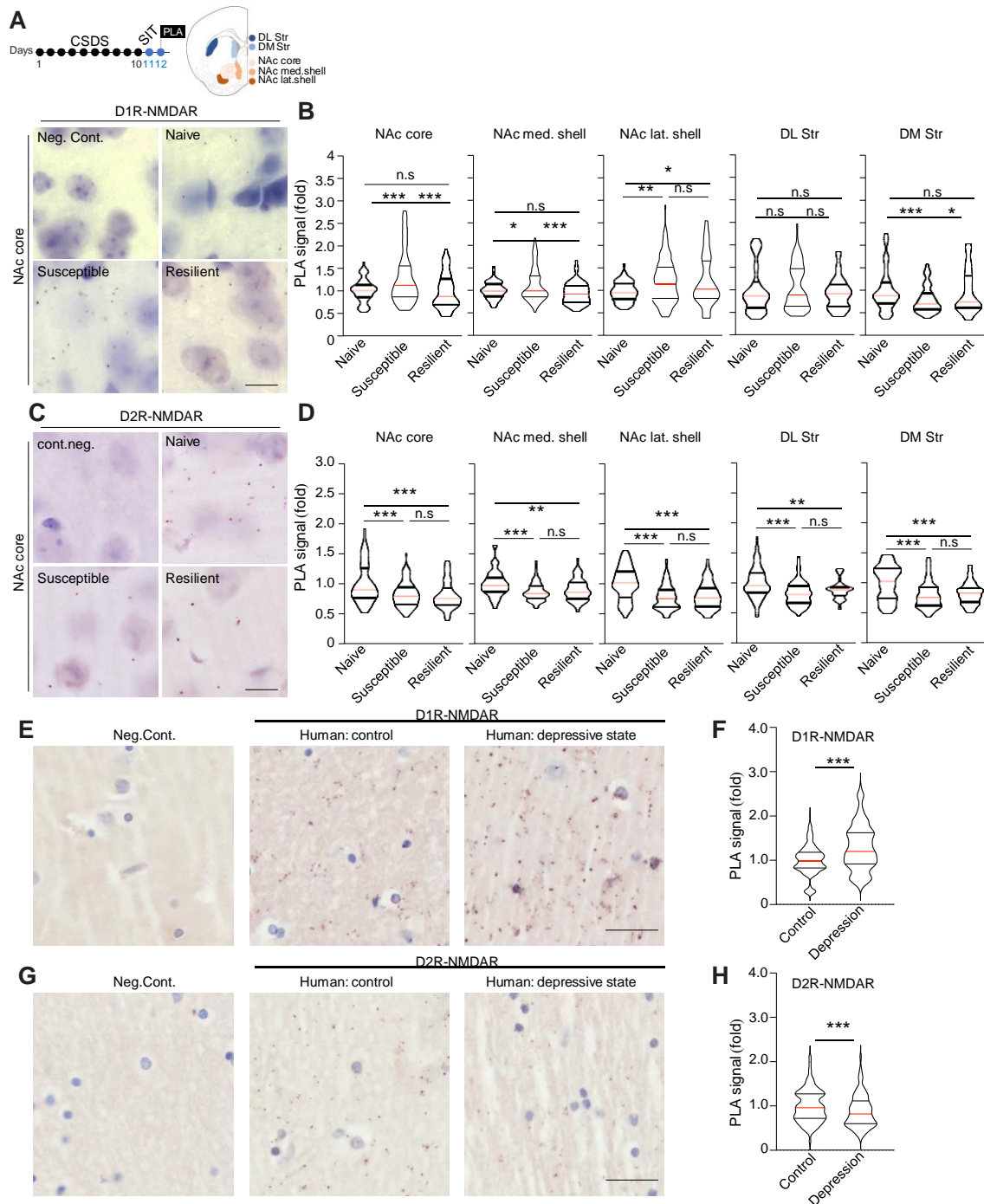


Figure 2 – From mice to humans, depressive-like symptoms are associated with an increased D1R-NMDAR heteromerization in the NAc. A-top. Experimental time frame of chronic social defeat stress (CSDS), social interaction test (SIT), and Proximity ligation assay (PLA). DL Str: dorso-lateral striatum; DM Str: dorso-medial striatum; nucleus accumbens core: NAc core; nucleus accumbens medial-shell: NAc med. Shell and nucleus accumbens lateral-shell: NAc lat. shell. **A-bottom.** Representative images of D1R-NMDAR proximity through PLA in the NAc core of naive, susceptible and resilient mice. As a negative control (Neg. Cont.), the PLA procedure has been performed in the absence of anti-NMDAR1 antibody, which yield no proximity signal,

as expected. Scale bar: 10 μm **B.** Quantifications of the PLA signal displayed as the fold-induction relative to naïve mice in the five striatal subregions analyzed. One-way ANOVA followed by Bonferroni Post hoc test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. $N = 7$ naïve mice, $N = 14$ susceptible mice, $N = 5$ resilient mice. $n = 84$ fields of view/structure in naïve mice; $n = 168$ fields of view/structure in susceptible mice; $n = 60$ fields of view/structure in resilient mice. **C-D.** Same as A and B in the case of D2R-NMDAR proximity. **E.** Representative images of D1R-NMDAR PLA detection from human post mortem NAc samples from depressed subjects and matched controls, as well as the related negative control. Scale bar: 25 μm . **F.** Quantifications of the D1R-NMDAR PLA signal displayed as the fold-induction relative to control samples. Two-sided Mann-Whitney test, *** $P < 0.001$. $N = 14$ control subjects corresponding to 325 fields of view; $N = 15$ depressed subjects corresponding to 350 fields of view. **G-H.** Same as E and F. Two-sided Mann-Whitney test, *** $P < 0.001$. $N = 14$ control subjects corresponding to 325 fields of view; $N = 14$ depressed subjects corresponding to 325 fields of view.

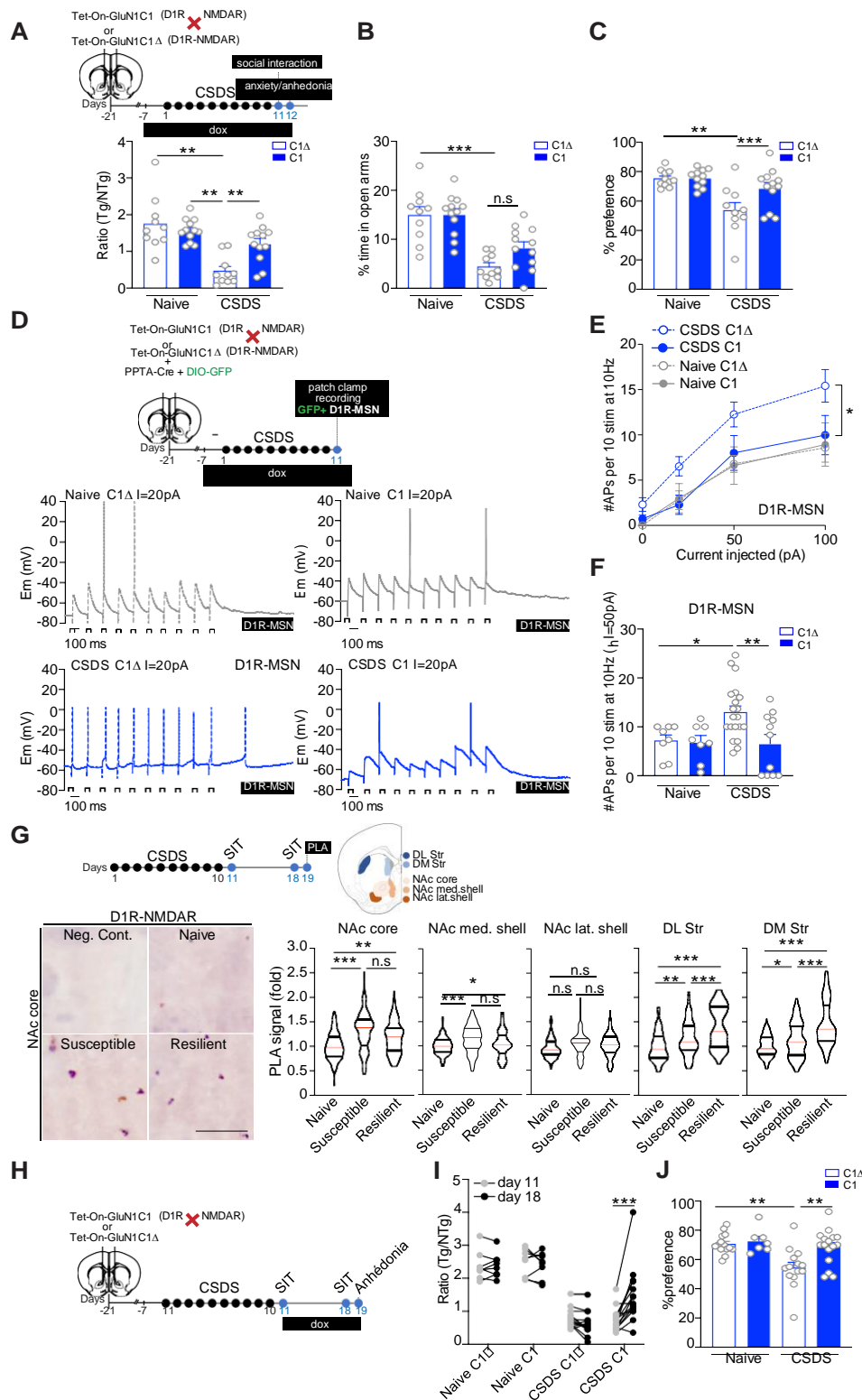


Figure 3 – Disruption of D1R/NMDAR complexes in the NAc reverts depressive-like behavior and cellular maladaptation.

A. Schematic of the experimental timeline with social defeat procedure. D1R-NMDAR complexes disruption during social defeat **B.** prevented the increased social avoidance observed in defeated mice

[Interaction, $F(1,40) = 9.138$, $**P=0.0044$, Two-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n=10$ to 12 mice per group], **C.** failed to reestablish anxiety levels [Interaction, $F(1,40)=2.050$, $P=0.1600$, Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $***P<0.0001$, $n=10$ to 12 mice per group] and **D**; normalized anhedonia [Interaction, $F(1,40) = 4.525$, $*P=0.0396$, Two-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n=10$ to 12 mice per group]. **D.** Top: Experimental time frame. Bottom: Example trace of synaptic signal integration in neurons expressing GFP [i.e., D1R-MSN], in the presence of disrupting peptide C1 or its control: C1 Δ , from naïve and susceptible mice groups. **E.** The increased discharge probability profile, observed in susceptible mice was significantly prevented by D1R-NMDAR disruption during social defeat [$F(0.9389, 3.443)=18.41$, $*P<0.05$, Mixed-effects analysis, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=10$ to 20 cells per group), as shown in **F.** with holding current (I_h) = 50pA [Interaction, $F(1,49) = 5.149$, $*P=0.0277$, Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $*P=0.0106$ and $**P=0.0074$, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=11$ to 20 cells per group]. All data are expressed as the mean \pm SEM. **G.-top.** Experimental time frame of chronic social defeat stress (CSDS), social interaction test (SIT), and Proximity ligation assay (PLA). DL Str: dorso-lateral striatum; DM Str: dorso-medial striatum; nucleus accumbens core: NAc core; nucleus accumbens medial-shell: NAc med. Shell and nucleus accumbens lateral-shell: NAc lat. shell. **G-bottom left.** Representative images of D1R-NMDAR proximity through PLA in the NAc core of naïve, susceptible and resilient mice one week after CSDS. As a negative control (Neg. Cont.), the PLA procedure has been performed in the absence of anti-NMDAR1 antibody, which yield no proximity signal, as expected. **G-bottom right.** Quantifications of the PLA signal displayed as the fold-induction relative to naïve mice in the five striatal subregions analyzed. One-way ANOVA followed by Bonferroni Post hoc test. $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$. $N = 7$ naïve mice, $N = 10$ susceptible mice, $N = 6$ resilient mice. $n = 84$ fields of view/structure in naïve mice; $n = 120$ fields of view/structure in susceptible mice; $n = 72$ fields of view/structure in resilient mice. **H** Experimental time frame. D1R-NMDAR complexes disruption after social defeat **I.** rescued the increased social avoidance observed in defeated mice [Interaction, $F(3,41) = 13.07$, $***P<0.0001$, Repeated Measures Two-Way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test, $n=8$ to 15 mice per group], and **J**; anhedonia [Interaction, $F(1,47) = 3.535$, $P=0.0663$, Two-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $**P=0.0016$, $**P=0.0048$, $n=7$ to 16 mice per group]. All data are expressed as the mean \pm SEM.

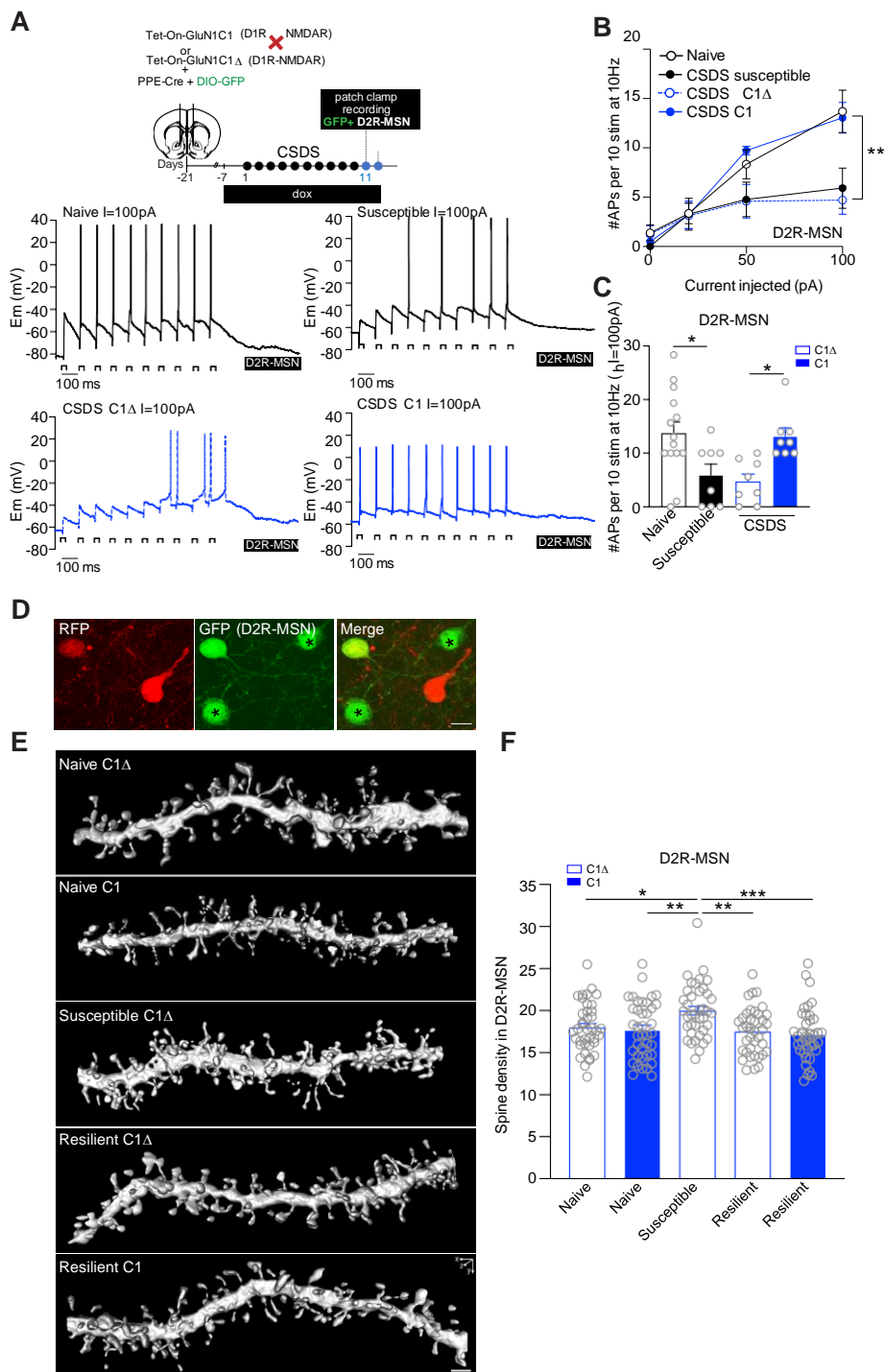


Figure 4 – Disrupting D1R-NMDAR heteromerization prevents the impact of chronic stress on both NAc D1R- and D2R-MSN.

A-Top. Experimental time frame to disrupt or not D1R-NMDAR heteromerization during CSDS and label D2R-MSN with GFP. **A-Bottom.** Example trace of synaptic signal integration in neurons expressing GFP [i.e., D2R-MSN], in the neighborhood of D1R-MSN expressing the disrupting peptide C1 or its control: C1 Δ , from naïve and susceptible mice groups. **B.** The decreased discharge probability

profile, observed in susceptible mice was significantly prevented by D1R-NMDAR disruption during social defeat [Multiple t test, $**P=0.011$, $t=2.940$, $df=14$, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=8$ to 14 cells per group), as shown in **C**. with holding current (I_h) = 100pA [$F(3,34) = 5.388$, $**P=0.0038$, One-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test, $*P=0.0322$ and $*P=0.0407$, $n= 3$ to 5 mice per group and $n=8$ to 14 cells per group]. All data are expressed as the mean \pm SEM. **D**. Low-magnification images of neurons infected with Tet-On visualized with RFP and D2R-MSN expressing GFP. Dendritic spine density was analyzed in GFP-positive D2R-MSN. GFP-positive (indicated by the star). Scale bar: $10\ \mu\text{m}$. **E**. Illustrative high-magnification images and 3D-rendering of D2R-MSN dendritic fragments from the 5 experimental groups analyzed. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$. **F**. Quantifications of dendritic spine density in D2R-MSN. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni Post hoc test. $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$. $N = 4$ mice and $n = 39$ dendritic fragments for the Naïve C1 Δ , Naïve C1 and Susceptible C1 Δ groups. $N = 4$ mice and $n = 38$ dendritic fragments for the resilient C1 and resilient C1 Δ groups.

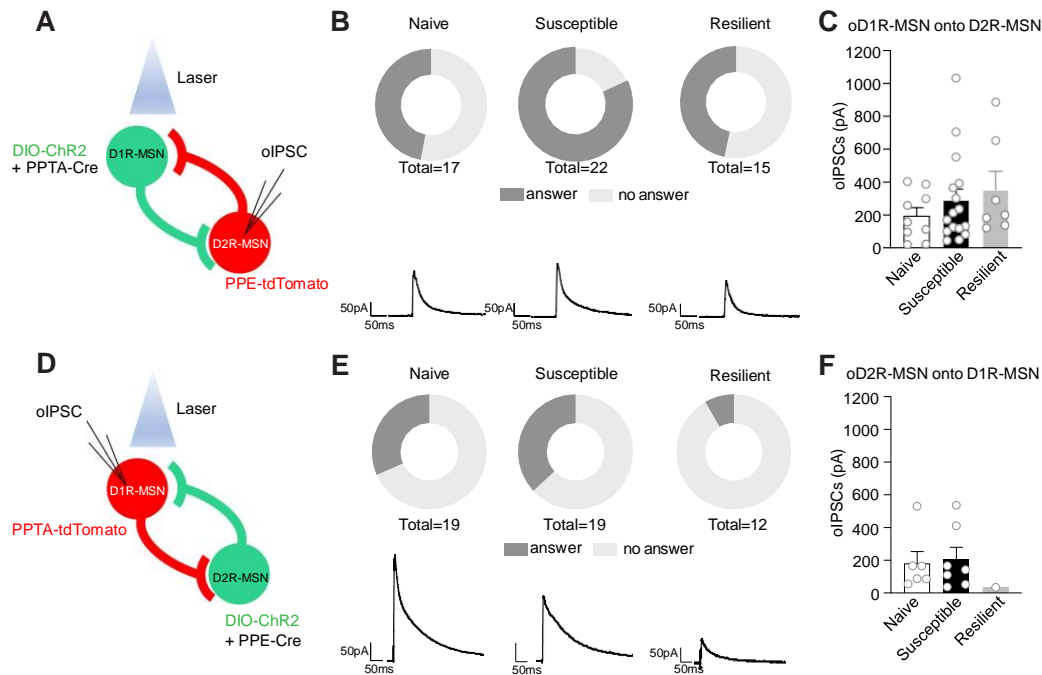


Figure 5 - Chronic social defeat promotes a cellular imbalance in the NAC.

A. Schematic of the experimental optoactivation strategy. **B.** Susceptible mice show increased percentage of D2R-MSN answering to opto-activation of D1R-MSN, in comparison to both naïve and resilient mice (Contingency Chi-square, Chi-square=6.699, df=2, *P=0.0351). **C.** GABA A sensitive currents recorded in B (bottom) show similar oIPSCs amplitude among groups. **D.** Schematic of the experimental optoactivation strategy. D2R-MSN answered to opto-activation of D1R-MSN with **E.** similar percentage of synaptic responses (Contingency Chi-square, Chi-square=3.160, df=2, P=0.2060) and **F.** of oIPSC amplitude, independently of mice group. All data are expressed as the mean ± SEM.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGEND

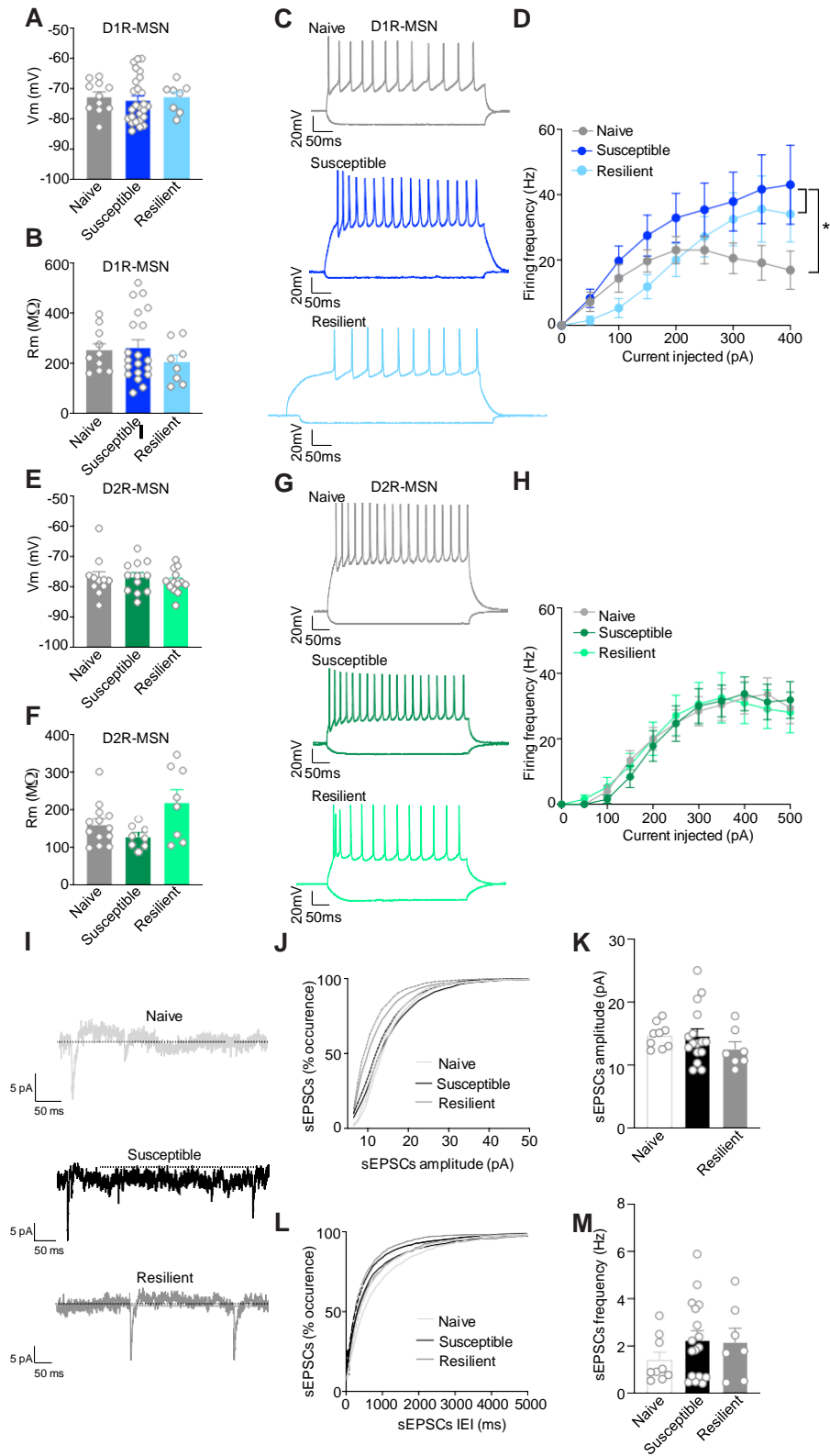


Figure S1: Impact of chronic social stress on intrinsic properties of NAc D1R- and D2R-MSN

D1R-MSN in the NAc from naïve, susceptible and resilient mice show similar (A.) resting membrane (Vm) and (B.) the membrane resistance (Rm) [n=3 to 8 mice per group and n=8 to 26 cells per group]. C. Samples of hyperpolarizing steady state (bottom) and AP trains (up) in response to -100 pA and 350 pA current steps, respectively. D. NAc D1R-MSN intrinsic excitability is increased in susceptible mice in comparison to naïve mice. [Treatment: $F(1.103, 8.827) = 8.790$, * $P = 0.0147$, One-Way ANOVA repeated measure, n= 3 to 8 mice per group and n= 8 to 18 neurons per group]. D2R-MSN in the NAc from naïve, susceptible and resilient mice show similar (E.) resting membrane (Vm) and (F.) the membrane resistance (Rm) [n=3 to 4 mice per group and n=11 to 13 cells per group]. G. Samples of hyperpolarizing steady state (bottom) and AP trains (up) in response to -100 pA and 300 pA current steps, respectively. H. NAc D2R-MSN intrinsic excitability is similar among studied mice groups [n= 3 to 4 mice per group and n= 8 to 13 neurons per group]. I. Representative traces of sEPSC. No alterations were observed in the (J.) cumulative frequency distribution histogram of EPSCs amplitude neither in the (K.) EPSCs amplitude average, in D1R-MSN from the different mice groups. L. D1R-MSN Cumulative frequency distribution histogram of EPSCs inter-event interval (IEI). M. D1R-MSN sEPSCs average frequency. [n=3 to 6 mice per group and 8 to 18 cells per group). All data are expressed as the mean \pm SEM.

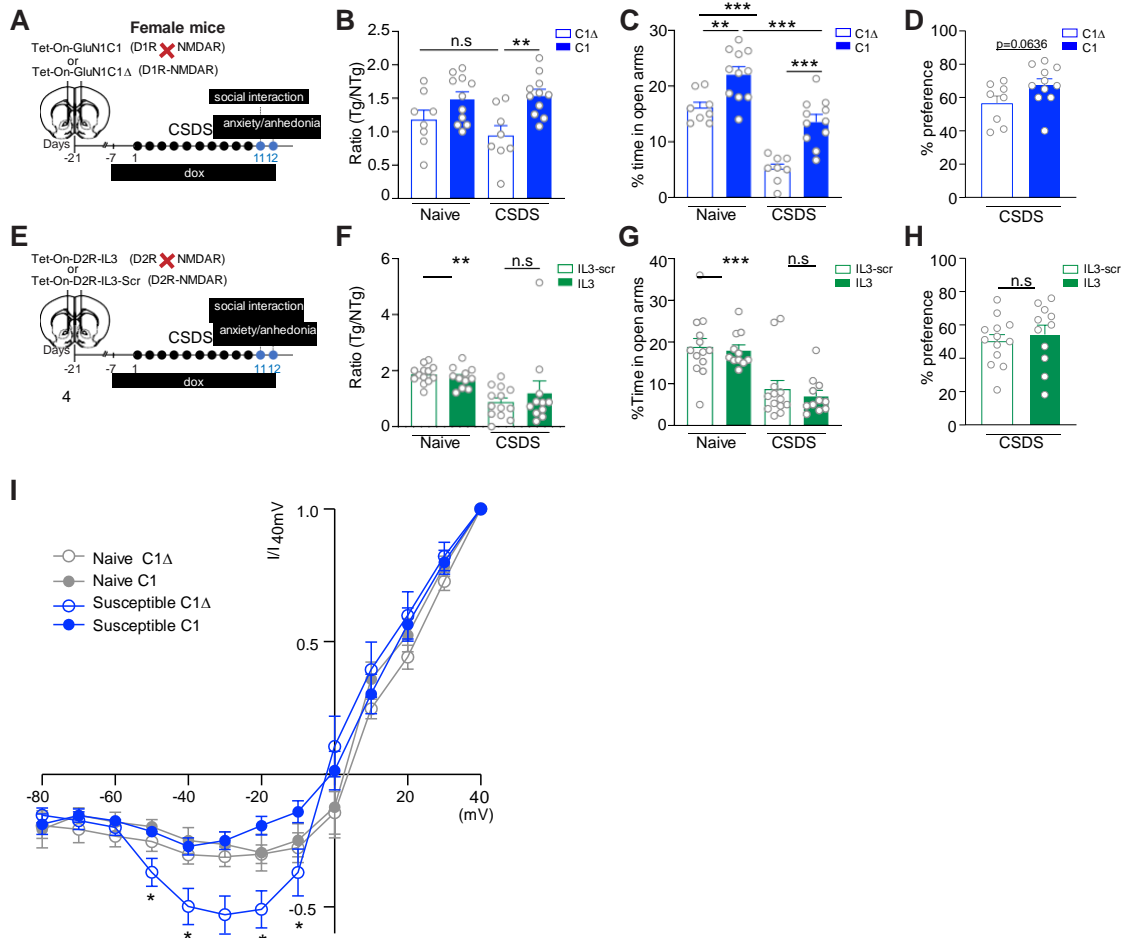


Figure S2: Role of D1R-NMDAR heteromerization in females and D2R-NMDAR interaction in males on the development of depressive-like symptoms. **A.** Schematic of the experimental timeline with social defeat procedure. D1R-NMDAR complexes disruption in females during social defeat **B.** prevented the increased tendency of social avoidance observed in defeated mice [Interaction, $F(1,34) = 1.443$, $P = 0.2379$, Two-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $**P = 0.0064$, $n = 8$ to 11 mice per group], **C.** anxiety levels [Interaction, $F(1,34) = 1.005$, $P = 1.005$, Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, $n = 8$ to 11 mice per group] and **(D)**; shows a tendency to rescue sucrose preference [$F(7,10) = 1.077$, $P = 0.00636$, Unpaired t test two-tailed, $n = 8$ to 11 mice per group]. **E.** Experimental time frame. D2R-NMDAR complexes disruption by IL3 had no effect on **(F)**; social interaction, **(G.)** anxiety or **(H.)** sucrose preference [$n = 11$ to 13 mice per group]. **I.** Current-voltage relationship from pharmacologically isolated NMDAR EPSCs in D1R-MSN from susceptible and naïve mice. Recordings were performed with the disruption peptide C1 or its control C1 Δ , inside the recording pipette. Amplitudes of currents were normalized to the value measured at +40 mV (I_{norm}); points are mean \pm SEM. The NMDAR EPSC -20mV/+40mV ratio is significantly increased in D1R-MSN from susceptible mice whenever recordings were performed with C1 Δ , but rescued by adding the D1R-NMDAR complexes disruption C1 peptide. [Interaction $F(36, 384) = 2.370$, $****P < 0.0001$, Two

way repeated measures ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons, n=3 to 5 mice per group and n=8 to 13 cells per group]. **J.** Representative currents recorded from the D1R-MSN shown in I. in response to hyperpolarizing and depolarizing steps at -20 and $+40$ mV. All data are expressed as the mean \pm SEM.

Samples from depressed subjects									
Sex	Age	Cause of death	PMI (h)	pH	Simplified Axis 1	Axis 1 Dependence	Substance at death	last 3 months med	Substance abuse
Male	48	Natural	87,53	6,18	Depressive disorder NOS	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	44	Suicide	79,32	6,27	MDD	Nil	Cannabis	Nil	Abuse
Male	37	Suicide	62,88	6,44	MDD	Nil	Alcohol	Nil	Abuse
Male	41	Suicide	62,02	6,39	MDD	Nil	Alcohol	Nil	No Abuse
Male	53	Suicide	78,55	6,36	Depressive disorder NOS	Nil	Cannabis metabolites	Nil	No Abuse
Male	62	Natural	59,22	6,31	MDD	Nil	Cannabis metabolites	Nil	No Abuse
Male	27	Suicide	61,88	N/A	Depressive disorder NOS	Nil	Cannabis metabolites	Nil	Abuse
Male	61	Suicide	75,40	6,21	Depressive disorder NOS	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	38	Suicide	42,00	6,42	Depressive disorder NOS	Nil	Antidepressant (SSRI)	Unknown antidepressant	No Abuse
Male	48	Suicide	41,50	6,38	MDD	Nil	Nil	Nil	Abuse
Male	54	Suicide	54,00	6,29	MDD	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	25	Suicide	50,50	6,21	Depressive disorder NOS	Nil	Cannabis	Nil	No Abuse
Female	60	Suicide	41,59	6,02	MDD	Nil	Nil	SSRI	No Abuse
Male	41	Accidental	53,00	6,08	MDD	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Female	47	Suicide	53,50	6,34	Depressive disorder NOS	Nil	Antihistaminic toxic dose	Nil	No Abuse
Control samples									
Sex	Age	Cause of death	PMI (h)	pH	Simplified Axis 1	Axis 1 Dependence	Substance at death	last 3 months med	Abuse score
Male	45	Natural	97,52	6,36	Nil	Nil	Nil	Sedative/Hypnotic	No Abuse
Male	30	Accidental	57,82	5,95	Nil	Nil	Alcohol , GHB	Nil	N/A
Male	46	Accidental	42,25	6,28	Nil	Nil	Nil	Hypnotic	N/A
Female	55	Natural	65,00	N/A	Nil	Nil	Alcohol	Nil	No Abuse
Female	54	Natural	85,25	6,19	Nil	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	25	Natural	44,50	5,90	Nil	Nil	Morphine, Cannabis metabolites	Nil	No Abuse
Male	36	Accidental	49,00	6,32	Nil	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	54	Accidental	54,50	6,30	Nil	Nil	Nil	Nil	N/A
Male	68	Natural	37,50	6,25	Nil	Nil	N/A	Nil	No Abuse
Female	38	Natural	43,00	5,91	Nil	Nil	Nil	Nil	N/A
Male	46	Natural	48,00	N/A	Nil	Nil	Nil	Nil	Abuse
Male	45	Natural	35,50	6,19	Nil	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	59	Natural	42,00	6,40	Nil	Nil	Nil	Nil	No Abuse
Male	45	Natural	55,50	5,70	Nil	Nil	Nil	Nil	No Abuse

Résultats partie II

Rôle des hétéromères formés entre les récepteurs de la dopamine et du glutamate dans les adaptations cellulaires et comportementales induites par la morphine

Introduction

L'addiction se caractérise par des schémas compulsifs de recherche et de prise de drogue malgré les conséquences néfastes et un taux élevé de rechute après l'abstinence. Une caractéristique des substances addictives est leur capacité à augmenter la concentration de dopamine (DA) dans des régions cérébrales spécifiques, ce qui module de manière persistante la transmission excitatrice du glutamate au sein du circuit de la récompense, détournant ainsi le traitement naturel des récompenses (Lüscher and Malenka, 2011; Salery et al., 2020).

Les altérations comportementales durables induites par une exposition prolongée aux drogues résultent en grande partie de neuro-adaptations évoquées par les drogues dans le striatum, en particulier dans sa partie ventrale, le noyau accumbens (NAc) (Lüscher and Malenka, 2011; Volkow and Morales, 2015). Le striatum est une structure cible des drogues d'abus qui intègre des entrées convergentes de glutamate en provenance de régions limbiques, thalamiques et corticales, encodant des éléments liés aux stimuli et à l'environnement associés à la drogue, ainsi que des signaux dopaminergiques qui codent l'erreur de prédiction de récompense et la saillance d'un stimulus (Hyman et al., 2006). L'intégration des signaux DA et glutamatergiques est réalisée par les deux sous-populations majoritairement ségréguées de neurones épineux moyens (MSN) GABAergiques exprimant soit le récepteur de la dopamine de type 1 (D1R) soit le récepteur de type 2 (D2R). Les manipulations de l'activité neuronale des D1R-MSN ou D2R-MSN par optogénétique ou chémogénétique ont montré que l'inhibition et l'activation des D1R-MSN respectivement atténuaient et potentialisaient les réponses évoquées par les psychostimulants, tels que la cocaïne et l'amphétamine, en accord avec leur action « pro-récompense » (Ferguson et al., 2011; Hikida et al., 2010; Kravitz et al., 2012; Lobo et al., 2010; Salery et al., 2020). En revanche, la majorité des études soutient un rôle inhibiteur de l'activation des D2R-MSN sur les adaptations induites par les psychostimulants (Bock et al., 2013; Durieux et al., 2012, 2009; Ferguson et al., 2011; Hikida et al., 2010). Ces études, basées sur des manipulations directes de l'activité des MSN, ont été essentielles pour mettre en évidence le rôle des MSN en tant qu'acteurs potentiels dans les adaptations comportementales induites par les substances addictives. Toutefois, elles n'établissent pas les mécanismes moléculaires par lesquels les drogues d'abus impactent chaque sous-population de MSN.

Dans ce contexte, il apparaissait donc opportun d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels l'augmentation de la DA provoquée par la drogue peut moduler de manière durable la transmission glutamatergique des D1R-MSN et D2R-MSN. Dans une étude menée au laboratoire (**Article Annexe I**), nous nous sommes intéressés aux rôles des complexes hétéromériques (i. e liaison physique directe) formés entre les récepteurs de la DA (DAR) et du glutamate de type NMDA (NMDAR) dans les réponses induites par la cocaïne. En effet, ces hétéromères ont été proposés comme étant des intégrateurs des signaux DA et glutamatergiques dans les deux populations de MSN (Andrianarivelo et al., 2019; Cahill et al., 2014; Liu et al., 2006).

Ces hétéromères de récepteurs sont particulièrement intéressants, non seulement en raison de leur capacité à moduler dynamiquement les fonctions des récepteurs partenaires, mais aussi parce qu'ils présentent des propriétés fonctionnelles distinctes des récepteurs individuels, ce qui en fait des cibles attractives pour le développement de stratégies pharmacologiques plus sélectives (Borrito-Escuela et al., 2018; Ferré et al., 2011; Fuxe et al., 2014; Wang et al., 2012). A cet égard, mon équipe d'accueil a contribué à montrer que l'interaction des D1R avec la sous-unité GluN1 des NMDAR était nécessaire à la facilitation des courants NMDAR par la DA dans les D1R-MSN *ex vivo* dans le striatum (Cahill et al., 2014), alors que d'autres équipes ont établi que l'interaction de D2R avec les sous-unités GluN2B des NMDAR était responsable de l'inhibition des NMDAR par la DA dans les D2R-MSN (Liu et al., 2006). Toutefois le rôle de ces deux types d'hétéromères dans les adaptations à long terme induites par la cocaïne *in vivo* restait inconnu.

Nous avons développé la technique de *Proximity Ligation Assay* pour détecter ces complexes *in situ* sur coupe de cerveau (voir [Article I](#) et article [Annexe I](#)) ce qui nous a permis de montrer, aussi bien chez la souris que chez l'Homme, que l'exposition aux psychostimulants favorise l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans le NAc. Grâce au développement d'une approche virale permettant le blocage des interactions D1R-NMDAR ou D2R-NMDAR de manière contrôlée dans le temps, nous avons établi que l'hétéromérisation D1R-NMDAR contrôle le développement des adaptations cellulaires, moléculaires et comportementales induites par la cocaïne alors que l'hétéromérisation D2R-NMDAR contrôle à la fois le développement et le maintien de ces réponses. Cet effet semble spécifique des drogues car inhiber l'un ou l'autre de ces hétéromères n'altère pas les comportements guidés par une récompense naturelle, telle que la nourriture (Andrianarivelo et al., 2021; article [Annexe I](#)).

Ces observations suggèrent que cibler les hétéromères DAR-NMDAR pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour le développement de futurs traitements dans le domaine des addictions aux substances. Toutefois, ces résultats ont été obtenus dans le contexte de l'exposition à un psychostimulant, la cocaïne, et cette partie de mon travail a consisté à définir si les hétéromères DAR-NMDAR contrôlaient les réponses induites par une autre classe de drogue. Aux vues de la crise des opiacés que traverse les États Unis actuellement, où la prescription médicale d'opiacés à des fins thérapeutiques en raison de leurs puissantes propriétés analgésiques, conduit à des phénomènes d'addiction et à des décès par overdose, j'ai étudié le rôle de ces complexes de récepteurs dans les réponses induites par la morphine.

Une particularité des opiacés est d'induire des symptômes somatiques extrêmement déplaisants. Ainsi, la poursuite de leur consommation est tout autant liée aux effets renforçants liés à leur consommation qu'à la reprise de la consommation pour éviter les symptômes de sevrage (Keyes et al., 2020; Wise and Koob, 2014). Dans ce contexte, j'ai mis au point des protocoles permettant d'étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans le NAc dans les propriétés renforçantes de la morphine, le développement des signes somatiques liés au sevrage, et nous étudierons l'impact du ciblage de ces complexes de récepteurs sur les propriétés analgésiques de cette drogue. Mes résultats montrent d'ores et déjà que l'hétéromérisation D2R-NMDAR induite par la morphine dans le NAc contrôle les propriétés renforçantes de cette drogue.

Matériels et Méthodes

Animaux

Des souris mâles C57BL/6J âgées entre 5 et 8 semaines ont été fournies par le laboratoire Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Les animaux ont été stabulés à raison de quatre par cage, dans un cycle de 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, dans des conditions de température (22°C) et d'humidité (60%) stables, avec un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Ils ont été acclimatés à l'animalerie pendant au moins une semaine avant le début des expérimentations. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives éthiques standard [Directive du Conseil de la Communauté européenne sur le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (86/609/CEE) et le Comité national français (2010/63)].

Traitements

Les composés ont été administrés par voie intrapéritonéale ou par voie sous-cutanée dans un volume de 10 ml/kg. La morphine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a été dissoute dans une solution saline [0,9 % (p/v) de NaCl] à la concentration de 10 mg/kg. Le chlorhydrate de 9-tert-butyl dox (9TB-dox ; tebu-bio, Le Perrayen-Yvelines, France) a été dissous dans une solution saline contenant du sulfoxyde de diméthyle (DMSO ; 5%) et du Tween 20 (5%).

Constructions virales

Tous les AAV utilisés sont de sérotype 9. L'AAV-Tet-On-GluN1C1 exprime de manière bicistronique la protéine rapportrice fluorescente RFP et la cassette C1 de la sous-unité GluN1 des NMDAR qui se lie au D1R (₈₆₄DRKSGRAEPDPKKATFRAITSTLASSFKRRSSKDT₉₀₀) lors d'un traitement par doxycycline. Le virus contrôle apparenté AAV-Tet-On-GluN1C1Δ exprime une version tronquée de C1 de neuf acides aminés chargés positivement (₈₉₀SFKRRR₈₉₈), qui sont nécessaires pour l'interaction D1R-NMDAR (Andrianarivelo et al., 2021; Cahill et al., 2014; Woods et al., 2005). L'AAV-Tet-On-D2R-IL3 code une séquence de la troisième boucle intracellulaire (IL3) du D2R (₂₂₅TKRSSRAFRA₂₃₄) interagissant avec la sous-unité GluN2B des NMDAR. L'AAV contrôle correspondant (AAV-Tet-On-D2R-IL3-scr) exprime une séquence mélangée du peptide IL3 (KFARRTSASR) du D2R-IL3 qui n'empêche pas l'interaction D2R-NMDAR. Tous les AAV Tet-On ont été injectés bilatéralement dans le NAc en perfusant 0,7 µl d'une solution à 5.10¹³ particules virales/ml par hémisphère. Les AAV-PPTA-Cre et AAV-PPE-Cre permettent l'expression de la Cre recombinase dont l'expression est dépendante du promoteur de gène de la preprotachykinin (PPTA) ou de la preproenkephaline (PPE) respectivement, qui permettent une expression de la Cre recombinase dans le D1R-MSN et le D2R-MSN, respectivement (Andrianarivelo et al., 2021; Dos Santos et al., 2017). Les AAV PPTA-Cre ou AAV-PPE-Cre ont été co-injectés avec l'AAV-pCAG-DIO-eGFP (Upenn) exprimant l'eGFP, sous le contrôle du promoteur hybride cytomégalovirus/actine (CAG), de manière dépendante de la Cre- recombinase. Pour réaliser un marquage épars des D1R-MSN et D2R-MSN, dans le but d'imager les prolongements dendritiques isolés des sous-populations de MSN, des souris ont été injectées avec le virus DIO-eGFP et l'AAV-PPTA-Cre ou l'AAV-PPE-Cre selon un ratio de 1/8000 (Andrianarivelo et al., 2021; Dos Santos et al., 2017). Tous les virus ont été dilués dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) avec 0,001 % de pluronic.

Injections stéréotaxiques

Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine (150 mg/kg) et de la xylazine (10 mg/kg) et placées sur un appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Les craniotomies ont été réalisées en utilisant les coordonnées suivantes : 1,7 mm rostral par rapport au bregma, 1,2 mm latéral par rapport à la ligne médiane et 4,6 mm ventral par rapport à la surface du crâne pour cibler le NAc. Les injections virales ont été réalisées bilatéralement à un débit de 0,15 µl/min à l'aide d'une seringue de 10 µl (Hamilton 1700 series, PHYMED, Paris, France) et une aiguille de calibre 200 µm (PHYMED, Paris, France) montées sur une pompe à microperfusion (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Après l'injection, l'aiguille a été laissée en place pendant 8 minutes supplémentaires pour éviter le reflux.

Traitements à la doxycycline

Trois semaines après les injections stéréotaxiques des AAV-Tet-On, l'expression des constructions a été déclenchée par une injection intrapéritonéale quotidienne de 9TB-doxycycline (15 mg/kg) pendant 4 jours. En parallèle, les souris ont été supplémentées avec un mélange contenant de la doxycycline-HCl (3 mg/ml), du 9TB-dox HCl (100 µg/ml), et du saccharose (1%) ajouté dans l'eau de boisson 7 jours avant le début des études comportementales et pendant la durée d'expression virale souhaitée pour maintenir l'expression virale.

Sensibilisation locomotrice à la morphine

L'activité locomotrice a été mesurée dans un environnement à faible luminosité à l'intérieur d'un couloir circulaire (cyclotron) (Immetronic, Pessac, France) contenant quatre faisceaux infrarouges placés à chaque angle de 90°. L'activité locomotrice a été exprimée comme le nombre cumulé de passages entre les quartiers du couloir (quart de tour) pendant le temps indiqué. Les souris ont été habituées au cyclotron pendant 3 jours durant 300 minutes (5 heures) et ont reçu une injection intrapéritonéale de saline après 120 minutes. L'activité locomotrice basale a été enregistrée pendant ces trois jours d'habitation. Les expériences de sensibilisation à la morphine ont consisté en cinq sessions réalisées un jour sur deux d'une durée totale de 300 minutes. Au cours de ces sessions, l'activité spontanée a été enregistrée pendant les premières 120 minutes avant les injections de solution saline ou de morphine (10 mg/kg), et l'activité locomotrice a ensuite été mesurée pendant 180 minutes après les injections. L'animal présente une sensibilisation locomotrice si la locomotion au dernier jour (J9) est significativement plus élevée que celle mesurée au premier jour (J1).

Préférence de place conditionnée (CPP) à la morphine

La CPP a été réalisée dans un labyrinthe en Y en plexiglas à deux compartiments (Imetronic). Chaque compartiment contient différents indices visuels et textures de sol pour lesquels les souris ne montraient en moyenne aucune préférence avant le conditionnement. Les deux sessions de pré-test et la session de test ont duré 30 min et les 5 sessions de conditionnement ont été effectuées pendant 45 minutes. Les deux premiers jours, pendant la phase de prétest, les souris ont été placées au centre de l'appareil avec un accès libre aux deux compartiments. Le temps passé dans chaque compartiment était automatiquement enregistré et la moyenne entre les deux sessions de pré-test a été calculée pour chacun des compartiments. Les souris qui passaient plus de 70 % du temps dans un compartiment étaient exclues. À la suite des deux sessions de pré-test, afin d'éviter tout biais de préférence, les souris ont été assignées au hasard à l'un ou l'autre compartiment pour chaque groupe, appelé le compartiment pairé. Durant le conditionnement dans le compartiment non-pairé, les souris ont reçu une injection de solution saline le matin et ont été placées immédiatement dans le compartiment

fermé assigné pendant 30 minutes. Quatre heures après le premier conditionnement effectué le matin, les souris ont reçu une injection de solution saline ou de morphine (10 mg/kg) et ont été placées dans l'autre compartiment fermé. Cette opération a été répétée durant 5 jours. Le test a été effectué le jour 8, au cours duquel les souris ont eu à nouveau un accès libre aux deux compartiments. Le score de CPP a été calculé comme la différence entre le temps passé dans le compartiment pairé au cours du test (jour 8) et le temps passé dans ce même compartiment lors de la phase de pré-test. Pour étudier l'impact de l'hétéromérisation DAR-NMDAR sur le développement de la CPP, les souris ont été traitées avec de la doxycycline pendant 7 jours avant et jusqu'à la fin de l'expérience. Par souci d'éthique animal et de respect de la règle des 3R, les souris ayant été injectées avec les virus Tet-On ont été uniquement conditionnées avec de la morphine (10 mg/kg). Les souris ont été perfusées avec après le test, soit 24 heures après la dernière injection de morphine, afin d'étudier la modulation des hétéromères DAR-NMDAR sur les animaux des groupes saline et morphine et de vérifier l'expression virale grâce à la protéine rapportrice RFP sur les animaux injectés avec les virus Tet-On.

Des expériences d'extinction et de rechute de la CPP ont été réalisées sur les groupes de souris saline et les souris du groupe morphine ayant développé une préférence pour le compartiment associé à la drogue. Pour la phase d'extinction, les souris ont reçu une injection de solution saline et ont été replacées dans l'appareil avec un accès libre aux deux compartiments pendant 30 minutes par jour pendant 7 jours. Après les 7 jours d'extinction, les souris du groupe morphine ont reçu une nouvelle injection de morphine (10 mg/kg) et les souris du groupe saline ont reçu une nouvelle injection de saline, avec un accès libre aux deux compartiments pendant 30 minutes. Le score de CPP (secondes) représente la différence entre le temps passé dans le compartiment pairé pendant la phase de réexposition à la drogue et le temps passé dans ce même compartiment pendant la phase de pré-test. Les souris ont été perfusées 24 heures après la réexposition à la morphine.

Préparation des tissus

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'Euthazol (100 mg/kg ; Le Vet, Oudewater, Pays-Bas) et perfusées en intracardiaque avec une solution à 4°C de PFA 4% dilué dans du PBS (pH 7,5), à l'aide d'une pompe péristaltique à raison de 10 ml/min pendant 3 minutes. Les cerveaux ont ensuite été extraits, postfixés pendant une nuit dans du PFA à 4 % et conservés à 4 °C. Des coupes coronales (30 µm d'épaisseur) ont été réalisées avec un vibratome (Leica, Nussloch, Allemagne) et conservées à -20°C dans une solution cryoprotectrice contenant 30% (v/v) d'éthylène glycol, 30% (v/v) de glycérol et 0,1 M de PBS.

Interactions protéine-protéine par PLA (*Proximity Ligation Assay*)

La PLA « brightfield » a été réalisée sur des sections de cerveau de souris (30 µm d'épaisseur) montées sur des lames Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific) et selon le protocole du fabricant (Sigma-Aldrich, DUO92012). Les sections ont été incubées pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans du TBS contenant 1% de H₂O₂ pour bloquer la peroxydase endogène. Après trois rinçages de 5 minutes avec du TBS contenant 0,1 % de Triton X-100, les sections ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un tampon de saturation fourni dans le kit PLA, puis avec des anticorps primaires (anti-D1R monoclonal rat, #D2944, Sigma ; anti-NMDAR1 polyclonal lapin, #ab17345, abcam ; anti-D2R polyclonal lapin, #ABN462, Millipore ; anti-NMDAR2B monoclonal souris, #MAB5782, Millipore) dilués (1/150) dans le tampon de dilution des anticorps fourni pendant une nuit à 4 °C. Les sondes PLA PLUS et MINUS anti-rats ont été fabriquées à l'aide du tampon de dilution des

anticorps du kit PLA Probemaker (Sigma-Aldrich, DUO092009 et DUO092010), avec un anticorps secondaire anti-rat non marqué fait chez la chèvre (Jackson ImmunoResearch) selon les instructions du fabricant. Les sondes PLA PLUS et MINUS anti-lapin (DUO92002 et DUO092005) et anti-souris (DUO092001 et DUO092004) ont été fournies par le fabricant (Sigma-Aldrich). Les étapes de ligation, d'amplification et de révélation ont été réalisées selon le protocole du fabricant. Les noyaux ont été contre-colorés à l'aide du colorant nucléaire fourni (Sigma-Aldrich). Les coupes ont été déshydratées à l'aide de bain d'éthanol (95 à 100°) puis de xylène avant d'être montées dans du Permount (Thermo Fisher Scientific). Chaque PLA a été réalisée avec un contrôle positif (reconnaissance d'un seul des partenaires) et d'un contrôle négatif (omission d'un des deux anticorps primaires).

Acquisition et analyse d'images

L'acquisition des images PLA a été réalisée après polymérisation du milieu de montage. L'acquisition a été effectuée à l'aide d'un scanner de lame confocal (Zeiss Axioscan) avec un grossissement de 40X et un z-stack avec un intervalle de pas de 0,85 µm. Les images scannées de la lame entière ont été visualisées avec le logiciel ZEN Blue edition lite (Zeiss, version 3.1). 6 régions d'intérêt (100 x100 µm) par structure (NAc core, shell médian, shell latéral, dorso-médian et dorso-latéral) et par hémisphère ont été générées et exportées sous forme de fichiers TIFF à l'aide du plugin d'exportation d'images du logiciel ZEN Blue edition lite. Les images de PLA de souris ont ensuite été analysées à l'aide d'une macro ImageJ établie au laboratoire. Comme les piles d'images en fond clair contiennent des signaux hors du focus, elles ont été fusionnées en une seule image grâce à une macro maison « Image Sequence ». L'ensemble de la pile d'image obtenue a été mise au focus en utilisant le plugin « Extended depth of field » (<https://github.com/Biomedical-Imaging-Group/EDF-Extended-Depth-of-Field>) avant la détection des points PLA avec la commande « Find Maxima » implémentée dans FIJI.

Symptômes de manque liés au sevrage

Les animaux ont été exposés matin (8h00) et soir (20h00) avec 12 heures d'intervalles à des doses croissantes de morphine pendant 5 jours (2 x 20 mg/kg ; 2 x 40 mg/kg ; 2 x 60 mg/kg ; 2 x 80 mg/kg ; 2 x 100 mg/kg) et une dose de morphine le matin du jour 6 (100 mg/kg). Le poids a été enregistré chaque matin avant chaque injection, ou avant chaque film. Les souris ont été filmées 8 heures, 32 heures, 56 heures et 80 heures après la dernière administration de morphine dans des béchers en verre pyrex transparents (5L, 180 mm de diamètre et 300 mm de hauteur, LaboModerne) avec un fond de litière pendant 30 minutes. L'analyse des vidéos a été réalisée avec DeepEthogram.

DeepEthogram

Deepethogram est un logiciel d'apprentissage automatique supervisé. Il s'agit d'une interface graphique qui permet l'analyse comportementale sans programmation de la part de l'utilisateur. Il permet de convertir les pixels vidéo bruts et d'utiliser un réseau d'entraînement personnalisé afin de calculer les mouvements, extraire les caractéristiques des mouvements et des images, et classer les caractéristiques dans les comportements. Il permet ainsi d'identifier les comportements d'intérêt présents dans chaque image de la vidéo. Le code est disponible à l'adresse suivante : <https://github.com/jbohnslav/deepethogram>. Les données obtenues avec DeepEthogram se présentent sous la forme d'un fichier .csv avec une annotation binaire pour chaque comportement d'intérêt. L'analyse de ces données nécessite l'écriture d'un script Python permettant notamment de calculer le temps d'apparition du comportement et sa fréquence.

Statistiques

L'ensemble des résultats ont été analysés avec GraphPad prism (version 8). La taille des échantillons a été déterminée sur la base d'études publiées, d'expériences pilotes et de l'expertise interne. L'ensemble des données est présenté sous forme de moyenne \pm SEM. Le test-t bilatéral a été utilisé pour la comparaison de deux groupes indépendants. Pour la comparaison de plus de deux groupes, une analyse de variance (ANOVA) à deux voies a été réalisée, suivie d'un test post hoc Bonferroni. La distribution des données a été supposée normale et les variances homogènes. L'effet principal et les significations statistiques post hoc ont été indiqués dans les légendes correspondantes.

Résultats

La sensibilisation locomotrice à la morphine est associée à une augmentation de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans le striatum.

Un prérequis à l'analyse du rôle potentiel de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans les réponses induites par la morphine était d'étudier la modulation de ces hétéromères en réponse à la morphine. Pour adresser ce point, nous avons tout d'abord utilisé le paradigme de sensibilisation locomotrice décrit dans une étude antérieure (Barik et al., 2010). Dans ce paradigme, après la phase d'habituation, les souris sont soumises à une dose fixe de saline ou de morphine (10 mg/kg) en sous-cutanée pendant 5 jours une fois tous les deux jours afin d'éviter le développement d'une tolérance (Figure 1A). L'administration répétée de morphine entraîne une augmentation de la locomotion au fur et à mesure des injections et une sensibilisation locomotrice, contrairement aux souris recevant de la saline (Figure 1B). Le lendemain de la dernière injection de saline ou de morphine, nous avons utilisé la technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA) (Andrianarivelo et al., 2021) pour étudier la modulation *in vivo* des hétéromères D1R-NMDAR (Figure 1C) et D2R-NMDAR (Figure 1D). Nous observons que la sensibilisation locomotrice induite par des injections répétées de morphine est associée à une hétéromérisation accrue de ces deux types d'hétéromères DAR-NMDAR dans toutes les sous-divisions striatales (striatum dorsal et NAc). L'amplitude de cet effet semble plus nette dans le cas des hétéromères D2R-NMDAR malgré une variabilité plus importante comparé aux hétéromères D1R-NMDAR (Figure 1D). Ces résultats montrent donc, comme observé dans le cas de la cocaïne (Andrianarivelo et al., 2021), une augmentation de la formation des complexes DAR-NMDAR au sein du striatum lors d'expositions répétées à la morphine dans le paradigme de sensibilisation locomotrice.

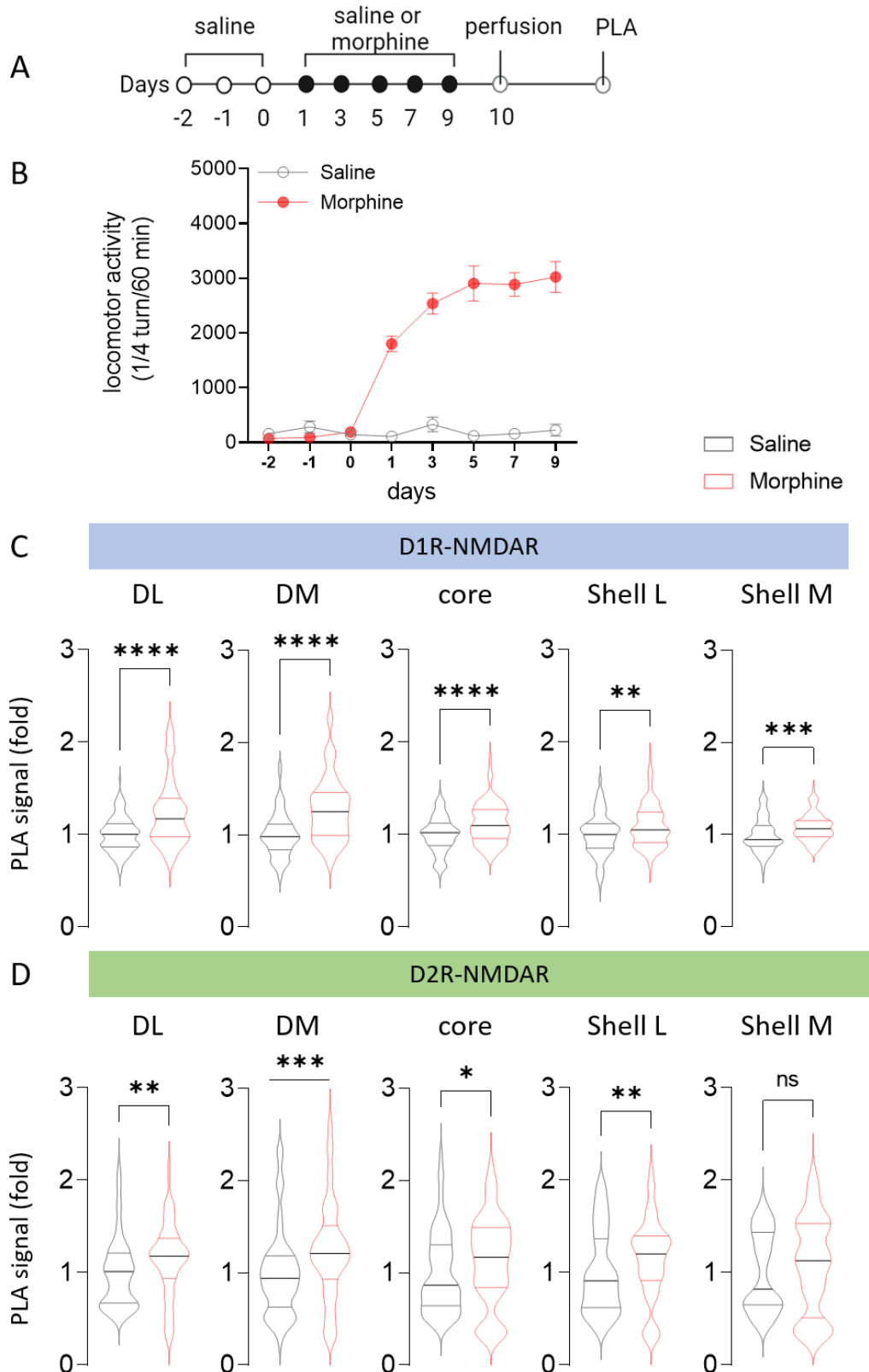


Figure 1 : La sensibilisation locomotrice induite par la morphine est associée à une augmentation de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans les sous-régions striatales. (A) Paradigme de sensibilisation locomotrice où les souris reçoivent 5 injections sous-cutanées un jour sur deux de saline ou de morphine (10 mg/kg) après 3 jours d'habituation, et avant d'être perfusées pour étudier la modulation

des hétéromères DAR-NMDAR par PLA. (B) Les souris recevant des injections répétées de morphine présentent une augmentation de la locomotion (quart de tour/60 min) au fil des jours et une sensibilisation locomotrice (ratio J9/J1), contrairement aux souris injectées avec la solution saline. N=12/groupe ; Anova à deux voies et correction de Bonferroni (J9 saline vs J9 morphine, ****P<0,0001 ; J9 morphine vs J1 morphine, ****P<0,0001). Les barres d'erreur indiquent les valeurs SEM. (C-D) Quantifications de l'hétéromérisation D1R-NMDAR (C) et D2R-NMDAR (D) au sein du striatum dans les groupes traités à la saline et à la morphine obtenues par PLA. Le signal PLA des deux groupes est normalisé sur la moyenne du groupe salin pour obtenir des ratios. N=12 images/structure/animal. Test-t non-apparié bilatéral (*P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001 ; ****P<0,0001) et identification des valeurs aberrantes (méthode ROUT).

Le blocage des hétéromères DAR-NMDAR n'altère pas le développement de la sensibilisation locomotrice induite par la morphine.

Aux vues de la modulation des complexes DAR-NMDAR observée (**Figure 1C-D**) et du rôle distinct des D1R- et D2R-MSN au sein du NAc en réponses aux substances addictives, nous avons émis l'hypothèse que la perturbation de ces hétéromères *in vivo* dans le NAc pourrait impacter le développement de la sensibilisation locomotrice induite par la morphine. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche virale précédemment validée par l'équipe qui permet d'inhiber les interactions D1R-NMDAR ou D2R-NMDAR *in vivo*, de manière contrôlée dans le temps grâce à l'utilisation d'un promoteur dépendant de la doxycycline pour contrôler l'expression de peptides interférants (**Andrianarivelo et al., 2021**). Le blocage de ces complexes a été réalisé grâce au traitement des souris à la doxycycline dans l'eau de boisson avant et pendant le développement de la sensibilisation locomotrice. Chaque groupe s'est vu administré uniquement de la morphine, par respect de l'éthique animal et de la règle des 3R (**Figure 2A**). Cependant, le blocage des hétéromères D1R-NMDAR (**Figure 2B**) et D2R-NMDAR (**Figure 2C**) dans le NAc n'empêche pas l'augmentation de la réponse locomotrice et la sensibilisation induite par l'administration répétée de morphine. Nous avons obtenu les mêmes résultats lors du ciblage de ces hétéromères dans le striatum dorsal (résultats non montrés). Dans l'ensemble, ces données montrent une première différence entre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets psychomoteurs induits par la cocaïne et la morphine chez la souris. En effet, nous avons montré que cibler ces hétéromères, en particulier les D1R-NMDAR, bloquait le développement de la sensibilisation induite par la cocaïne (**Andrianarivelo et al., 2021**) alors que nous n'observons pas d'inhibition significative de ce comportement lorsqu'il est induit par des injections répétées de morphine.

Toutefois, d'un point de vue translationnel, il est important de noter que la sensibilisation locomotrice, bien qu'observable aussi bien chez les rongeurs que chez l'Homme dans le cas des psychostimulants, n'est retrouvée que chez les rongeurs dans le cas de la morphine. De plus, il existe des précédents dans la littérature où des stratégies moléculaires, visant à contrecarrer les effets de la morphine sur la transmission glutamatergique dans le NAc dans le paradigme de la sensibilisation locomotrice, se sont avérées inefficaces alors qu'elles permettaient de diminuer les propriétés récompense mesurées grâce à la préférence de place induite par la morphine (**Graziane et al., 2016**).

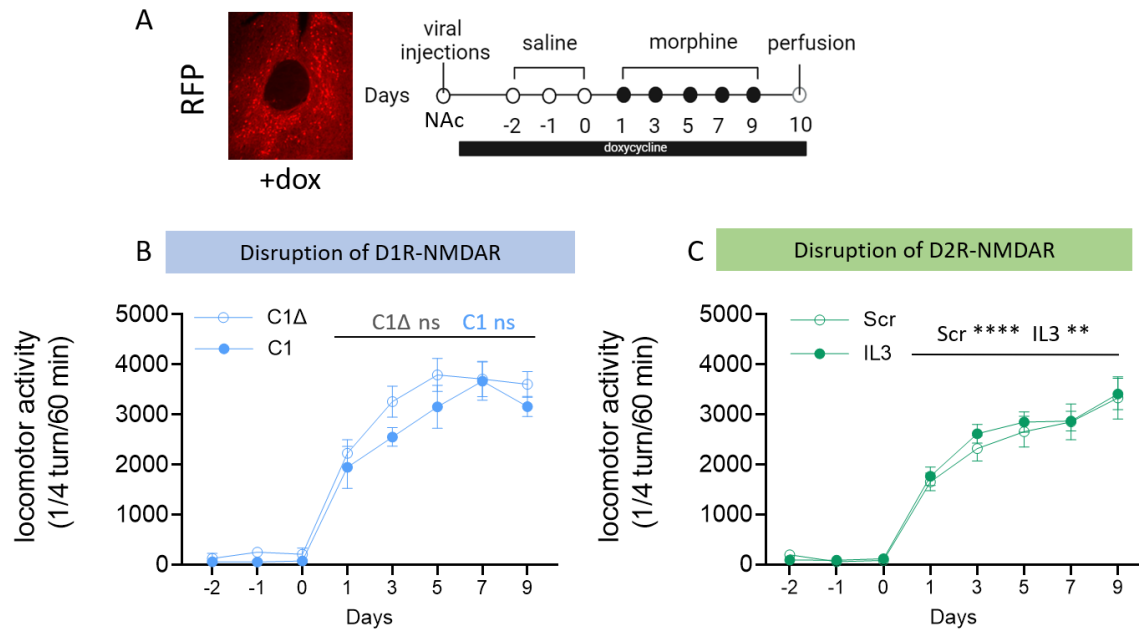


Figure 2 : Le blocage des hétéromères DAR-NMDAR n’affecte pas les propriétés psychoactives de la morphine. (A) Les souris ont été injectées dans le NAc avec les virus interférant DAR-NMDAR et leurs contrôles associés, exprimant une protéine rapportrice RFP, puis placées sous doxycycline avant et pendant la sensibilisation locomotrice à la morphine (10 mg/kg) pour permettre l’activation des virus. (B) Perturbation de l’hétéromérisation D1R-NMDAR avec le virus C1 (bleu) versus le virus contrôle C1Δ (gris) pendant le développement de la sensibilisation locomotrice. Anova à deux voies et correction de Bonferroni (J1 vs J9 C1, N=12, *ns* P= 0,0903 ; J1 vs J9 C1Δ, N=9, *ns* P=0,1134). (C) Perturbation de l’hétéromérisation D2R-NMDAR avec le virus IL3 (vert) versus le virus contrôle scramble (Scr ; gris). Anova à deux voies et correction de Bonferroni (J1 vs J9 IL3, N=9, **P<0,01; J1 vs J9 Scr, N=13, ****P<0,0001). Les barres d'erreur indiquent les valeurs SEM.

La préférence de place conditionnée induite par la morphine est associée une hétéromérisation D2R-NMDAR accrue dans le NAc.

Dans le but d’étudier la modulation et le rôle des hétéromères DAR-NMDAR sur les propriétés hédoniques de la morphine, j’ai dû mettre au point le protocole de CPP à la morphine. Parmi les protocoles testés, celui qui m’a permis d’obtenir une préférence de place significative en réponse à la morphine consiste en deux sessions de pré-test de 30 minutes où l’animal a accès librement aux deux compartiments. Cette phase est ensuite suivie de 5 jours de conditionnements de 45 minutes, où l’animal reçoit par voie intrapéritonéale de la solution saline le matin dans un compartiment fermé, puis de la morphine (10 mg/kg) dans l’autre l’après-midi. Pour évaluer la préférence induite par la morphine pour le compartiment associé, nous réalisons un test de 30 minutes où l’animal a de nouveau accès aux deux compartiments. Le score de CPP consiste à faire la différence entre le temps passé dans le compartiment associé à la drogue pendant le test moins le pré-test (Figure 3A). Les souris conditionnées avec la morphine ont développé une préférence significative pour le compartiment associé à la morphine, comparé aux souris conditionnées avec la solution saline (Figure 3B).

Par homologie avec les résultats obtenus en PLA en sensibilisation locomotrice induite par la morphine (**Figure 1**) et par la cocaïne (Andrianarivelo et al., 2021), les animaux sont perfusés après le test, 24 heures après le dernier conditionnement à la morphine. Nous avons ensuite réalisé des PLA D1R-NMDAR et D2R-NMDAR sur ces cerveaux pour observer la modulation des hétéromères suite au développement de la CPP induite par la morphine (**Figure C-D**). À part dans le striatum dorso-médian, où le développement de la CPP est associé à une augmentation des hétéromères D1R-NMDAR, nous n'avons pas observé d'effet de ce paradigme comportemental sur la modulation de ces hétéromères (**Figure 3C**). En revanche, le développement de la CPP est associé à une hétéromérisation D2R-NMDAR dans le NAc et le striatum dorso-latéral (**Figure 3D**). Cette hétéromérisation apparaît toutefois transitoire car lorsque l'on étudie la modulation des hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR 48 heures après la dernière administration de morphine dans le protocole de CPP, aucune modification significative n'est observée par rapport au groupe salin (données non-montrées). Ces données montrent ainsi une hétéromérisation transitoire des D2R-NMDAR associée au développement de la CPP induite par la morphine et pas de modulation des interactions des D1R-NMDAR, tout du moins 24h et 48h après la dernière exposition à la morphine.

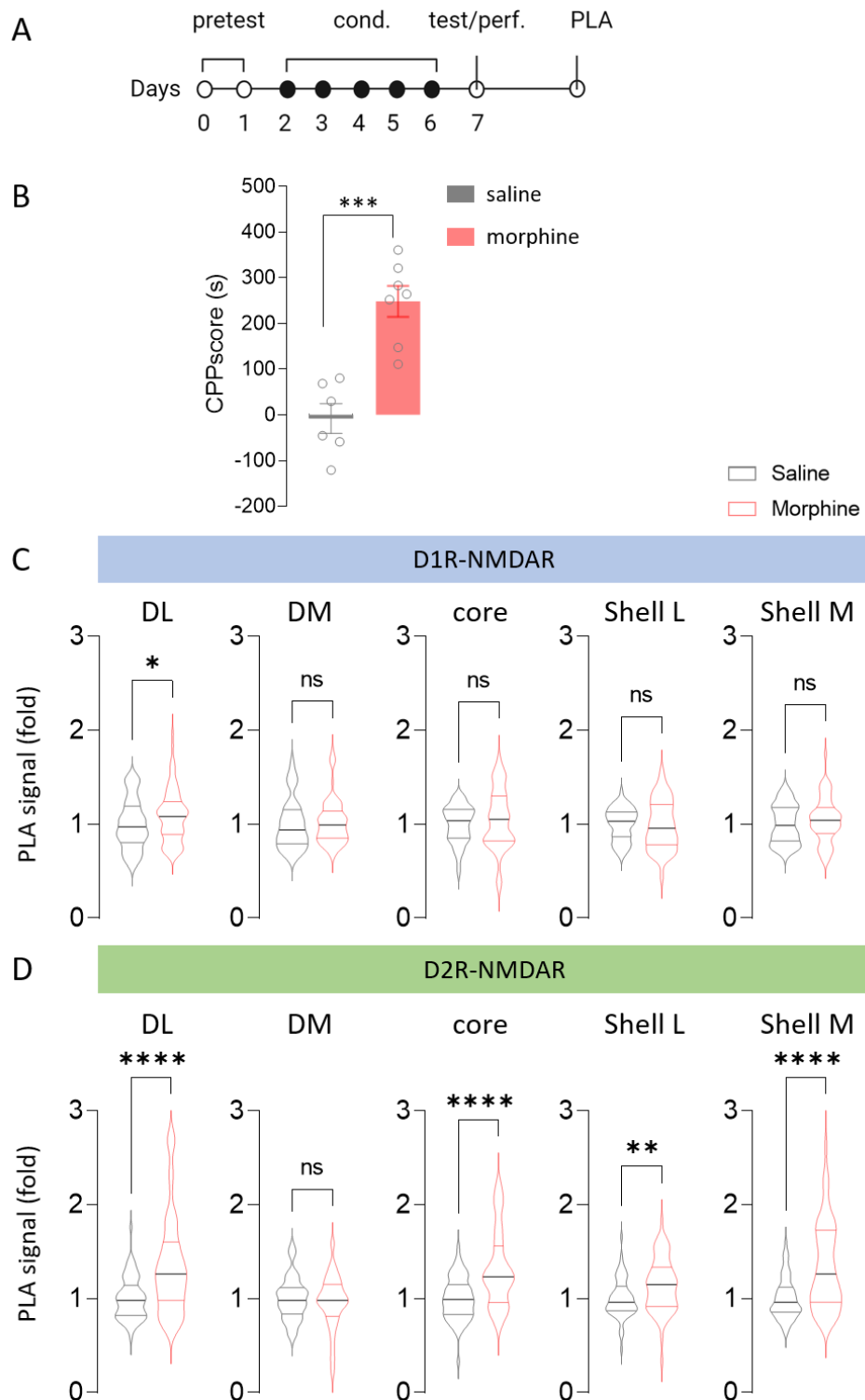


Figure 3 : La CPP induite par la morphine module sélectivement les hétéromères D2R-NMDAR dans le NAc. (A) Préférence de place conditionnée (CPP) induite par des injections intrapéritonéales répétées de solution saline ou morphine (10 mg/kg) pendant 5 jours de conditionnement (cond.), après deux sessions de pré-test et avant une session de test. Les souris ont été perfusées 24 heures après le dernier conditionnement morphine, soit juste après le test, afin d'étudier la modulation des hétéromères DAR-NMDAR par PLA. (B) Le score de CPP (secondes) représente la différence entre le temps passé dans le compartiment associé à la morphine pendant le test par rapport au temps passé

dans ce même compartiment pendant la phase de pré-test. Les souris conditionnées avec la morphine dans un compartiment présentent une préférence pour ce compartiment par rapport aux souris injectées avec la solution saline. N = 6 salines et N = 9 morphines. Test-t non-apparié bilatéral ($***P < 0,001$). Les barres d'erreur indiquent les valeurs de SEM. (C-D) Quantifications de l'hétéromérisation D1R-NMDAR (C) et D2R-NMDAR (D) au sein du striatum dans les groupes traités à la saline et à la morphine obtenues par PLA. Le signal PLA des deux groupes est normalisé sur la moyenne du groupe salin pour obtenir des ratios. N = 12 images/structure/animal. Test-t non-apparié bilatéral ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $****P < 0,0001$) et identification des valeurs aberrantes (méthode ROUT).

Inhiber l'hétéromérisation D2R-NMDAR dans le NAc empêche le développement de la CPP induite par la morphine.

Afin de déterminer s'il existe un lien causal entre l'hétéromérisation DAR-NMDAR et le développement de la préférence de place à la morphine, j'ai utilisé une approche virale précédemment validée au laboratoire (Andrianarivelo et al., 2021; Article I). Dans un premier temps, nous avons bloqué la formation des hétéromères DAR-NMDAR *in vivo* durant le développement de la CPP induite par la morphine. Les souris ont été injectées au sein du NAc avec le virus C1 permettant le blocage de l'hétéromérisation D1R-NMDAR, ou le virus IL3 bloquant l'interaction D2R-NMDAR, ainsi que les virus contrôles correspondants. La doxycycline a été donnée aux animaux avant et pendant le protocole de CPP. Toutes les souris ont été conditionnées avec de la morphine (Figure 4A). Nous ne mettons pas en évidence d'effet significatif de l'inhibition des hétéromères D1R-NMDAR dans le NAc bien qu'une tendance soit observable (Figure 4B). En revanche, le blocage des hétéromères D2R-NMDAR bloque significativement le développement de la CPP induite par la morphine. Ces résultats sont en accord avec le fait que le développement de la CPP à la morphine est associé à une hétéromérisation accrue des D2R-NMDAR sélectivement. Ils mettent également en évidence une différence entre les mécanismes qui sous-tendent le développement des propriétés hédoniques induites par les opiacés et les psychostimulants puisque nous avons montré que, dans le cas de la cocaïne, l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR contrôle de développement de la CPP à la cocaïne (Andrianarivelo et al., 2021). Ces résultats sont également en accord avec l'hypothèse selon laquelle le développement des comportements de type addictif serait intimement lié à la capacité des drogues à engendrer un déséquilibre de l'activité des D1R- et D2R-MSN en faveur des D1R-MSN, mais à travers des mécanismes différents. En effet, les psychostimulants déclenchent des altérations comportementales durables en augmentant principalement l'activité des D1R-MSN (Salery et al., 2020), alors que la morphine agirait majoritairement en diminuant celle des D2R-MSN (Graziane et al., 2016). Ainsi, en bloquant les hétéromères D2R-NMDAR, nous sommes en mesure d'empêcher la diminution des fonctions NMDAR par la DA dans les D2R-MSN en réponse à la morphine, ce qui a pour conséquence d'empêcher le développement de la CPP induite par la morphine. Ces données reflètent le rôle important des D2R-NMDAR dans les réponses comportementales induites par la morphine. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le rôle des hétéromères D1R-NMDAR qui, même en absence de modulation à 24 et 48 heures, pourraient être impliqués dans d'autres phases des comportements addictifs, tels que l'extinction ou la rechute.

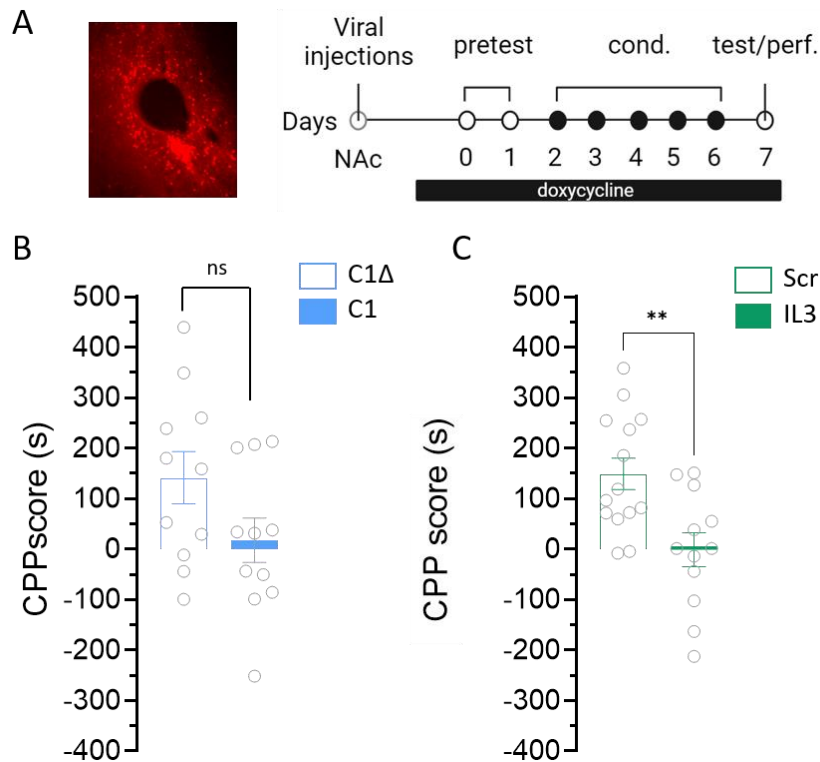


Figure 4 : La perturbation des complexes D2R-NMDAR dans le NAc bloque l'acquisition de la CPP induite par la morphine. (A) Les souris ont été injectées dans le NAc avec les virus interférant DAR-NMDAR et leurs contrôles associés, puis placés sous doxycycline avant et pendant le développement de la CPP induite par des conditionnements (cond.) répétés à la morphine (10 mg/kg) pour permettre l'activation des virus. Les souris ont été perfusées après le test (perf.) (B) Perturbation de l'hétéromérisation D1R-NMDAR avec le virus C1 (bleu) versus le virus contrôle C1Δ (gris) pendant le développement de la CPP. N=11/groupe. Test-t non-apparié bilatéral ($P=0,0840$) et identification des valeurs aberrantes (méthode ROUT). (C) Perturbation de l'hétéromérisation D2R-NMDAR avec le virus IL3 (vert) versus le virus contrôle scramble (Scr ; gris). N=14 scramble et 13 IL3. Test-t non-apparié bilatéral (** $P<0,01$) et identification des valeurs aberrantes (méthode ROUT). Les barres d'erreur indiquent les valeurs de SEM.

Protocole expérimental pour évaluer les changements morphologiques induits par la morphine et l'impact de la modulation des hétéromères DAR-NMDAR.

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans les propriétés renforçantes de la morphine et l'implication des hétéromères DAR-NMDAR, nous souhaitons observer, de manière cellule spécifique, les changements morphologiques induits par la morphine et l'impact du blocage de ces complexes dans le paradigme de CPP. En effet, il est bien établi qu'une administration aiguë, ou des injections répétées, de cocaïne augmente la densité en épines dendritiques sélectivement dans les D1R-MSN du NAc et entraîne une augmentation de la connectivité glutamatergique des D1R-MSN (Andrianarivelo et al., 2021; Dos Santos et al., 2017; Heck et al., 2015; Kim et al., 2011; Ren et al., 2010). En revanche, il n'existe à ce jour aucune donnée concernant l'impact de l'exposition à la morphine sur les changements morphologiques dans les D1R-MSN et D2R-MSN. Pour adresser ce point, nous avons injecté des souris avec des virus PPTA-Cre ou PPE-Cre en combinaison avec un virus DIO-eGFP dilué de

manière à obtenir un marquage épars des D1R-MSN et D2R-MSN, ce qui permet d'imager des prolongements dendritiques isolés des populations de MSN d'intérêt (Andrianarivelo et al., 2021; Dos Santos et al., 2017). Ces animaux ont ensuite été conditionnés avec de la saline ou de la morphine (10 mg/kg) et ont été perfusés 24 heures après le dernier conditionnement (Figure 5A). Les animaux ayant développé une préférence pour le compartiment associé à la morphine ont été sélectionnés pour l'analyse des épines dendritiques (Figure 5B-C). L'acquisition des images a été faite au microscope confocal et la quantification de la densité en épines dendritiques est actuellement en cours (Figure 5D). Cette expérience sert de base à l'étude des changements morphologiques induits par la morphine lors de la CPP par rapport aux souris salines dans les neurones D1R-MSN ou D2R-MSN. De plus, les animaux de la cohorte précédente (Figure 4B-C) ont été au préalable injectés avec cette stratégie de marquage épars des D1R-MSN ou D2R-MSN en plus des virus Tet-On bloquant les hétéromères. Ainsi, nous sommes en mesure d'étudier l'effet de la morphine dans un protocole de CPP sur la densité en épines dendritiques des deux sous-populations de MSN et d'analyser le rôle potentiel des hétéromères DAR-NMDAR dans la plasticité structurale des MSN en réponse à la morphine.

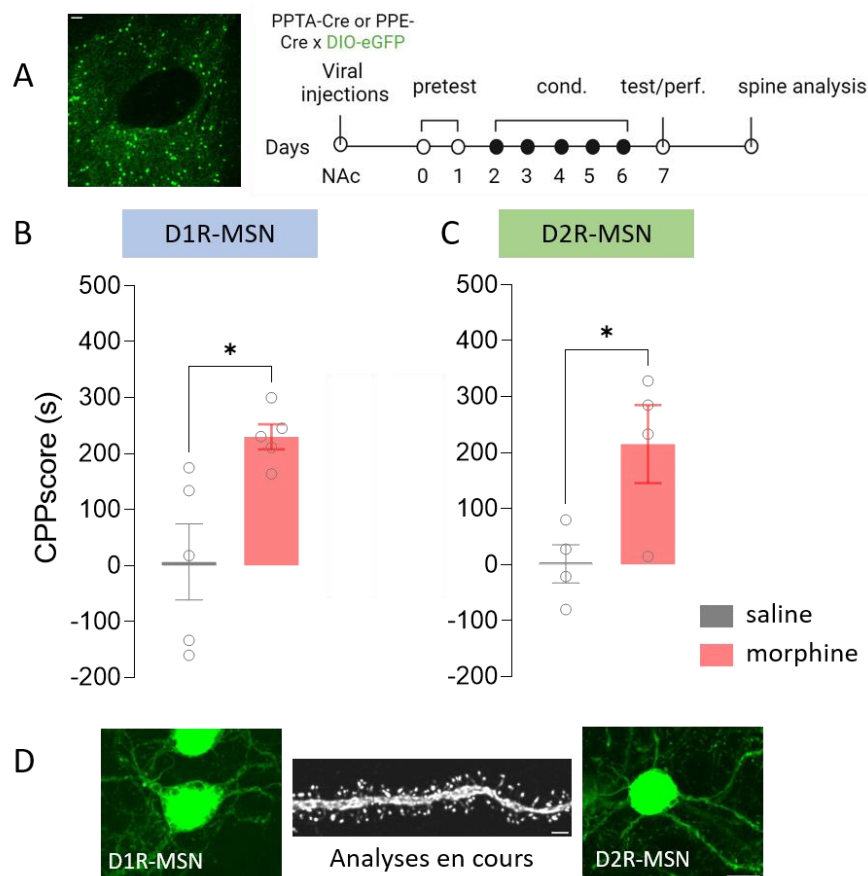


Figure 5 : Protocole permettant d'évaluer les changements morphologiques induits par la morphine dans un paradigme de CPP dans les neurones D1R- et D2R-MSN. (A) Les souris ont été injectées avec un mélange contenant l'AAV PPTA-Cre et l'AAV DIO-eGFP, ou l'AAV PPE-Cre et l'AAV DIO-eGFP, pour permettre un marquage épars des neurones D1R-MSN et D2R-MSN, respectivement. Les animaux ont ensuite été exposés au paradigme de CPP induit par des conditionnements répétés avec la solution saline ou la morphine puis perfusés (perf.) 24h après la phase de test. (B-C) Score de CPP obtenu pour

le groupe saline et le groupe morphine avec un marquage viral dans les (B) D1R-MSN (N=5/groupe) ou (C) D2R-MSN (N=4/groupe). Test-t non-apparié bilatéral (*P<0,05) et identification des valeurs aberrantes (méthode ROUT). Les barres d'erreur indiquent les valeurs de SEM. (D) L'acquisition des images a été réalisée au microscope confocale et permet l'acquisition des neurones marqués par le virus PPTA-Cre x DIO-eGFP pour marquer les D1R-MSN ou par le virus PPE-Cre x DIO-eGFP pour marquer les D2R-MSN. Barre d'échelle de 50 μm (A), de 10 μm pour D1R- et D2R-MSN et de 2 μm pour le prolongement dendritique (D). L'analyse morphologique en cours permettra d'étudier les changements en épines dendritiques de ces neurones provoqués par des injections répétées de morphine chez des souris ayant établi une association entre les propriétés hédoniques de la morphine et un environnement.

Mise en place d'un protocole permettant d'étudier le rôle des complexes DAR-NMDAR sur l'extinction et la réinstaurer des propriétés renforçantes de la morphine.

Grâce à un blocage des hétéromères contrôlé dans le temps, nous avons précédemment mis en évidence un rôle différentiel des interactions D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans les différentes phases des comportements addictifs induits par la cocaïne. Nous avons en effet montré que l'hétéromérisation D1R-NMDAR contrôle le développement de la sensibilisation locomotrice et de la CPP, alors que les interactions D2R-NMDAR jouent un rôle à la fois dans le développement et le maintien de ces réponses (Andrianarivelo et al., 2021). Afin d'étudier l'implication de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans l'extinction et la réinstaurer de la CPP induite par la morphine, j'ai souhaité mettre en place un protocole expérimental. Pour cela, nous avons conditionné des souris avec de la solution saline ou morphine dans le paradigme de CPP. Après le test permettant d'évaluer la préférence, nous avons poursuivi l'expérience avec une phase d'extinction de 7 jours où chaque animal était injecté avec de la saline et pouvait se déplacer librement dans les deux compartiments. Enfin, en fonction du groupe, les souris ont reçu une injection de saline ou de morphine pour évaluer l'effet de la réexposition à la drogue sur le score de CPP (Figure 6A).

Comme attendu, les souris conditionnées à la morphine présentent une préférence de place significative pour le compartiment associé à la drogue comparé aux souris salines (Score CPP test). Cette préférence a été rapidement abolie pendant la phase d'extinction. En revanche, la réexposition à la morphine n'a pas induit de préférence significative pour le compartiment associé, bien qu'il semble y avoir une tendance (Figure 6A). Ces données suggèrent que la CPP induite par la morphine est capable de s'éteindre en absence de drogue, et que la préférence semble se maintenir dans le cas d'une nouvelle exposition à la morphine. Toutefois, pour identifier plus nettement le maintien, nous devons ajuster le protocole de réexposition, peut être en augmentant la dose administrée après la phase d'extinction ou alors en augmentant le nombre de souris par groupe (actuellement N = 11 salines et N = 9 morphines). La mise au point de ce protocole nous permettra, à terme, d'évaluer si le blocage des complexes DAR-NMDAR durant la période d'extinction et de réinstaurer est capable d'altérer la cinétique d'extinction et/ou la réinstaurer. En effet, d'un point de vue stratégie thérapeutique chez l'Homme, il s'agit de la période la plus adéquate pour agir sur les propriétés addictives de la morphine. Cette expérience nous permettra de déterminer si, comme dans le cas des psychostimulants, les complexes DAR-NMDAR jouent des rôles distincts durant les différentes phases des réponses comportementales induites par la morphine (Andrianarivelo et al., 2021).

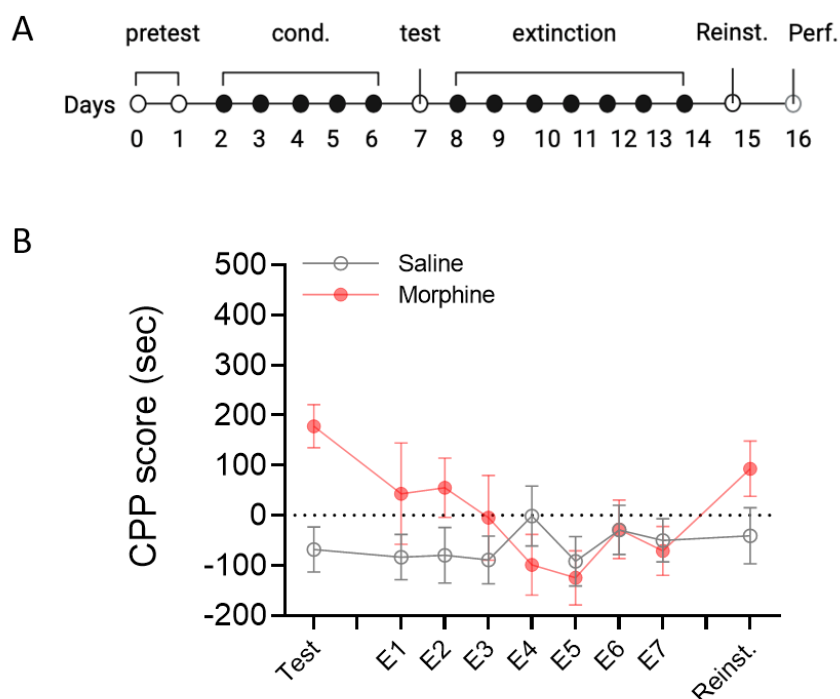


Figure 6 : Mise en place d'un protocole pour étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans les phases d'extinction et de maintenance de la CPP induite par la morphine. (A) Protocole expérimental de développement de CPP, induit par l'injection intrapéritonéale de saline ou morphine, suivi d'une phase d'extinction où chaque groupe reçoit une injection intrapéritonéale de saline avec un accès aux deux compartiments. Après 7 jours d'extinction (E1 à E7), les animaux du groupe morphine reçoivent de nouveau une injection intrapéritonéale de morphine (10 mg/kg) afin d'évaluer la ré-installation (Reinst.) de la CPP morphine. (B) Score de CPP pendant la phase de test, d'extinction (E1 à E7) et pendant la ré-exposition (Reinst.). N=11 salines et 9 morphines. Test-t non-apparié bilatéral (Test : saline-morphine, $**P<0,01$; Reinst. : saline-morphine, $ns P=0,3071$). Les barres d'erreur indiquent les valeurs de SEM.

Le sevrage à la morphine est associé à l'apparition de signes somatiques.

Une particularité des opiacés est d'induire des symptômes somatiques extrêmement déplaisants. Ainsi, la poursuite de leur consommation est tout autant liée aux effets renforçants liés à leur consommation qu'à la reprise de la consommation pour éviter les symptômes de sevrage (Keyes et al., 2020; Wise and Koob, 2014). Il est en effet établi que l'administration chronique de morphine provoque un grand nombre de signes somatiques lors du sevrage chez l'Homme mais également chez les rongeurs (Ozdemir et al., 2023), qui nécessite également une meilleure compréhension afin de permettre une prise en charge thérapeutique. Pour étudier ces symptômes de manque liés au sevrage, des protocoles d'administration de doses croissantes de morphine ont été mis en place dans de nombreuses études (Befort et al., 2008; Contarino and Papaleo, 2005; Le Merrer et al., 2012; Papaleo and Contarino, 2006; Zanos et al., 2016, 2014). Sur la base de ces études, j'ai mis en place un protocole de doses croissantes où les animaux du groupe morphine reçoivent deux injections intrapéritonéales de morphine par jour à 12 heures d'intervalle avec des doses allant de 20 mg/kg jusqu'à 100 mg/kg pendant 5 jours, puis reçoivent une dernière dose à 100 mg/kg le matin du 6^{ème} jour. Les animaux sont

ensuite filmés dans des béciers contenant un fond de litière pendant 30 minutes à différents temps pour identifier le moment où les symptômes de manques sont les plus importants (**Figure 7A**). Nous avons également enregistré le poids de chaque animal avant chaque injection faite le matin pour ajuster le volume de morphine administré et visualiser l'effet de l'administration chronique de morphine à fortes doses sur l'évolution du poids corporel. Ainsi, nous observons une forte diminution du poids des souris du groupe morphine au fur et à mesure de l'administration de doses croissantes. Les animaux du groupe morphine perdent 4% de leur poids entre le jour 1 et le jour 2, et jusqu'à 10 % à 80 et 100 mg/kg. En revanche, une fois l'arrêt du protocole de doses croissantes, les souris récupèrent un poids comparable à celui du groupe salin en 72 heures (**Figure 7B**). Les enregistrements vidéos ont été analysés grâce à une méthode d'apprentissage automatisé qui s'appelle DeepEthogram (voir matériels et méthodes) (**Bohnslav et al., 2021**), permettant d'identifier les comportements d'intérêts. Nous avons ainsi pu analyser la fréquence d'apparition des sauts (jumping), de la locomotion (walking), de l'enfouissement (digging), du redressement (rearing) et du toilettage (grooming) à 8 heures (**Figure 7C**), 32 heures (**Figure 7D**), 56 heures (**Figure 7E**) et à 80 heures (**Figure 7F**) post-injection. Ces comportements ont été décrits en tant que symptômes de manque ou stéréotypies induits par le sevrage à la morphine (**Becker et al., 2017**). Ainsi, nous avons pu constater que les animaux en période de sevrage à la morphine sautaient significativement plus que les animaux contrôles entre 8h et 56 heures après la dernière injection de morphine (**Figure 7C-E**). Il n'est pas exclu que le nombre de saut à 56 heures soit dû à l'ennui de l'animal dans le bécier qui est un endroit confiné au regard de son diamètre. De plus, nous observons une réduction de la fréquence de locomotion 8 heures après la dernière injection (**Figure 7C**), qui peut-être du à un profond mal-être des animaux à ce moment là. En revanche, à part la tendance à la diminution de l'enfouissement chez les souris morphine à 8 heures, nous n'avons constaté aucuns changements dans les stéréotypies (grooming, rearing, digging) chez les souris traitées à la morphine par rapport aux souris témoins. Par conséquent, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur les signes somatiques apparaissant 8 heures après la dernière injection de doses croissantes de morphine.

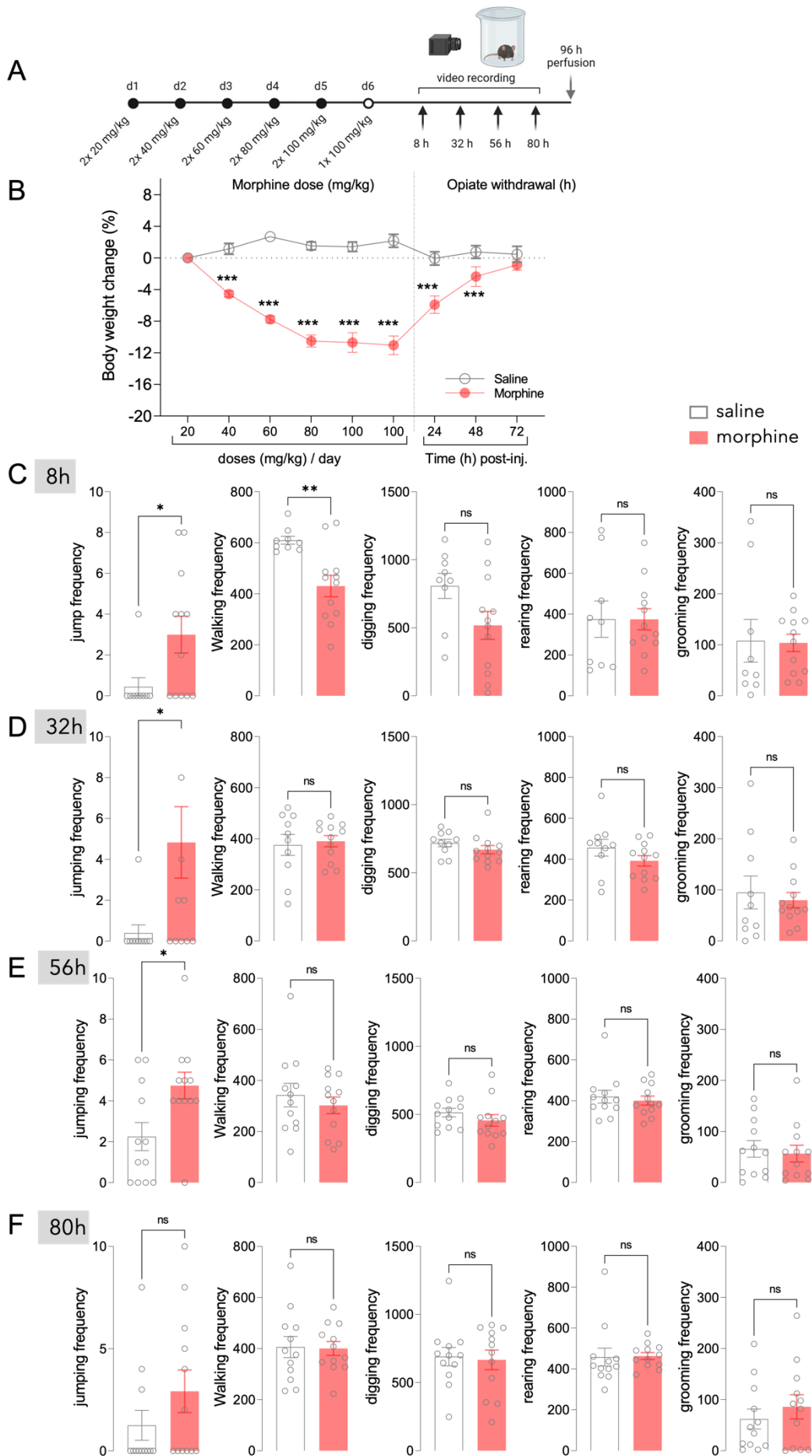


Figure 7 : Études des signes somatiques liés au sevrage à la morphine au cours du temps. (A) Protocole expérimental d'injections intrapéritonéales de morphine avec des doses croissantes (20-100 mg/kg) deux fois par jour (matin et soir) avec 12 heures d'intervalles pendant 5 jours puis une dose à 100 mg/kg au jour 6 le matin. Les souris ont été filmées pendant la phase de sevrage 8h, 32h, 56h et 80h après la dernière injection de morphine dans des béciers transparents avec un fond de litière pendant 30 minutes. (B) Variation du poids corporel (en %) pendant toute la durée de l'expérience chez le groupe saline et morphine. Anova à deux voies avec le temps en mesure répétée. (N=11-12/groupe, ***P<0,001). (C-D-E-F) Quantification des signes somatiques induits par le sevrage à la morphine à différents temps : (C) 8 heures, (D) 32 heures, (E) 56 heures et (F) 80 heures après la dernière injection d'une forte dose de morphine. L'analyse des enregistrements vidéo a été réalisée grâce au logiciel d'apprentissage automatisé DeepEthogram pour quantifier la fréquence d'apparition des comportements de saut (jumping), de locomotion (walking), d'enfouissement (digging), de redressement (rearing) et de toilettage (grooming). Test-t non-apparié bilatéral (*P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001 ; ****P<0,0001). Les barres d'erreur indiquent les valeurs de SEM.

Identification de signes somatiques liés au sevrage à la morphine 8 heures après la dernière exposition.

Au vu des résultats obtenus précédemment sur l'expression des signes somatiques liés au sevrage à la morphine, nous avons réalisé une nouvelle expérience d'administration de doses croissantes où nous avons filmés les animaux 8 heures après la dernière injection de morphine. Les animaux ont ensuite été sacrifiés 24 heures après celle-ci (**Figure 8A**). L'analyse des enregistrements vidéo avec Deepethogram permet l'identification de signes somatiques plus fins. Nous avons ainsi observé la présence d'ébrouements (wet dog shake) (**Figure 8A-B**) et de tremblements au niveau des pattes avant lorsque l'animal est placé sur ses pattes arrière (paw tremor) (**Figure 8C-D**). Ces comportements ont également été observés dans des études ultérieures (Contarino and Papaleo, 2005; Papaleo et al., 2007; Papaleo and Contarino, 2006). Pour renforcer les observations effectuées, nous devons toutefois compléter l'analyse comportementale par une étude de l'ensemble de cette cohorte qui est constituée de 12 animaux par groupe alors que les résultats présentés en **Figure 8** ne concernent que 6 souris contrôle et 7 souris traitées avec des doses croissantes de morphine. Les animaux de cette cohorte ont tous été perfusés 24 heures après la dernière injection afin de réaliser l'étude des taux d'hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans le NAc.

Puisque les études en cours montrent d'ores et déjà une induction significative de signes somatiques de sevrage, j'ai réalisé l'expérience permettant de déterminer l'implication des hétéromères D2R-NMDAR du NAc sur l'apparition des signes de sevrage à la morphine. Les animaux ont été triés selon l'expression virale grâce à la protéine rapportrice RFP exprimée avec les AAV-Tet-On. L'analyse des vidéos sur ces animaux permettra de révéler si l'hétéromérisation D2R-NMDAR est impliquée dans les symptômes de manque liés au sevrage à la morphine et nous réaliserons la même expérience lorsque les complexes D1R-NMDAR sont inhibés.

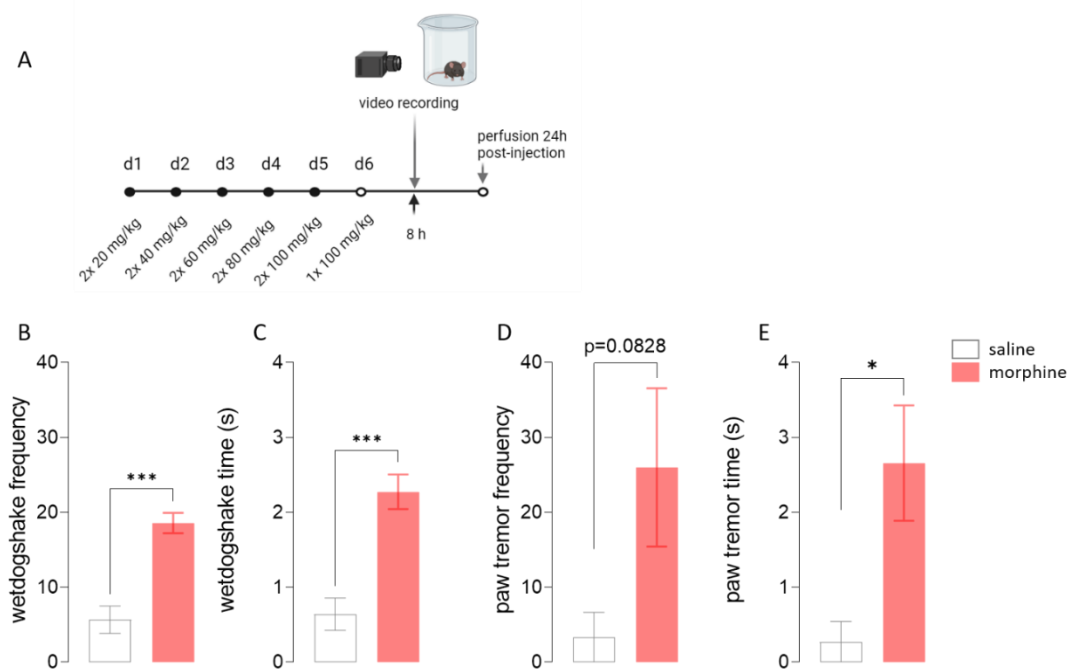


Figure 8 : Le sevrage à la morphine induit des signes somatiques 8 heures après la dernière injection. (A) Utilisation du même protocole expérimental de doses croissantes que la Figure 7, avec des enregistrements vidéo des animaux 8 heures après pour étudier plus finement les signes somatiques liés au sevrage. Les souris ont été perfusées 24 heures après la dernière injection de morphine. Quantification de la fréquence d'apparition des ébrouements (wet dog shake) (B) et la durée du comportement (C). Quantification de la fréquence d'apparition des tremblements de la patte avant (paw tremor) (D) et la durée (E). N=6 salines et 7 morphines. Test-t non-apparié bilatéral (*P<0,05 ; ***P<0,001). Les barres d'erreur indiquent les valeurs deSEM.

Pour conclure sur cette partie de mon travail, les expériences que j'ai réalisées m'ont permis de montrer que l'exposition à la morphine conduit à une augmentation de l'hétéromérisation D2R-NMDAR dans le NAc dont l'inhibition bloque les propriétés hédoniques de la morphine mesurées dans un protocole de CPP. Ce travail m'a également permis d'établir la grande majorité des expériences visant à déterminer le rôle des hétéromères D1R-NMDAR et D2R-MNDAR dans le maintien des réponses comportementales induites par cette drogue, ainsi que sur les symptômes de manque associés au sevrage à la morphine. Je poursuivrai ces expériences après ma soutenance de thèse et elles seront discutées dans la prochaine section de ce manuscrit. Notons que ce travail comprendra également une étude de l'implication de ces hétéromères sur les propriétés analgésiques de la morphine.

Références

- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Pousinha, P., Fernandez, S.P., Petitbon, A., De Smedt-Peyrusse, V., Heck, N., Ortiz, V., Allichon, M.-C., Kappès, V., Betuing, S., Walle, R., Zhu, Y., Joséphine, C., Bemelmans, A.-P., Turecki, G., Mechawar, N., Javitch, J.A., Caboche, J., Trifilieff, P., Barik, J., Vanhoutte, P., 2021. Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Science Advances* 7, eabg5970. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg5970>
- 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* 152, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.003>
- Barik, J., Parnaudeau, S., Saint Amaux, A.L., Guiard, B.P., Golib Dzib, J.F., Bocquet, O., Bailly, A., Benecke, A., Tronche, F., 2010. Glucocorticoid Receptors in Dopaminergic Neurons, Key for Cocaine, Are Dispensable for Molecular and Behavioral Morphine Responses. *Biological Psychiatry, Mechanisms of Cocaine Addiction* 68, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.03.037>
- Becker, J.A.J., Kieffer, B.L., Le Merrer, J., 2017. Differential behavioral and molecular alterations upon protracted abstinence from cocaine versus morphine, nicotine, THC and alcohol: Abstinence across drugs. *Addiction Biology* 22, 1205–1217. <https://doi.org/10.1111/adb.12405>
- Befort, K., Filliol, D., Ghaté, A., Darq, E., Matifas, A., Muller, J., Lardenois, A., Thibault, C., Dembele, D., Le Merrer, J., Becker, J.A.J., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008. Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *European Journal of Neuroscience* 27, 2973–2984. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06273.x>
- 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. *Nat Neurosci* 16, 632–638. <https://doi.org/10.1038/nn.3369>
- Bohnslav, J.P., Wimalasena, N.K., Clausen, K.J., Dai, Y.Y., Yarmolinsky, D.A., Cruz, T., Kashlan, A.D., Chiappe, M.E., Orefice, L.L., Woolf, C.J., Harvey, C.D., 2021. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels. *Elife* 10, e63377. <https://doi.org/10.7554/eLife.63377>
- 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. *Mol Neurobiol* 55, 7038–7048. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0887-1>
- 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>
- Contarino, A., Papaleo, F., 2005. The corticotropin-releasing factor receptor-1 pathway mediates the negative affective states of opiate withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18649–18654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506999102>
- 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. *Biol Psychiatry* 82, 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.014>
- Durieux, P.F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci* 12, 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.2286>
- Durieux, P.F., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., 2012. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal

- striatum subregions. *The EMBO Journal* 31, 640–653.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.400>
- Ferguson, S.M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M.J., Phillips, P.E.M., Dong, Y., Roth, B.L., Neumaier, J.F., 2011. 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>
- 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>
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Borroto-Escuela, D.O., 2014. The impact of receptor-receptor interactions in heteroreceptor complexes on brain plasticity. *Expert Rev Neurother* 14, 719–721.
<https://doi.org/10.1586/14737175.2014.922878>
- Graziane, N.M., Sun, S., Wright, W.J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y.H., Nestler, E.J., Wang, Y.T., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2016. Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat Neurosci* 19, 915–925. <https://doi.org/10.1038/nn.4313>
- Heck, N., Dos Santos, M., Amairi, B., Salery, M., Besnard, A., Herzog, E., Boudier, T., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2015. A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. *Brain Struct Funct* 220, 2953–2966. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0837-2>
- 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>
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29, 565–598.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Keyes, P.C., Adams, E.L., Chen, Z., Bi, L., Nachtrab, G., Wang, V.J., Tessier-Lavigne, M., Zhu, Y., Chen, X., 2020. Orchestrating Opiate-Associated Memories in Thalamic Circuits. *Neuron* 107, 1113–1123.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.028>
- 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* 69, 1026–1034.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.013>
- Kravitz, A.V., Tye, L.D., Kreitzer, A.C., 2012. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15, 816–818. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Le Merrer, J., Befort, K., Gardon, O., Filliol, D., Darcq, E., Dembele, D., Becker, J.A.J., Kieffer, B.L., 2012. Protracted abstinence from distinct drugs of abuse shows regulation of a common gene network: Drug abstinence and genes. *Addiction Biology* 17, 1–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00365.x>
- Liu, X.-Y., Chu, X.-P., Mao, L.-M., Wang, M., Lan, H.-X., Li, M.-H., Zhang, G.-C., Parelkar, 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>
- Lobo, M.K., Covington, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D., 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, 385–390. <https://doi.org/10.1126/science.1188472>
- 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>
- Ozdemir, D., Allain, F., Kieffer, B.L., Darcq, E., 2023. Advances in the characterization of negative affect caused by acute and protracted opioid withdrawal using animal models. *Neuropharmacology* 232, 109524. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109524>

- Papaleo, F., Contarino, A., 2006. Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. *Behav Brain Res* 170, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.02.009>
- Papaleo, F., Kitchener, P., Contarino, A., 2007. Disruption of the CRF/CRF1 Receptor Stress System Exacerbates the Somatic Signs of Opiate Withdrawal. *Neuron* 53, 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.022>
- Ren, Z., Sun, W.L., Jiao, H., Zhang, D., Kong, H., Wang, X., Xu, M., 2010. Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* 168, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.034>
- Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2020. From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type-Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biol Psychiatry* 87, 944–953. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.001>
- 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>
- Wang, M., Wong, A.H., Liu, F., 2012. 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>
- Wise, R.A., Koob, G.F., 2014. The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 39, 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Woods, A.S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluit, C., Franco, R., Ferré, S., 2005. Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J Mol Neurosci* 26, 125–132. <https://doi.org/10.1385/JMN:26:2-3:125>
- Zanos, P., Georgiou, P., Gonzalez, L.R., Hourani, S., Chen, Y., Kitchen, I., Kieffer, B.L., Winsky-Sommerer, R., Bailey, A., 2016. Emotional Impairment and Persistent Upregulation of mGlu₅ Receptor following Morphine Abstinence: Implications of an mGlu₅-MOPr Interaction. *IJNPPY* 19, pyw011. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw011>
- Zanos, P., Georgiou, P., Wright, S.R., Hourani, S.M., Kitchen, I., Winsky-Sommerer, R., Bailey, A., 2014. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. *Neuropsychopharmacology* 39, 855–865. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.285>

Conclusion générale, discussion et perspectives

Au cours de ma thèse, nous avons montré que les hétéromères DAR-NMDAR étaient modulés dans des modèles précliniques de dépression et d'addiction aux opioïdes. Le rationnel de ce projet se base sur les travaux précédents de l'équipe auxquels j'ai participé, montrant que l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR induite par la cocaïne était nécessaire au développement des réponses cellulaires, moléculaires et comportementales induite par cette drogue, et que les D2R-NMDAR contrôlaient également le maintien de ces adaptations durables. De manière intéressante, ces complexes sont spécifiques des drogues puisque leur blocage n'altère pas les comportements guidés par une récompense naturelle comme la nourriture. Enfin, les modulations D2R-NMDAR observées chez la souris en réponse à la cocaïne sont retrouvées dans des tissus post-mortem humains issus de sujets avec un historique d'addiction aux psychostimulants. Ces données montrent le rôle important des hétéromères DAR-NMDAR dans le « dialogue » néfaste entre la signalisation DAergique et glutamate induit par les psychostimulants et suggèrent le potentiel rôle thérapeutique que pourrait offrir le ciblage de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans le traitement de l'addiction aux psychostimulants (Andrianarivelo et al., 2021 en Annexe I).

Toutefois, il est important de noter que la dépression et l'addiction partagent des points communs au niveau neurobiologique. Dans les modèles précliniques de ces deux conditions pathologiques, on observe une augmentation de la libération de DA au sein du NAc qui module durablement la transmission glutamatergique par la DA et la plasticité structurale des MSN du NAc, et engendre des adaptations comportementales à long terme (Allichon et al., 2021). De plus, les observations cliniques montrent une forte prévalence de comorbidités entre ces deux maladies psychiatriques. En effet, elles partagent des facteurs de risques communs, ce qui suggère l'existence de mécanismes moléculaires et cellulaires communs, au moins partiellement, à ces deux pathologies. Aux vues de ces interactions entre DA et glutamate au sein du circuit de la récompense communément observés dans des modèles précliniques d'addiction et de dépression, nous avons émis l'hypothèse que ces hétéromères DAR-NMDAR pouvaient également être impliqués dans la dépression.

En collaboration avec l'équipe de Jacques Barik (Article I), nous avons montré une augmentation des fonctions NMDAR dans les D1R-MSN qui corrèle avec l'intensité du phénotype dépressif chez les souris susceptibles dans le modèle de CSDS. À l'inverse, le stress social chronique altère la physiologie des D2R-MSN aussi bien chez les souris susceptibles que résilientes. Nous avons ensuite montré que la susceptibilité au stress était associée à une augmentation de l'hétéromérisation D1R-NMDAR dans le NAc, alors que les hétéromères D2R-NMDAR se trouvent diminués chez les souris stressées. Nous avons également apporté un lien de causalité entre les adaptations cellulaires et comportementales dans le paradigme du CSDS en montrant que le blocage des complexes D1R-NMDAR dans le NAc permettait de prévenir le phénotype dépressif et les altérations cellulaires associés. De manière plus surprenante, nous avons observé que l'inhibition des hétéromères D1R-NMDAR permettait de bloquer les effets du stress chronique sur les populations D1R-MSN et D2R-MSN. De manière plus générale, nous avons montré que, tout comme les substances addictives, le stress chronique induisait un déséquilibre de l'activité des deux sous-population de MSN au profit des D1R-MSN. Nous montrons également que ce déséquilibre est associé à un renforcement des collatérales inhibitrices issues des D1R-MSN et projetant sur les D2R-MSN, sélectivement chez les souris exprimant un phénotype

dépressif. Enfin, nous avons observé, comme pour la souris, une augmentation de l'hétéromérisation D1R-NMDAR et une diminution des hétéromères D2R-NMDAR dans le NAc chez des sujets humains souffrant de dépression majeure. Ces données révèlent l'implication des complexes D1R-NMDAR dans la dépression et met en lumière leur potentiel intérêt pour le développement de futures stratégies thérapeutiques.

Afin d'élargir l'étude du rôle des hétéromères dans les comportements addictifs, nous avons testé leur implication dans les altérations induites par une autre classe de drogue que les psychostimulants, que sont les opioïdes. Notre étude en cours (**Résultats partie II**) montre d'ores et déjà que la morphine module également les complexes DAR-NMDAR dans plusieurs sous-régions striatales, en particulier les D2R-NMDAR. Nous avons montré également que le blocage des hétéromères D2R-NMDAR permet de bloquer les propriétés hédoniques de la morphine.

Dans l'ensemble, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui peuvent être communs à la dépression et à l'addiction aux psychostimulants ou aux opioïdes.

I. Modulation des hétéromères DAR-NMDAR dans les modèles précliniques d'addiction et de dépression

1. Détection des hétéromères DAR-NMDAR

Précédemment, les travaux du laboratoire ont montré une modulation des complexes D1R-NMDAR en réponse à la stimulation *in vitro* concomitante des récepteurs partenaires (E. Cahill et al., 2014) et des complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR en réponse aux psychostimulants *in vivo* (Andrianarivelo et al., 2021), grâce à la technique de PLA. Au cours de ma thèse, nous avons montré que ces hétéromères étaient également modulés dans des modèles précliniques de dépression et d'addiction aux opioïdes. Ces complexes ont également été détectés par PLA sur des tissus post-mortem humains de sujets addicts aux psychostimulants (Andrianarivelo et al., 2021) et de sujets dépressifs (**Article I**).

Contrairement à l'utilisation de techniques de biochimie comme la co-IP, la PLA (**Figure 45**) présente l'avantage d'étudier les interactions protéine-protéine endogène *in situ* sans avoir recours à la préparation de lysats cellulaires, ou encore à la surexpression de récepteurs. De plus, cette technique permet la visualisation des complexes dans différentes régions cérébrales, comme nous l'avons fait par exemple dans des sous-régions striatales de petite taille. Au cours de ma thèse, des projets réalisés au laboratoire nous ont permis de visualiser la présence des complexes DAR-NMDAR dans le PFC, l'hippocampe, le septum, l'amygdale et au sein du PVT. Toutefois, le D2R et NMDAR sont également exprimés par les ChAT ainsi que les cellules gliales (Tepper et al., 2010).

Un désavantage de cette approche est que la résolution de la PLA est telle qu'elle permet de déterminer une proximité seulement si la distance entre les deux protéines d'intérêts est inférieure ou égale à 40 nm. Un signal PLA peut donc potentiellement apparaître même lorsque les protéines n'interagissent pas directement entre elles.

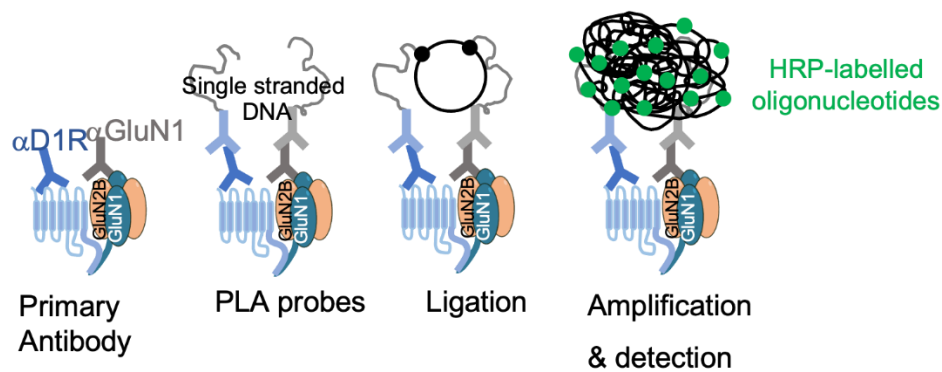


Figure 45 | Schéma représentatif de la technique de Proximity Ligation Assay (PLA).

Deux anticorps primaires d'espèces différentes sont utilisés pour détecter les deux protéines d'intérêt. Des anticorps secondaires (sonde PLA), spécifiques à l'espèce et lié à un ADN simple brin court, se fixent aux anticorps primaires. Lorsque les sondes PLA sont à proximité (inférieur à 16 nm), les brins d'ADN interagissent grâce à l'ajout d'oligonucléotides « connecteurs » qui les relient et les ligature grâce à l'ajout d'une ligase. Après l'étape de ligature enzymatique, la matrice d'ADN circulaire est amplifiée à l'aide d'une polymérase et détecter grâce à l'ajout d'oligonucléotides complémentaires couplés à la HRP (peroxydase de Raifort). L'étape finale consiste à ajouter les substrats de la HRP pour révéler la proximité entre les protéines, sous forme de point PLA marron en *brightfield*. La révélation peut également se faire par fluorescence.

Néanmoins, dans notre cas de figure, nous parlons d'interaction physique directe lors de la détection des complexes DAR-NMDAR par PLA. En effet, dans le **Chapitre 2**, nous avons décrits les études antérieures montrant, par des approches *in vitro* et *in vivo*, les interactions directes entre D1R-NMDAR (Fiorentini et al., 2003; Lee et al., 2002) et D2R-NMDAR (Liu et al., 2006). De plus, le blocage de ces complexes, grâce à nos virus exprimant un peptide interférant, entraîne la perte du signal PLA, contrairement aux virus contrôles (Andrianarivelo et al., 2021; E. Cahill et al., 2014).

Enfin, dans la plupart des cas, nous avons choisi d'observer la modulation des hétéromères DAR-NMDAR 24 heures après la dernière exposition à un stress social ou après la dernière injection de morphine pour associer nos observations aux travaux précédents du laboratoire sur les psychostimulants, qui ont été réalisés dans ces conditions (Andrianarivelo et al., 2021). Cette échelle de temps de 24 heures a été choisie sur la base d'études électrophysiologiques qui ont montré des modifications de la plasticité glutamatergique induite par des expositions répétées aux psychostimulants 24 heures après la dernière administration de cocaïne (Kourrich et al., 2007; Pascoli et al., 2012). Toutefois, l'interaction DAR-NMDAR se maintien au cours du temps dans certains cas. Etant donné que la perturbation des D1R-NMDAR et D2R-NMDAR bloque le maintien au cours du temps des symptômes dépressifs et des réponses comportementales induites par la cocaïne respectivement, nous avons souhaité observer plus tardivement, et dans les deux cas, si le maintien des réponses comportementales est associé à une hétéromérisation DAR-NMDAR qui se maintien entre 7 et 8 jours après le sevrage au stress social et à la cocaïne.

2. Mécanismes de formation et localisation des hétéromères DAR-NMDAR

Bien qu'on ne connaisse pas précisément les mécanismes impliqués dans la formation de ces complexes *in vivo*, plusieurs hypothèses ont été proposées. En effet, comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 2** de l'introduction, la formation de ces complexes pourrait reposer sur un changement de conformation des NMDAR stimulés par un agoniste qui pourrait ainsi piéger les D1R aux synapses et

réduire leur diffusion latérale à la membrane plasmique pour confiner les complexes D1R-NMDAR dans les compartiments synaptiques et péri-synaptiques (Cepeda and Levine, 2006; Ladepeche et al., 2013; Scott et al., 2006). Cette hétéromérisation pourrait également impliquer des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation du D1R sur Ser397 qui est potentiellement ciblée par la cycline kinase inhibitrice CK1, et augmente l'interaction D1R-NMDAR (Scott et al., 2006; Woods et al., 2005). Il serait donc intéressant d'analyser le niveau d'activation de cette kinase dans les modèles précliniques que nous avons utilisés. Un autre modèle implique une oligomérisation de ces complexes au préalable dans le réticulum endoplasmique qui sont ensuite transportés vers la synapse (Fiorentini et al., 2003). Dans ce contexte, il est donc probable que les signaux PLA que nous observons soient associés à des hétéromères DAR-NMDAR exprimés à la surface de la membrane plasmique, mais également potentiellement dans le compartiment intracellulaire.

Nous avons également vu dans le **Chapitre 2** que les hétéromères D1R-NMDAR avaient été détectés dans les fragments enrichis en PSD au niveau de la synapse par co-IP (Fiorentini et al., 2003). Une étude antérieure du laboratoire a également établi le rôle des hétéromères D1R-NMDAR dans la modulation des courants post-synaptiques NMDAR par la DA et la LTP des synapses glutamatergiques projetant sur les D1R-MSN, appuyant leur localisation à la synapse (Cahill et al., 2014). De manière importante, les travaux de l'équipe de C. Lüscher ont permis de voir que la DA module la transmission glutamatergique en réponse à la cocaïne dans les D1R-MSN (pour revue, Salery et al., 2020) et nous avons montré que le blocage de l'hétéromérisation D1R-MSN inhibe cette plasticité synaptique induite par la DA sur la transmission glutamatergique des D1R-MSN en réponse à la cocaïne (Andrianarivelo et al., 2021), ce qui conforte le fait qu'une fraction de ces hétéromères est présente au niveau des synapses dans le NAc. De plus, notre étude (**Article I**) a montré que le blocage des hétéromères D1R-NMDAR module les propriétés des courants NMDAR post-synaptiques et l'intégration du signal des D1R-MSN, renforçant ainsi l'idée d'une expression synaptique de ces complexes de récepteurs. Les hétéromères D2R-NMDAR ont également été détectés dans les fractions enrichies en PSD de neurones du striatum, de l'hippocampe et du PFC (Liu et al., 2006). Toutefois, leur expression en dehors de la synapse n'a pas encore été montrée, bien que la sous-unité GluN2B de NMDAR, interagissant avec IL3 D2R, a été détectée en péri-synaptique, notamment dans l'hippocampe (Berg et al., 2013).

Les travaux de l'équipe de C. Lüscher montrent également que les afférences glutamatergiques projetant sur les D1R-MSN modulées par la DA en réponse à la cocaïne diffèrent suivant les comportements testés (Pascoli et al., 2018, 2014, 2012). Il serait donc intéressant de tester si l'hétéromérisation D1R-NMDAR prend place spécifiquement aux synapses glutamatergiques potentialisées par la DA dans les D1R-MSN. Toutefois, la technique de PLA ne nous permet pas directement de localiser les complexes de récepteurs par rapport aux synapses.

Pour tenter d'adresser ce point, l'équipe a développé une lignée de souris 3 couleurs exprimant les afférences DAergiques en rouge (DAT-Cre-Ai14-ROSAtdtomato) et toutes les afférences glutamatergiques (sauf le thalamus) en vert (VGLUT1^{Vénus}). Cette lignée de souris est issue d'un premier croisement entre les souris DAT-Cre et les souris Ai14-ROSAtdtomato, puis d'un croisement entre les souris DAT-Cre-Ai14-ROSAtdtomato avec les souris VGLUT1^{Vénus}. Ces souris VGLUT1^{Vénus} consiste en l'association de la protéine de fusion Vénus et du marqueur vésiculaire glutamatergique VGLUT1 provenant du cortex, de l'hypothalamus et de la BLA. Ces souris sont ensuite injectées avec un virus CAG-flex-mTurquoise2 (bleu), marquant soit les neurones D1R- (PPTA-Cre) soit les neurones D2R-MSN

(PPE-Cre), permettant d'identifier les composants de la synapse tripartite formées au sein du striatum (**Figure 46**). Ces souris pourront être exposées au protocole de CSDS ou aux drogues, puis perfusées afin de réaliser des PLA fluorescentes et d'observer la localisation plus précise des complexes DAR-NMDAR, et si leur nombre dépend des afférences glutamatergiques, DAergiques ou les deux. Aux vues du rôle d'intégrateurs des signaux DAergique et glutamatergique des hétéromères DAR-NMDAR, on peut émettre l'hypothèse que leur densité serait plus importante au niveau des épines dendritiques des MSN recevant à la fois un bouton dopaminergique et un bouton glutamatergique.

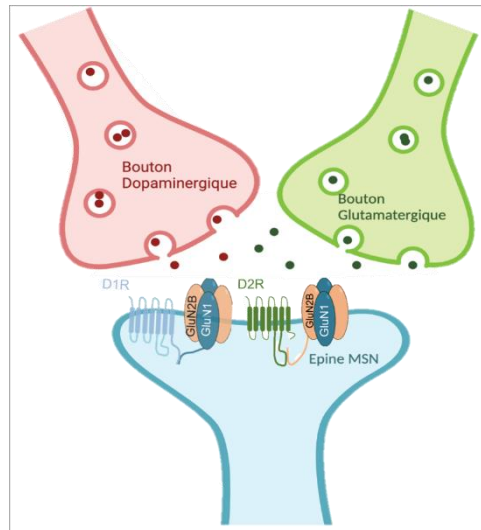


Figure 46 | Schéma représentatif des afférences dopaminergiques, glutamatergiques et GABAergiques marquées dans les souris 3 couleurs

II. Etude du rôle des hétéromères DAR-NMDAR en réponse à la morphine

Au cours de cette étude toujours en cours, nous avons étudié la modulation et le rôle des complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans les propriétés psychoactives et renforçantes de la morphine chez la souris (**Résultats partie II, Figure 1 et 3**). Nous avons observé que la sensibilisation locomotrice induite par la morphine était associée à une augmentation de l'hétéromérisation D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans l'ensemble des sous régions striatales étudiées (**Résultats partie II, Figure 1**). L'hétéromérisation accrue des DAR-NMDAR est donc induite par des injections répétées de morphine, comme observé avec la cocaïne (**Andrianarivelo et al., 2021**). Toutefois, le blocage de ces complexes au sein du NAc durant le paradigme de la sensibilisation locomotrice n'a pas permis de prévenir le développement de la sensibilisation locomotrice (**Résultats partie II, Figure 2**), contrairement à ce que nous avons précédemment observé dans le cas de la cocaïne dans un protocole de sensibilisation locomotrice induite par deux injections (E. Cahill et al., 2014), ou cinq injections de cocaïne (**Andrianarivelo et al., 2021**). L'absence d'effet du ciblage des hétéromères en réponse à la morphine est en accord avec les données de la littérature. En effet, comme nous l'avons discuté dans la partie résultats de cette étude, la sensibilisation locomotrice induite par la morphine apparaît difficile à inhiber à l'aide de stratégies moléculaires visant à moduler la transmission glutamatergique au sein du NAc, alors que de telles approches se sont avérées efficaces pour empêcher le développement des propriétés renforçantes de cette drogue (**Graziane et al., 2016**). De plus, il s'agit d'un comportement psychoactif présent uniquement chez la souris et non observables chez l'Homme. Ces données révèlent une première

différence quant au rôle de l'hétéromérisation DAR-NMDAR dans le développement des propriétés psychoactives de la cocaïne et de la morphine chez la souris.

Par la suite, j'ai donc décidé de mettre au point un protocole de CPP, de manière à étudier la modulation et le rôle de ces complexes de récepteurs sur le développement des propriétés renforçantes induites par cette drogue. Ceci m'a permis de montrer que la préférence CPP induite par la morphine était associée à une hétéromérisation accrue D2R-NMDAR dans le NAc, dont le blocage inhibe la préférence pour le compartiment préalablement associé à la morphine. À l'inverse, nous n'avons pas observé de modulation significative des hétéromères D1R-NMDAR dans ce protocole, ce qui est en accord avec l'absence d'effet du ciblage des interactions D1R-NMDAR dans ce paradigme comportemental (**Résultats partie II, Figure 4**). Ces données révèlent donc un rôle différentiel des hétéromères DAR-NMDAR en réponse à la morphine et soulignent une différence dans les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des propriétés hédoniques induites par les opioïdes et les psychostimulants. En effet, dans le cas des psychostimulants, les D1R-NMDAR et D2R-NMDAR sont tous deux impliqués dans le développement de la CPP, tandis qu'en réponse aux opioïdes, il semblerait que seule l'hétéromérisation D2R-NMDAR soit impliquée.

Nos travaux antérieurs sur les réponses induites par la cocaïne ont mis évidence un rôle différentiel des hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR dans le développement et le maintien des adaptations comportementales ([Andrianarivelo et al., 2021](#)). Pour étudier le rôle des hétéromères DAR-NMDAR dans l'extinction et la rechute, j'ai mis au point un protocole d'extinction et de rechute en réponse à la morphine (**Résultats partie II, Figure 6**). Ce protocole nous permettra à terme d'évaluer le rôle de ces complexes dans cette phase comportementale et d'observer peut-être un effet miroir avec les psychostimulants, où seul les D2R-NMDAR sont impliqués ([Andrianarivelo et al., 2021](#)). En revanche, aux vues de l'importante variabilité en réponse à la morphine, nous devons utiliser un nombre d'animaux par groupe plus important que dans le cas de la cocaïne pour observer une rechute significative, et tester l'impact du ciblage des hétéromères D1R-NMDAR et D2R-NMDAR pendant les phases d'extinction et de rechute.

Dans cette étude, nous avons également mis en place un protocole d'administrations de doses croissantes de morphine pour étudier les effets déplaisants et les symptômes somatiques associés pendant la période de sevrage. J'ai établi ce protocole ainsi que l'analyse automatisée des comportements avec DeepEthogram. Une fois l'analyse fine des comportements optimisée, cette approche nous permettra d'observer la modulation de ces hétéromères dans cette phase spécifique des comportements induits par le sevrage à la morphine, et un possible rôle de ces hétéromères dans cette phase comportementale qui représente un enjeu majeur dans les stratégies thérapeutique liés aux troubles de la consommation aux opioïdes (**Résultats partie II, Figure 7 et 8**). Nous réaliserons des PLA sur les cerveaux perfusés 24 heures après la dernière injection à 100 mg/kg pour étudier la modulation de ces complexes. De plus, nous avons d'ores et déjà réalisé une cohorte injectée avec le virus IL3 dans le NAc permettant de bloquer les interactions D2R-NMDAR pendant l'administration de doses croissantes de morphine, qui seront analysés prochainement.

La suite de cette étude sera également réalisée en collaboration (Emmanuel Deval et Jacques Barik, IMPC, Nice) pour étudier le rôle éventuel des hétéromères DAR-NMDAR dans les propriétés analgésiques de la morphine, par PLA et grâce à notre stratégie virale. De plus, l'équipe collabore en

routine avec le laboratoire de Jacques Barik. Ainsi, nous étudierons l'impact du blocage de ces complexes dans les propriétés électrophysiologiques des neurones D1R- et D2R-MSN. Enfin, nous pourrions observer si la modulation des complexes DAR-NMDAR par PLA chez des sujets humains avec un historique de dépendance majeure aux opioïdes est la même que celles observées chez la souris.

III. Balance entre l'activité D1R- et D2R-MSN et rôle des hétéromères dans des modèles précliniques de dépression et d'addiction

L'équipe de C. Lüscher a montré qu'en réponse à des injections répétées de cocaïne suivies d'un sevrage de 10 jours, les afférences glutamatergiques projetant sur D1R-MSN étaient potentialisées par un mécanisme impliquant la stimulation du D1R. Un lien causal entre cette plasticité synaptique au niveau des D1R-MSN et les adaptations comportementales a été établi grâce à des approches optogénétiques (Pascoli et al., 2018, 2014, 2012). En revanche, la cocaïne ne modifie pas la transmission glutamatergique des afférences corticales projetant sur les D2R-MSN (Terrier et al., 2016). Cependant, dans le paradigme d'auto-administration de cocaïne, lorsque les animaux ont un accès prolongé à une forte dose de cocaïne, la transmission glutamatergique des D2R-MSN est facilitée (Terrier et al., 2016). Lorsque l'on bloque les hétéromères D1R-NMDAR dans le NAc, cela empêche la DA de faciliter la fonction des NMDAR dans les D1R-MSN en réponse à la cocaïne et bloque les réponses comportementales associées (Andrianarivelo et al., 2021). L'ensemble de ces données indiquent que les psychostimulants induisent une augmentation relative de l'activité des D1R-MSN par rapport à celle des D2R-MSN, que l'on bloque en perturbant l'interaction D1R-NMDAR (Andrianarivelo et al., 2021). Bien que peu de changement ait été observé dans la transmission glutamatergique exercée sur les D2R-MSN en réponse à la cocaïne (Terrier et al., 2016), la perturbation de l'hétéromérisation D2R-NMDAR, empêche l'inhibition des fonctions NMDAR par la DA sur les D2R-MSN et suffit à prévenir le développement et le maintien de la sensibilisation locomotrice et la CPP induites par la cocaïne (Andrianarivelo et al., 2021). Ces données suggèrent que le déséquilibre de la balance D1R- et D2R-MSN produit par la cocaïne est restaurée grâce à la perturbation de l'association entre DAR et NMDAR. Dans le cas des opioïdes, les mécanismes sont moins connus. L'équipe de Yan Dong a montré une action de la morphine sur les neurones D2R-MSN pour aboutir au même déséquilibre en faveur des D1R-MSN (Graziane et al., 2016). Dans cette étude, ils ont montré que la cocaïne et la morphine produisaient des adaptations différentes au niveau des synapses excitatrices du NAc, bien que les deux classes de drogue induisent des comportements addictifs. En effet, la cocaïne induit des synapses silencieuses dans les D1R-MSN, ce qui est probablement synaptogénèse au niveau des D1R-MSN, tandis que la morphine induit des synapses silencieuses dans les D2R-MSN à travers l'internalisation des AMPAR des synapses préexistantes, associées à une diminution des épines dendritiques au niveau des D2R-MSN (Graziane et al., 2016). Ainsi, l'effet produit sur l'équilibre entre les entrées excitatrices sur les D1R- et D2R-MSN du NAc est le même par des mécanismes qui diffèrent. En effet, dans le cas de la morphine, ce déséquilibre des activités des D1R-MSN et D2R-MSN au profit des D1R-MSN serait principalement lié à une diminution de l'activité des D2R-MSN. Cela pourrait expliquer la présence d'altérations comportementales communes au sein du NAc induite par les psychostimulants et les opioïdes.

Dans notre cas, nous observons une augmentation de l'hétéromérisation D2R-NMDAR en réponse à l'administration répétée de morphine qui contribue à l'inhibition des D2R-MSN dans le NAc, avec peu ou pas de modulation des D1R-NMDAR en fonction de la réponse comportementale observée (Résultats partie II, Figure 1 et 3). De plus, le blocage des complexes D2R-NMDAR prévient de manière

significative le développement de la CPP induite par la morphine, contrairement à la perturbation des D1R-NMAR (**Résultats partie II, Figure 4**).

Enfin, dans le cas de la dépression, nous avons observé que le stress social chronique induit respectivement une augmentation et une diminution de l'intégration du signal dans les D1R-MSN et D2R-MSN du NAc, chez les souris susceptibles. Ces altérations cellulaires sont associées à une augmentation de la formation des hétéromères D1R-NMDAR et une diminution de celle des D2R-NMDAR dans le NAc, aussi bien chez la souris que chez des sujets humains souffrant de dépression majeure (**Article I, Figure 2**). Nous avons montré que la perturbation de l'interaction D1R-NMDAR prévient l'apparition et le maintien des symptômes dépressifs, alors que le ciblage des D2R-NMDAR n'a aucun effet. Nous montrons également que le ciblage des hétéromères D1R-NMDAR bloque les effets du stress aussi bien dans les D1R-MSN que dans les D2R-MSN pour restaurer un équilibre entre les activités de ces deux populations de MSN, et produit un effet antidépresseur (**Article I, Figure 4**).

Ainsi, à travers ces trois études, nous pouvons conclure trois choses :

D'une part, la cocaïne et la morphine agissent de manière distincte pour produire dans les deux cas un même déséquilibre de la balance D1R- et D2R-MSN dans le NAc (**Figure X**) (**Andrianarivelo et al., 2021** en **Annexe I** ; **Graziane et al., 2016** ; **Résultats partie II**).

D'autre part, la dépression agit de manière opposée sur les D1R- et les D2R-MSN, produisant une augmentation et une diminution de l'activité des MSN respectivement, dans le NAc (**Figure 47**) (**Résultats partie II**).

Enfin, la perturbation des complexes DAR-NMDAR permet de restaurer le déséquilibre dans la balance D1R- et D2R-MSN produit par les drogues ou le stress (**Andrianarivelo et al., 2021** ; **Article I et Résultats partie II**).

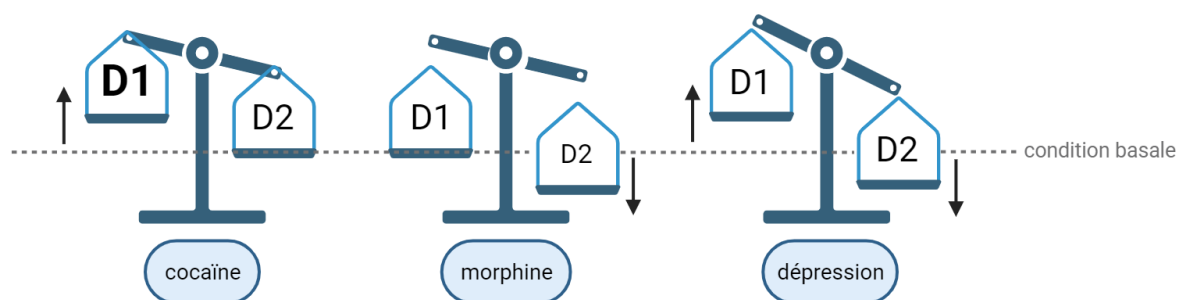


Figure 47 | Schéma récapitulatif du déséquilibre provoqué par la cocaïne, la morphine et la dépression sur la balance D1R- et D2R-MSN du NAc.

Schéma réalisé avec Biorender.

IV. Remodelage du microcircuit striatal

Au cours du **Chapitre 2**, nous avons vu l'existence de collatérales réciproques entre les deux populations de MSN du NAc, bien que les projections collatérales des D2R-MSN → D1R-MSN ont été plus étudiées que les projections collatérales des D1R-MSN → D2R-MSN. En effet, il a été montré que les D2R-MSN projetaient, via des collatérales inhibitrices, sur les D1R-MSN (Burke et al., 2017; Cazorla et al., 2014; Dobbs et al., 2016). De plus, il a été montré que la cocaïne diminue l'efficacité des collatérales des D2R- vers les D1R-MSN, favorisant l'activité des D1R-MSN (Dobbs et al., 2016). Enfin, ces collatérales D2R-MSN → D1R-MSN sont dotées d'une plasticité structurelle importante associée au niveau d'expression de D2R (Cazorla et al., 2014).

Dans le cas de notre étude sur la dépression, basée sur le paradigme de défaite sociale chronique (**Article I**), on observe un effet bénéfique du blocage des hétéromères D1R-NMDAR qui procure un effet antidépresseur quasi-total au niveau comportemental (**Article I, Figure 3 et Figure S2**). Cet effet perdure jusqu'à une semaine après le stress chronique (**Article I, Figure 3 H**). En revanche, on observe toujours un effet du stress sur les D2R-MSN en bloquant les interactions D2R-NMDAR (**Article I, Figure S2 E à H**). Toutefois, le blocage des D1R-NMDAR par le virus C1 restaure les effets du stress sur l'intégration du signal aussi bien dans les D1R-MSN que dans les D2R-MSN (**Article I, Figure 4 B-C**). Le virus C1, bloquant l'interaction D1R-NMDAR, prévient la LTP induite par une stimulation à haute fréquence du cortex infralimbique dans les D1R-MSN du NAc, mais n'altère pas la plasticité à long terme induite dans les D2R-MSN (E. Cahill et al., 2014). Ainsi, la restauration du signal d'intégration des D2R-MSN chez les souris susceptibles ne peut s'expliquer par un effet direct du virus C1 sur les D2R-MSN. Ces résultats nous ont poussé à regarder le remodelage du micro-circuit striatal provoqué par le stress chronique dans les MSN du NAc, en particulier les collatérales D1R-MSN → D2R-MSN.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une approche optogénétique pour stimuler les collatérales D1R-MSN et enregistrer les courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) dans les neurones D2R-MSN marqués avec PPE-tdTomato (**Article I, Figure 5 A**). Suivant les mêmes approches, nous avons également activé par optogénétique les collatérales des D2R-MSN et enregistré les réponses inhibitrices évoquées par la lumière dans les D1R-MSN marqués. Par la suite, nos collaborateurs ont déterminé le nombre de neurones cibles présentant une réponse inhibitrice ainsi que l'intensité du courant inhibiteur provoqué, chez des souris naïves, susceptibles et résilientes (**Article I, Figure 5 D**).

Nous observons, grâce à cette approche, que le pourcentage de neurones D1R-MSN qui connecte les D2R-MSN est plus important chez les susceptibles que chez les animaux naïfs ou résilients, mais que l'intensité de l'inhibition est identique entre les souris naïves, susceptibles et résilientes (**Article I, Figure 5 B-C**). De plus, nous avons observé que le pourcentage de neurones D2R-MSN qui connecte les neurones D1R-MSN n'est pas impacté par le stress social chronique (**Article I, Figure 5 E-F**). Ces résultats montrent donc un remodelage des collatérales D1R-MSN → D2R-MSN sélectivement chez les souris susceptibles. Ils suggèrent également que ce remodelage est plus structural (morphologique) car l'intensité des réponses inhibitrices enregistrée dans les D2R-MSN, suite à la stimulation des collatérales D1R-MSN, reste identiques dans tous les groupes expérimentaux. À ce stade de l'étude, nous avons donc montré un effet antidépresseur grâce à la perturbation des complexes D1R-NMDAR dans le NAc pendant le développement et le maintien du phénotype dépressif susceptible. De plus, nous avons montré un remodelage des projections collatérales des neurones D1R-MSN sur les D2R-MSN, qui semble être de nature structurale.

Ainsi, pour répondre à cette question, les changements morphologiques potentiels, impliqués dans les collatérales D1R-MSN → D2R-MSN en réponse au stress, seront évalués par le marquage viral des présynapses D1R-MSN et des post-synapses D2R-MSN. Pour cela, nous injecterons un mélange d'AAV-PPTA-Cre et d'AAV-DIO-mGFP-2A-Synaptophysine-mRuby (Beier et al., 2015) avec un ratio de 1/10 000 pour obtenir un marquage épars, mais intense (Andrianarivelo et al., 2021; Dos Santos et al., 2017) des D1R-MSN en vertu des boutons présynaptiques des D1R-MSN (Synaptophysine-mRuby). Les neurones cibles D2R-MSN seront quant à eux marqués grâce au virus AAV-PPE-mTurquoise2 (Figure 48). Le nombre de contacts synaptiques D1R-MSN sur D2R-MSN sera étudié par microscopie confocale 3D et par des procédures automatisées couramment utilisée au laboratoire (Dos Santos et al., 2017).

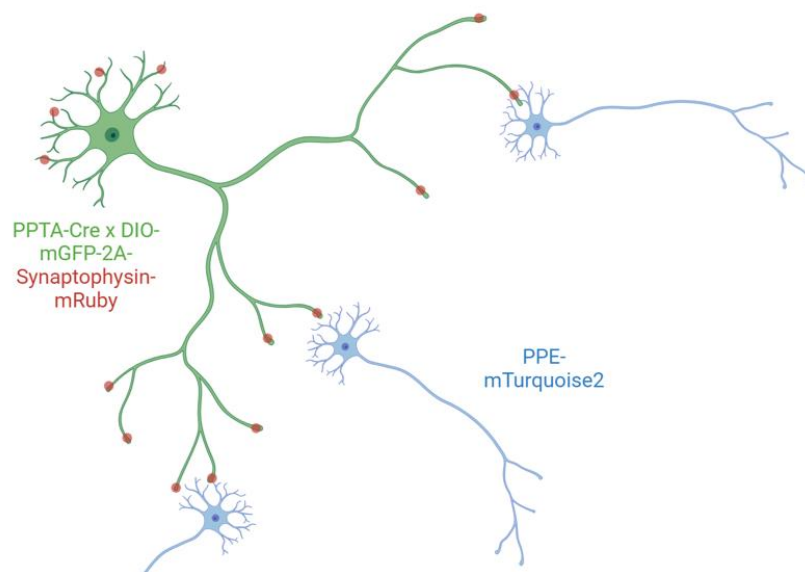


Figure 48 | Schéma expérimental pour identifier les changements morphologiques des collatérales D1R-MSN sur D2R-MSN induites par l'exposition à stress chronique.

Schéma réalisé avec Biorender.

Ainsi, cette approche expérimentale nous permettra d'étudier le remodelage morphologique des projections collatérales D1R-MSN → D2R-MSN. Comme pour la connectivité fonctionnelle, nous réaliserons également l'expérience réciproque pour évaluer, au niveau morphologique, l'impact du stress chronique sur les projections collatérales D2R-MSN sur les neurones D1R-MSN. D'après les études électrophysiologiques (Article I), nous pouvons envisager que les collatérales d'un D1R-MSN puissent connecter un plus grand nombre de D2R-MSN chez les souris susceptible au stress par rapport à des animaux naïf ou résilients. Cette première série d'expériences permettra de comprendre le remodelage des collatérales réciproques entre les D1R-MSN et les D2R-MSN dans un modèle préclinique de dépression et de comparer des souris naïves, susceptibles et résilients.

Cette approche pourra également être utilisée en combinaison avec nos virus interférant avec l'hétéromérisation D1R-NMDAR (C1) et D2R-NMDAR (IL3), afin d'étudier si le remodelage du microcircuit striatal s'effectue à travers la modulation des hétéromères. Ces études sont actuellement en cours dans le laboratoire du Dr J. Barik.

Il serait intéressant d'étudier le rôle fonctionnel de ces collatérales dans les adaptations comportementales induites par la dépression, et établir un lien causal entre le microcircuit du NAc et les symptômes dépressifs. Ce point pourrait être abordé en injectant dans le NAc un mélange de PPTA-Cre ou PPE-Cre avec une opsine inhibitrice fusionnée avec le domaine C-terminal de mGluR2 (Hamada et al., 2021; Rost et al., 2022), qui permet une inhibition pérисynaptique, induite au niveau du NAc, des collatérales grâce à l'adressage de l'opsine au niveau des boutons présynaptiques. Par conséquent, nous pourrions, après le développement du phénotype dépressif (CSDS puis SIT1), inhiber les collatérales de manière intermittente pendant 20 minutes par jour pendant 5 jours dans le NAc et faire un nouveau test d'interaction sociale (SIT2) afin d'observer si la manipulation optogénétique des collatérales permet de changer le phénotype susceptible au stress (Figure 49).

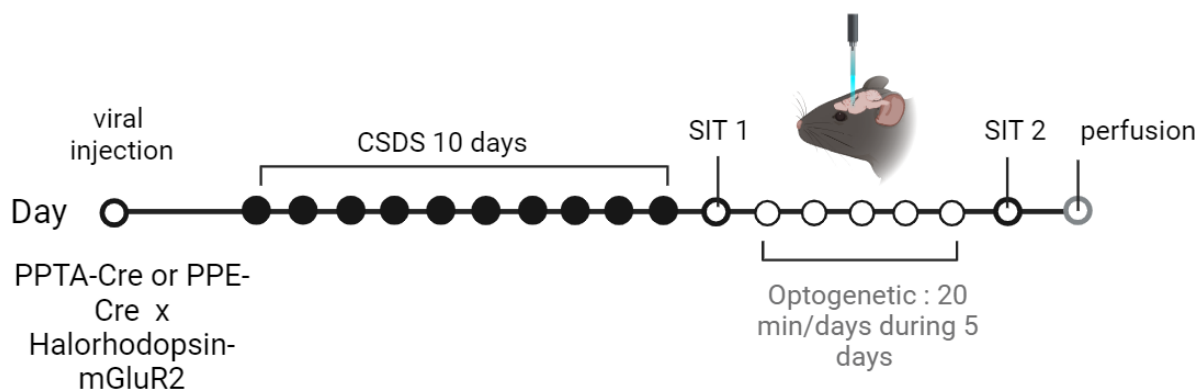


Figure 49 | Schéma expérimental permettant de moduler le microcircuit striatal et d'observer des changements dans l'expression du phénotype dépressif.

Injections virales permettant de marquer, soit les neurones D1R-MSN soit les neurones D2R-MSN, avec une halorhodopsine permettant d'inhiber les terminaisons pré-synaptiques localement dans le NAc. Les animaux seront exposés au paradigme de CSDS pendant 10 jours, et leur phénotype sera établi grâce à un premier test d'interaction sociale (SIT 1). L'inhibition des collatérales sera effectuée pendant 5 jours à raison de 20 min par jour dans le NAc. Les animaux seront à nouveau testés pour l'interaction sociale (SIT 2) afin d'observer si l'inhibition optogénétique des collatérales permettent de prévenir l'aversion sociale induite par le stress chronique. Les animaux seront ensuite perfusés. Schéma réalisé avec Biorender.

Cette approche permettrait de révéler un lien causal entre le remodelage du microcircuit striatal et les dérégulations comportementales en réponse au stress chronique. De plus, nous pourrions observer de potentielles modulations dans l'hétéromérisation DAR-NMDAR sur ces animaux après perfusion, en réalisant des PLA si l'état des coupes après retrait de la fibre optique le permet.

Ces différentes approches, pour évaluer le remodelage du circuit local striatal en réponse au stress, pourra également être étudié dans les modèles précliniques d'addiction aux psychostimulants et aux opioïdes. Ainsi, le remodelage des collatérales pourra être observé dans les propriétés récompensantes, mais également déplaisantes grâce au protocole de sevrage à la morphine que nous avons développé. Ce protocole de sevrage pourrait potentiellement induire un remodelage semblable à celui induit en réponse au stress.

Récemment, le laboratoire a obtenu un financement permettant d'étudier le remodelage de ce circuit dans des modèles précliniques d'addiction et de dépression, qui nous permettra d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ces maladies psychiatriques.

V. Alternative à la perturbation des complexes DAR-NMDAR à l'aide d'une stratégie virale

La stratégie virale employée durant ma thèse a permis le blocage des complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR *in vivo* de manière contrôlée dans le temps grâce au promoteur dépendant de la doxycycline (Andrianarivelo et al., 2021). Nous avons ainsi étudié le rôle de ces complexes de récepteurs dans différentes phases comportementales et montré qu'ils représentaient de potentielles cibles thérapeutiques dans le domaine de l'addiction et de la dépression. Nos études sur le rôle de ces complexes reposent sur l'utilisation de peptides interférant, exprimés localement dans le NAc ou le striatum dorsal à l'aide de virus, qui bloquent efficacement les interactions D1R-NMDAR ou D2R-NMDAR, sans altérer les fonctions des récepteurs partenaires indépendamment de leur hétéromérisation (Andrianarivelo et al., 2021; E. Cahill et al., 2014). Bien qu'efficace, cette stratégie virale reste invasive révélant la nécessité de trouver une alternative au blocage des complexes DAR-NMDAR *in vivo*.

À ce jour, l'équipe travaille sur un projet visant à identifier de nouvelles molécules inhibitrices permettant le blocage de ces hétéromères grâce à une administration systémique dans des modèles précliniques d'addiction et de dépression. Il s'agit d'un projet multidisciplinaire alliant la chimie (Collaboration Dr N. Pietranscota, LBM, Sorbonne Université) et la neurobiologie, et repose d'une part sur la modélisation *in silico* des domaines d'interactions des complexes D1R-NMDAR et D2R-NMDAR et, d'autre part, sur le criblage virtuel à haut débit de molécules candidates capables de bloquer ces interactions. Cette approche a d'ores et déjà permis d'identifier des molécules candidates capables de bloquer les interaction D1R-NMDAR dans des cultures primaires de neurones striataux. Les molécules les plus efficaces *in vitro* sur cellules seront ensuite testées pour leur capacité à bloquer les complexes de récepteurs dans le cerveau après administration périphérique. Enfin, leur impact au niveau cellulaire, moléculaire et comportemental sera évalué dans des modèles précliniques d'addiction et de dépression.

Références bibliographiques

- Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.-T., Salter, M.W., Tymianski, M., 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846–850. <https://doi.org/10.1126/science.1072873>
- 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. *Behav. Pharmacol.* 12, 603–611. <https://doi.org/10.1097/00008877-200112000-00004>
- 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. Toward an evolutionary basis for resilience to drug addiction. *Behav. Brain Sci.* 34, 310–311. <https://doi.org/10.1017/S0140525X11000677>
- Ahmed, S.H., Koob, G.F., 1999. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 146, 303–312. <https://doi.org/10.1007/s002130051121>
- 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>
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., Watson, S., 1998. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* 51, 127–140. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(98\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(98)00071-4)
- Alagband, Y., Marshall, J.F., 2013. Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology (Berl.)* 226, 707–719. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2793-y>
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266–271. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90107-I](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-I)
- Al-Hasani, R., McCall, J.G., Shin, G., Gomez, A.M., Schmitz, G.P., Bernardi, J.M., Pyo, C.-O., Park, S.I., Marcinkiewicz, C.M., Crowley, N.A., Krashes, M.J., Lowell, B.B., Kash, T.L., Rogers, J.A., Bruchas, M.R., 2015. Distinct Subpopulations of Nucleus Accumbens Dynorphin Neurons Drive Aversion and Reward. *Neuron* 87, 1063–1077. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.019>
- Allichon, M.-C., Ortiz, V., Pousinha, P., Andrianarivelo, A., Petitbon, A., Heck, N., Trifilieff, P., Barik, J., Vanhoutte, P., 2021. Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse. *sa* 13.
- Altier, N., Stewart, J., 1998. Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 208–215.
- Altier, N., Stewart, J., 1996. Opioid receptors in the ventral tegmental area contribute to stress-induced analgesia in the formalin test for tonic pain. *Brain Res.* 718, 203–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00121-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00121-7)
- Ambroggi, F., Turiault, M., Milet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudeau, S., Balado, E., Barik, J., van der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., Schütz, G., Lazar, M., Marinelli, M., Piazza, P.V., Tronche, F., 2009. Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 12, 247–249. <https://doi.org/10.1038/nn.2282>
- Anderson, S.M., Pierce, R.C., 2005. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol. Ther.* 106, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.12.004>
- Andres, D.S., Darbin, O., 2018. Complex Dynamics in the Basal Ganglia: Health and Disease Beyond the Motor System. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 30, 101–114. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.17020039>

- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Pousinha, P., Fernandez, S.P., Petitbon, A., De Smedt-Peyrusse, V., Heck, N., Ortiz, V., Allichon, M.-C., Kappès, V., Betuing, S., Walle, R., Zhu, Y., Joséphine, C., Bemelmans, A.-P., Turecki, G., Mechawar, N., Javitch, J.A., Caboche, J., Trifilieff, P., Barik, J., Vanhoutte, P., 2021. Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Sci. Adv.* 7, eabg5970. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg5970>
- 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* 152, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.003>
- Anglin, M.D., Hser, Y.I., McGlothlin, W.H., 1987. Sex differences in addict careers. 2. Becoming addicted. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 13, 59–71. <https://doi.org/10.3109/00952998709001500>
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A.M., Kimura, M., 1994. Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 3969–3984. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-06-03969.1994>
- Apicella, P., Ljungberg, T., Scarnati, E., Schultz, W., 1991. Responses to reward in monkey dorsal and ventral striatum. *Exp. Brain Res.* 85. <https://doi.org/10.1007/BF00231732>
- 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 Res.* 746, 141–150. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01219-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01219-x)
- Ates-Alagoz, Z., Adejare, A., 2013. NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *Pharmaceuticals* 6, 480–499. <https://doi.org/10.3390/ph6040480>
- Ayranci, G., Befort, K., Lalanne, L., Kieffer, B.L., Lutz, P.-E., 2015. Dissociation of heroin-induced emotional dysfunction from psychomotor activation and physical dependence among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 1957–1971. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3826-5>
- Bachoffner, P., 1983. Sertürner et la morphine. *Rev. Hist. Pharm.* 71, 199–200.
- Badiani, A., Belin, D., Epstein, D., Calu, D., Shaham, Y., 2011. Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 685–700. <https://doi.org/10.1038/nrn3104>
- Bagley, E.E., Chieng, B.C.H., Christie, M.J., Connor, M., 2005. Opioid tolerance in periaqueductal gray neurons isolated from mice chronically treated with morphine: Opioid tolerance in PAG. *Br. J. Pharmacol.* 146, 68–76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706315>
- Bagot, R.C., Parise, E.M., Peña, C.J., Zhang, H.-X., Maze, I., Chaudhury, D., Persaud, B., Cachope, R., Bolaños-Guzmán, C.A., Cheer, J.F., Deisseroth, K., Han, M.-H., Nestler, E.J., 2015. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nat. Commun.* 6, 7062. <https://doi.org/10.1038/ncomms8062>
- Baik, J.-H., 2013. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Front. Neural Circuits* 7.
- Bailly, J., Allain, F., Schwartz, E., Tirel, C., Dupuy, C., Petit, F., Diana, M.A., Darcq, E., Kieffer, B.L., 2023. Habenular Neurons Expressing Mu Opioid Receptors Promote Negative Affect in a Projection-Specific Manner. *Biol. Psychiatry, Serotonin Signaling in Depression* 93, 1108–1117. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.09.013>
- Baimel, C., McGarry, L.M., Carter, A.G., 2019. The Projection Targets of Medium Spiny Neurons Govern Cocaine-Evoked Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. *Cell Rep.* 28, 2256–2263.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.074>
- Baliki, M.N., Apkarian, A.V., 2015. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron* 87, 474–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005>
- Baliki, M.N., Chialvo, D.R., Geha, P.Y., Levy, R.M., Harden, R.N., Parrish, T.B., Apkarian, A.V., 2006. Chronic pain and the emotional brain: specific brain activity associated with spontaneous fluctuations of intensity of chronic back pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12165–12173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3576-06.2006>

- Baliki, M.N., Geha, P.Y., Fields, H.L., Apkarian, A.V., 2010. Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. *Neuron* 66, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.002>
- Ballard, E.D., Zarate, C.A., 2020. The role of dissociation in ketamine's antidepressant effects. *Nat. Commun.* 11, 6431. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20190-4>
- Balleine, B.W., Delgado, M.R., Hikosaka, O., 2007. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *J. Neurosci.* 27, 8161–8165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1554-07.2007>
- Bals-Kubik, R., Ableitner, A., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1993. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 489–495.
- Barbera, G., Liang, B., Zhang, L., Gerfen, C.R., Culurciello, E., Chen, R., Li, Y., Lin, D.-T., 2016. Spatially Compact Neural Clusters in the Dorsal Striatum Encode Locomotion Relevant Information. *Neuron* 92, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.037>
- Bardo, M.T., Bevins, R.A., 2000. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl.)* 153, 31–43. <https://doi.org/10.1007/s002130000569>
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S.P., Lanteri, C., Godeheu, G., Tassin, J.-P., Mombereau, C., Faure, P., Tronche, F., 2013. Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminoceptive neurons. *Science* 339, 332–335. <https://doi.org/10.1126/science.1226767>
- Barik, J., Parnaudeau, S., Saint Amaux, A.L., Guiard, B.P., Golib Dzib, J.F., Bocquet, O., Bailly, A., Benecke, A., Tronche, F., 2010. Glucocorticoid Receptors in Dopaminoceptive Neurons, Key for Cocaine, Are Dispensable for Molecular and Behavioral Morphine Responses. *Biol. Psychiatry, Mechanisms of Cocaine Addiction* 68, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.03.037>
- Bariselli, S., Fobbs, W.C., Creed, M.C., Kravitz, A.V., 2019. A competitive model for striatal action selection. *Brain Res.* 1713, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.009>
- Barrot, M., Marinelli, M., Abrous, D.N., Rougé-Pont, F., Le Moal, M., Piazza, P.V., 1999. Functional heterogeneity in dopamine release and in the expression of Fos-like proteins within the rat striatal complex. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1155–1166. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00525.x>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 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., Gainetdinov, R.R., 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2007. The Akt–GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.006>
- Becerra, L., Breiter, H.C., Wise, R., Gonzalez, R.G., Borsook, D., 2001. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 32, 927–946. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00533-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00533-5)
- Becker, J.A.J., Clesse, D., Spiegelhalter, C., Schwab, Y., Le Merrer, J., Kieffer, B.L., 2014. Autistic-like syndrome in mu opioid receptor null mice is relieved by facilitated mGluR4 activity. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 2049–2060. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.59>

- Becker, J.A.J., Kieffer, B.L., Le Merrer, J., 2017. Differential behavioral and molecular alterations upon protracted abstinence from cocaine versus morphine, nicotine, THC and alcohol: Abstinence across drugs. *Addict. Biol.* 22, 1205–1217. <https://doi.org/10.1111/adb.12405>
- Befort, K., Filliol, D., Ghate, A., Darcq, E., Matifas, A., Muller, J., Lardenois, A., Thibault, C., Dembele, D., Le Merrer, J., Becker, J.A.J., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008. Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2973–2984. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06273.x>
- Beier, K.T., Steinberg, E.E., DeLoach, K.E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X.J., Kremer, E.J., Malenka, R.C., Luo, L., 2015. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 162, 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- 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, 159. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00159>
- Belujon, P., Grace, A.A., 2017. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 1036–1046. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx056>
- Ben-Eliyahu, S., Marek, P., Vaccarino, A.L., Mogil, J.S., Sternberg, W.F., Liebeskind, J.C., 1992. The NMDA receptor antagonist MK-801 prevents long-lasting non-associative morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 575, 304–308. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90094-p](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90094-p)
- 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., 2007a. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>
- Berridge, K.C., 2007b. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 2016. Liking, Wanting and the Incentive-Sensitization Theory of Addiction. *Am. Psychol.* 71, 670–679. <https://doi.org/10.1037/amp0000059>
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 2003. Parsing reward. *Trends Neurosci.* 26, 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00233-9)
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 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. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.014>
- Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.1120972>
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5671–5685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4206–4211.
- Bewernick, B.H., Hurlmann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B., Axmacher, N., Lemke, M., Cooper-Mahkorn, D., Cohen, M.X., Brockmann, H., Lenartz, D., Sturm, V., Schlaepfer, T.E., 2010. Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation Decreases Ratings of Depression and Anxiety in Treatment-Resistant Depression. *Biol. Psychiatry, Stimulating Research on the Treatment of Depression: Electroconvulsive Therapy, Transcranial Magnetic Stimulation, and Deep Brain Stimulation* 67, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.013>
- Bimpisidis, Z., Wallén-Mackenzie, Å., 2019. Neurocircuitry of Reward and Addiction: Potential Impact of Dopamine-Glutamate Co-release as Future Target in Substance Use Disorder. *J. Clin. Med.* 8, 1887. <https://doi.org/10.3390/jcm8111887>
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
- Blum, K., Eubanks, J.D., Wiggins, B., Wallace, J.E., 1976. Morphine withdrawal reactions in male and female mice. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 3, 363–368. <https://doi.org/10.3109/00952997609077204>
- 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. *Nat. Neurosci.* 16, 632–638. <https://doi.org/10.1038/nn.3369>
- Bofill-Cardona, E., Kudlacek, O., Yang, Q., Ahorn, H., Freissmuth, M., Nanoff, C., 2000. Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *J. Biol. Chem.* 275, 32672–32680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002780200>
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4), 527–542. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>
- Borroto-Escuela, D.O., Narváez, M., Wydra, K., Pintsuk, J., Pinton, L., Jimenez-Beristain, A., Di Palma, M., Jastrzębska, 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.03.003>
- Borroto-Escuela, D.O., Tarakanov, A.O., Bechter, K., Fuxe, K., 2017b. IL1R2, CCR2, and CXCR4 May Form Heteroreceptor Complexes with NMDAR and D2R: Relevance for Schizophrenia. *Front. Psychiatry* 8, 24. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00024>
- Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Filip, M., Fuxe, K., 2018a. A2AR-D2R Heteroreceptor Complexes in Cocaine Reward and Addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 1008–1020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.007>
- Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Li, X., Rodriguez, D., Carlsson, J., Jastrzębska, 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. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0887-1>
- Bossi, S., Pizzamiglio, L., Paoletti, P., 2023. Excitatory GluN1/GluN3A glycine receptors (eGlyRs) in brain signaling. *Trends Neurosci.* S0166223623001273. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.05.002>
- Boulos, L.J., Ben Hamida, S., Bailly, J., Maitra, M., Ehrlich, A.T., Gavériaux-Ruff, C., Darcq, E., Kieffer, B.L., 2020. Mu opioid receptors in the medial habenula contribute to naloxone aversion. *Neuropsychopharmacology* 45, 247–255. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0395-7>
- Bourdy, R., Barrot, M., 2012. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci.* 35, 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>
- Brady, J.E., Giglio, R., Keyes, K.M., DiMaggio, C., Li, G., 2017. Risk markers for fatal and non-fatal prescription drug overdose: a meta-analysis. *Inj. Epidemiol.* 4, 24. <https://doi.org/10.1186/s40621-017-0118-7>

- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., Bredt, D.S., 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757–767. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81053-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81053-3)
- Brimblecombe, K.R., Cragg, S.J., 2017. The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 235–242. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00333>
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., Ungless, M.A., 2009. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4894–4899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811507106>
- Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2010. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* 68, 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- 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. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 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>
- Burton, A.C., Nakamura, K., Roesch, M.R., 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol. Learn. Mem.* 117, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.003>
- 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. *Front. Pharmacol.* 4, 172. <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. Off. J. Soc. 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13140–13150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-07.2007>
- Calati, R., Laglaoui Bakhiyi, C., Artero, S., Ilgen, M., Courtet, P., 2015. The impact of physical pain on suicidal thoughts and behaviors: Meta-analyses. *J. Psychiatr. Res.* 71, 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.09.004>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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., 2018. 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.-L., Covington, H.E., Friedman, A.K., Wilkinson, M.B., Walsh, J.J., Cooper, D.C., Nestler, E.J., Han, M.-H., 2010. Mesolimbic Dopamine Neurons in the Brain Reward Circuit Mediate Susceptibility

- to Social Defeat and Antidepressant Action. *J. Neurosci.* 30, 16453–16458. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3177-10.2010>
- Carlsson, A., Falck, B., Hillarp, N.A., 1962. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 56, 1–28.
- 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>
- Cepeda, C., Levine, M.S., 2006. Where Do You Think You Are Going? The NMDA-D1 Receptor Trap. *Sci. STKE* 2006. <https://doi.org/10.1126/stke.3332006pe20>
- 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, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00013>
- Chang, P.-C., Pollema-Mays, S.L., Centeno, M.V., Procissi, D., Contini, M., Baria, A.T., Martina, M., Apkarian, A.V., 2014. Role of nucleus accumbens in neuropathic pain: linked multi-scale evidence in the rat transitioning to neuropathic pain. *Pain* 155, 1128–1139. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.02.019>
- Charbogne, P., Gardon, O., Martín-García, E., Keyworth, H.L., Matsui, A., Mechling, A.E., Bienert, T., Nasseef, M.T., Robé, A., Moquin, L., Darcq, E., Ben Hamida, S., Robledo, P., Matifas, A., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Harsan, L.-A., von Elverfeldt, D., Hennig, J., Gratton, A., Kitchen, I., Bailey, A., Alvarez, V.A., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2017. Mu Opioid Receptors in Gamma-Aminobutyric Acidergic Forebrain Neurons Moderate Motivation for Heroin and Palatable Food. *Biol. Psychiatry* 81, 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.022>
- Charbogne, P., Kieffer, B.L., Befort, K., 2014. 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 204–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.028>
- Charney, D.S., 2004. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am. J. Psychiatry* 161, 195–216. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.2.195>
- Chaudhury, D., Walsh, J.J., Friedman, A.K., Juarez, B., Ku, S.M., Koo, J.W., Ferguson, D., Tsai, H.-C., Pomeranz, L., Christoffel, D.J., Nectow, A.R., Ekstrand, M., Domingos, A., Mazei-Robison, M.S., Mouzon, E., Lobo, M.K., Neve, R.L., Friedman, J.M., Russo, S.J., Deisseroth, K., Nestler, E.J., Han, M.-H., 2013. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493, 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature11713>
- Chen, C.K., Shu, L.W., Liang, P.L., Hung, T.M., Lin, S.K., 1998. Drug use patterns and gender differences among heroin addicts hospitalized for detoxification. *Chang. Yi Xue Za Zhi* 21, 172–178.
- Chen, S., Xu, D., Fan, L., Fang, Z., Wang, X., Li, M., 2021. Roles of N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs) in Epilepsy. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 797253. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.797253>
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Yu, L., 1993. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem. J.* 295, 625–628.
- Chen, Z., Tang, Z., Zou, K., Huang, Z., Liu, L., Yang, Y., Wang, W., 2021. d-Serine produces antidepressant-like effects in mice through suppression of BDNF signaling pathway and regulation of synaptic adaptations in the nucleus accumbens. *Mol. Med.* 27, 127. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00389-x>
- Chiara, G.D., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 5.
- Chizh, B.A., Headley, P.M., 2005. NMDA antagonists and neuropathic pain--multiple drug targets and multiple uses. *Curr. Pharm. Des.* 11, 2977–2994. <https://doi.org/10.2174/1381612054865082>
- Chouvy, P.-A., 2004. Les fondements historiques des chemins de la drogue. *Outre-Terre* 6, 225–235. <https://doi.org/10.3917/oute.006.0225>

- Christie, N.C., Vojvodic, V., Monterosso, J.R., 2021. The Early Impact of Social Distancing Measures on Drug Use. *Subst. Use Misuse* 56, 997–1004. <https://doi.org/10.1080/10826084.2021.1901934>
- Christoffel, D.J., Golden, S.A., Dumitriu, D., Robison, A.J., Janssen, W.G., Ahn, H.F., Krishnan, V., Reyes, C.M., Han, M.-H., Ables, J.L., Eisch, A.J., Dietz, D.M., Ferguson, D., Neve, R.L., Greengard, P., Kim, Y., Morrison, J.H., Russo, S.J., 2011. I κ B kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 314–321. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4763-10.2011>
- Christoffel, D.J., Golden, S.A., Walsh, J.J., Guise, K.G., Heshmati, M., Friedman, A.K., Dey, A., Smith, M., Rebusi, N., Pfau, M., Ables, J.L., Hodes, G.E., Ben-Dor, G.A., Deisseroth, K., Shapiro, M.L., Malenka, R.C., Ibanez-Tallon, I., Hu-Han, M., Russo, S.J., 2015. Excitatory transmission at thalamo-striatal synapses mediates susceptibility to social stress. *Nat. Neurosci.* 18, 962–964. <https://doi.org/10.1038/nn.4034>
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., Bredt, D.S., 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 274, 27467–27473. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27467>
- Chu Sin Chung, P., Keyworth, H.L., Martin-Garcia, E., Charbogne, P., Darcq, E., Bailey, A., Filliol, D., Matifas, A., Scherrer, G., Ouagazzal, A.-M., Gaveriaux-Ruff, C., Befort, K., Maldonado, R., Kitchen, I., Kieffer, B.L., 2015. A novel anxiogenic role for the delta opioid receptor expressed in GABAergic forebrain neurons. *Biol. Psychiatry* 77, 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.033>
- Chuhma, N., Mingote, S., Kalmbach, A., Yetnikoff, L., Rayport, S., 2017. Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 81, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.07.002>
- Cicero, T.J., Nock, B., Meyer, E.R., 2002. Gender-linked differences in the expression of physical dependence in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 691–697. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00740-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00740-2)
- Cichon, J., Wasilczuk, A.Z., Looger, L.L., Contreras, D., Kelz, M.B., Proekt, A., 2023. Ketamine triggers a switch in excitatory neuronal activity across neocortex. *Nat. Neurosci.* 26, 39–52. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01203-5>
- 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 A2A and Dopamine D2 Receptors. *Anal. Chem.* 76, 5354–5363. <https://doi.org/10.1021/ac049295f>
- Colla, M., Scheerer, H., Weidt, S., Seifritz, E., Kronenberg, G., 2021. Novel Insights Into the Neurobiology of the Antidepressant Response From Ketamine Research: A Mini Review. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 759466. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.759466>
- Compton, W.M., Jones, C.M., Baldwin, G.T., 2016. Relationship between Nonmedical Prescription-Opioid Use and Heroin Use. *N. Engl. J. Med.* 374, 154–163. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1508490>
- Contarino, A., Papaleo, F., 2005. The corticotropin-releasing factor receptor-1 pathway mediates the negative affective states of opiate withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18649–18654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506999102>
- Contesse, T., Broussot, L., Fofó, H., Vanhoutte, P., Fernandez, S.P., Barik, J., 2021. Dopamine and glutamate receptors control social stress-induced striatal ERK1/2 activation. *Neuropharmacology* 190, 108534. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108534>
- Cooper, S., Robison, A.J., Mazei-Robison, M.S., 2017. Reward Circuitry in Addiction. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 687–697. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Covington, H.E., Lobo, M.K., Maze, I., Vialou, V., Hyman, J.M., Zaman, S., LaPlant, Q., Mouzon, E., Ghose, S., Tamminga, C.A., Neve, R.L., Deisseroth, K., Nestler, E.J., 2010. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 16082–16090. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-10.2010>

- 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>
- Crummy, E.A., Donckels, E.A., Baskin, B.M., Bentzley, B.S., Ferguson, S.M., 2020. The impact of cocaine and heroin drug history on motivation and cue sensitivity in a rat model of polydrug abuse. *Psychopharmacology (Berl.)* 237, 55–68. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05349-2>
- 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>
- Cui, Y., Ostlund, S.B., James, A.S., Park, C.S., Ge, W., Roberts, K.W., Mittal, N., Murphy, N.P., Cepeda, C., Kieffer, B.L., Levine, M.S., Jentsch, J.D., Walwyn, W.M., Sun, Y.E., Evans, C.J., Maidment, N.T., Yang, X.W., 2014. Targeted expression of μ -opioid receptors in a subset of striatal direct-pathway neurons restores opiate reward. *Nat. Neurosci.* 17, 254–261. <https://doi.org/10.1038/nn.3622>
- 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. *EMBO J.* 8, 4025–4034. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08585.x>
- Darcq, E., Kieffer, B.L., 2018. Opioid receptors: drivers to addiction? *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 499–514. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0028-x>
- Day, J.J., Roitman, M.F., Wightman, R.M., Carelli, R.M., 2007. Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 10, 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- Day, J.J., Wheeler, R.A., Roitman, M.F., Carelli, R.M., 2006. Nucleus accumbens neurons encode Pavlovian approach behaviors: evidence from an autoshaping paradigm. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1341–1351. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04654.x>
- De Felice, M., Eyde, N., Dodick, D., Dussor, G.O., Ossipov, M.H., Fields, H.L., Porreca, F., 2013. Capturing the aversive state of cephalic pain preclinically. *Ann. Neurol.* 74, 257–265. <https://doi.org/10.1002/ana.23922>
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- DePaoli, A.M., Hurley, K.M., Yasada, K., Reisine, T., Bell, G., 1994. Distribution of κ Opioid Receptor mRNA in Adult Mouse Brain: An in Situ Hybridization Histochemistry Study. *Mol. Cell. Neurosci.* 5, 327–335. <https://doi.org/10.1006/mcne.1994.1039>
- 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>
- DiLuca, M., Olesen, J., 2014. The Cost of Brain Diseases: A Burden or a Challenge? *Neuron* 82, 1205–1208. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.044>
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 14610–14618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010>
- Dölen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K.W., Malenka, R.C., 2013. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* 501, 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12518>
- 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. *Biol. Psychiatry* 82, 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.014>

- Durieux, P.F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat. Neurosci.* 12, 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.2286>
- Elliot, E.E., Sibley, D.R., Katz, J.L., 2003. Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D5 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 161–168. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1494-y>
- Elliott, K., Minami, N., Kolesnikov, Y.A., Pasternak, G.W., Inturrisi, C.E., 1994. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 56, 69–75. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90151-1)
- Epstein, D.H., Preston, K.L., 2003. The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology (Berl.)* 168, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1470-6>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction., 2016. Rapport européen sur les drogues 2016: tendances et évolutions. Publications Office, LU.
- Everitt, B.J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J.W., Robbins, T.W., 2008. Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 3125–3135. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0089>
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2013. From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of their roles in drug addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev., Honoring Ann Kelley* 37, 1946–1954. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.010>
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- 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., 2013. A Gas DREADD mouse for selective modulation of cAMP production in striatopallidal neurons. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 854–862. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.251>
- Fasano, S., D'Antoni, A., Orban, P.C., Valjent, E., Putignano, E., Vara, H., Pizzorusso, T., Giustetto, M., Yoon, B., Soloway, P., Maldonado, R., Caboche, J., Brambilla, R., 2009. Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1) Controls Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling in the Striatum and Long-Term Behavioral Responses to Cocaine. *Biol. Psychiatry, Interplay of the Neural Circuitry of Reward and Impulsivity in Addiction* 66, 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.014>
- Fava, M., Kendler, K.S., 2000. Major Depressive Disorder. *Neuron* 28, 335–341. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00112-4)
- Feltenstein, M.W., Altar, C.A., See, R.E., 2007. Aripiprazole blocks reinstatement of cocaine seeking in an animal model of relapse. *Biol. Psychiatry* 61, 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.010>
- Ferguson, S.M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M.J., Phillips, P.E.M., Dong, Y., Roth, B.L., Neumaier, J.F., 2011. 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>
- Ferré, S., 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, 18.
- Fields, H.L., Margolis, E.B., 2015. Understanding opioid reward. *Trends Neurosci.* 38, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.01.002>
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2000. Mice deficient for

- delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25, 195–200. <https://doi.org/10.1038/76061>
- 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 Relat. Disord.* 14, S159–S164. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.022>
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., Missale, C., 2003. 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>
- Floresco, S.B., Todd, C.L., Grace, A.A., 2001. Glutamatergic Afferents from the Hippocampus to the Nucleus Accumbens Regulate Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* 21, 4915–4922. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04915.2001>
- 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. *J. Neurophysiol.* 88, 3010–3020. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Fox, M.E., Figueiredo, A., Menken, M.S., Lobo, M.K., 2020. Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. *Sci. Rep.* 10, 12393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69339-7>
- Fox, M.E., Lobo, M.K., 2019. The molecular and cellular mechanisms of depression: a focus on reward circuitry. *Mol. Psychiatry* 24, 1798–1815. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0415-3>
- Francis, T.C., Chandra, R., Friend, D.M., Finkel, E., Dayrit, G., Miranda, J., Brooks, J.M., Iñiguez, S.D., O'Donnell, P., Kravitz, A., Lobo, M.K., 2015. Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes Mediate Depression-Related Outcomes to Social Defeat Stress. *Biol. Psychiatry, The Development and Progression of Depression* 77, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.021>
- Francis, T.C., Chandra, R., Gaynor, A., Konkalmatt, P., Metzbower, S.R., Evans, B., Engeln, M., Blanpied, T.A., Lobo, M.K., 2017. Molecular basis of dendritic atrophy and activity in stress susceptibility. *Mol. Psychiatry* 22, 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.178>
- Francis, T.C., Lobo, M.K., 2017. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biol. Psychiatry* 81, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.09.007>
- Franco-García, A., Gómez-Murcia, V., Fernández-Gómez, F.J., González-Andreu, R., Hidalgo, J.M., Victoria Milanés, M., Núñez, C., 2023. Morphine-withdrawal aversive memories and their extinction modulate H4K5 acetylation and Brd4 activation in the rat hippocampus and basolateral amygdala. *Biomed. Pharmacother.* 165, 115055. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115055>
- Freeze, B.S., Kravitz, A.V., Hammack, N., Berke, J.D., Kreitzer, A.C., 2013. Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons. *J. Neurosci.* 33, 18531–18539. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013>
- Friedman, A.K., Walsh, J.J., Juarez, B., Ku, S.M., Chaudhury, D., Wang, J., Li, X., Dietz, D.M., Pan, N., Vialou, V.F., Neve, R.L., Yue, Z., Han, M.-H., 2014. Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science* 344, 313–319. <https://doi.org/10.1126/science.1249240>
- Frot, M., Magnin, M., Mauguière, F., Garcia-Larrea, L., 2013. Cortical representation of pain in primary sensory-motor areas (S1/M1)--a study using intracortical recordings in humans. *Hum. Brain Mapp.* 34, 2655–2668. <https://doi.org/10.1002/hbm.22097>
- Fukunaga, Y., Kishioka, S., 2000. Enkephalergic neurons in the periaqueductal gray and morphine withdrawal. *Jpn. J. Pharmacol.* 82, 175–180. <https://doi.org/10.1254/jjp.82.175>
- Fukunaga, Y., Nishida, S., Inoue, N., Kishioka, S., Yamamoto, H., 1996. Increase of preproenkephalin mRNA in the caudal part of periaqueductal gray by morphine withdrawal in rats: a quantitative in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42, 128–130. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(96\)00158-1](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(96)00158-1)

- Fuxe, K., Agnati, L.F., Borroto-Escuela, D.O., 2014. The impact of receptor-receptor interactions in heteroreceptor complexes on brain plasticity. *Expert Rev. Neurother.* 14, 719–721. <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.922878>
- Gan, Z., Gangadharan, V., Liu, S., Körber, C., Tan, L.L., Li, H., Oswald, M.J., Kang, J., Martin-Cortecero, J., Männich, D., Groh, A., Kuner, T., Wieland, S., Kuner, R., 2022. Layer-specific pain relief pathways originating from primary motor cortex. *Science* 378, 1336–1343. <https://doi.org/10.1126/science.add4391>
- Gangarossa, G., Espallergues, J., de Kerchove d’Exaerde, A., El Mestikawy, S., Gerfen, C.R., 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>
- Gardon, O., Faget, L., Chu Sin Chung, P., Matifas, A., Massotte, D., Kieffer, B.L., 2014. Expression of mu opioid receptor in dorsal diencephalic conduction system: new insights for the medial habenula. *Neuroscience* 277, 595–609. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.053>
- Gendron, L., Cahill, C.M., von Zastrow, M., Schiller, P.W., Pineyro, G., 2016. Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors. *Pharmacol. Rev.* 68, 631–700. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008979>
- Gerfen, C.R., Bolam, J.P., 2010. The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. *Handb. Basal Ganglia Struct. Funct.*
- 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. *Annu. Rev. Neurosci.* 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10814–10824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2660-08.2008>
- Gholami, A., Zarrindast, M.R., Sahraei, H., Haerri-Rohani, A., 2003. Nitric oxide within the ventral tegmental area is involved in mediating morphine reward. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 119–128. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02696-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02696-1)
- Gilam, G., Gross, J.J., Wager, T.D., Keefe, F.J., Mackey, S.C., 2020. What Is the Relationship between Pain and Emotion? Bridging Constructs and Communities. *Neuron* 107, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.024>
- Girault, J.-A., Greengard, P., 2004. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch. Neurol.* 61, 641–644. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.641>
- Girault, J.-A., Valjent, E., Caboche, J., Hervé, D., 2007. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr. Opin. Pharmacol., Neurosciences* 7, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.012>
- Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators, 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond. Engl.* 386, 743–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)
- Goeldner, C., Lutz, P.-E., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A.-M., Kieffer, B.L., 2011. Impaired Emotional-Like Behavior and Serotonergic Function During Protracted Abstinence from Chronic Morphine. *Biol. Psychiatry* 69, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.021>
- Golden, S.A., Christoffel, D.J., Heshmati, M., Hodes, G.E., Magida, J., Davis, K., Cahill, M.E., Dias, C., Ribeiro, E., Ables, J.L., Kennedy, P.J., Robison, A.J., Gonzalez-Maeso, J., Neve, R.L., Turecki, G., Ghose, S., Tammimga, C.A., Russo, S.J., 2013. Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. *Nat. Med.* 19, 337–344. <https://doi.org/10.1038/nm.3090>
- 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>

- Grace, A.A., Floresco, S.B., Goto, Y., Lodge, D.J., 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* 30, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.003>
- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M., 1994. The Basal Ganglia and Adaptive Motor Control. *Sci. New Ser.* 265, 1826–1831.
- Graziane, N.M., Sun, S., Wright, W.J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y.H., Nestler, E.J., Wang, Y.T., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2016. Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat. Neurosci.* 19, 915–925. <https://doi.org/10.1038/nn.4313>
- Greenberg, G.A., Rosenheck, R.A., 2014. Psychiatric correlates of past incarceration in the national comorbidity study replication. *Crim. Behav. Ment. Health CBMH* 24, 18–35. <https://doi.org/10.1002/cbm.1875>
- Greenfield, S.F., Manwani, S.G., Nargiso, J.E., 2003. Epidemiology of substance use disorders in women. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 30, 413–446. [https://doi.org/10.1016/s0889-8545\(03\)00072-x](https://doi.org/10.1016/s0889-8545(03)00072-x)
- Grillner, S., Robertson, B., 2016. The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Curr. Biol.* 26, R1088–R1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.041>
- 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. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 393, 131–138. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01694-3>
- Haber, S.N., 2003. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.10.003>
- Hamada, S., Nagase, M., Yoshizawa, T., Hagiwara, A., Isomura, Y., Watabe, A.M., Ohtsuka, T., 2021. An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping. *Commun. Biol.* 4, 461. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01977-7>
- Hamilton, P.J., Burek, D.J., Lombroso, S.I., Neve, R.L., Robison, A.J., Nestler, E.J., Heller, E.A., 2018. Cell-Type-Specific Epigenetic Editing at the *Fosb* Gene Controls Susceptibility to Social Defeat Stress. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 43, 272–284. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.88>
- Harris, G.C., Wimmer, M., Byrne, R., Aston-Jones, G., 2004. Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience* 129, 841–847. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.018>
- Hearing, M., Graziane, N., Dong, Y., Thomas, M.J., 2018. Opioid and Psychostimulant Plasticity: Targeting Overlap in Nucleus Accumbens Glutamate Signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 276–294. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.12.004>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10023–10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504657102>
- Heim, C., Nemeroff, C.B., 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry* 49, 1023–1039. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01157-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01157-x)
- Herman, B.H., Vocci, F., Bridge, P., 1995. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Medication development issues for opiate addiction. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 13, 269–293. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0893-133X(95)00140-9)
- Hervé, D., Le Moine, C., Corvol, J.C., Belluscio, L., Ledent, C., Fienberg, A.A., Jaber, M., Studler, J.M., Girault, J.A., 2001. Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 4390–4399. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04390.2001>
- Heshmati, M., Christoffel, D.J., LeClair, K., Cathomas, F., Golden, S.A., Aleyasin, H., Turecki, G., Friedman, A.K., Han, M.-H., Menard, C., Russo, S.J., 2020. Depression and Social Defeat Stress

- Are Associated with Inhibitory Synaptic Changes in the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 40, 6228–6233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2568-19.2020>
- 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>
- Hodos, W., 1961. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134, 943–944. <https://doi.org/10.1126/science.134.3483.943>
- Hoffmann, V.L.H., Vermeyen, K.M., Adriaensen, H.F., Meert, T.F., 2003. Effects of NMDA receptor antagonists on opioid-induced respiratory depression and acute antinociception in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 933–941. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(03\)00020-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(03)00020-0)
- Höflich, A., Michenthaler, P., Kasper, S., Lanzenberger, R., 2019. Circuit Mechanisms of Reward, Anhedonia, and Depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 105–118. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy081>
- Horvitz, J.C., 2002. Dopamine gating of glutamatergic sensorimotor and incentive motivational input signals to the striatum. *Behav. Brain Res.* 137, 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00285-1)
- Hu, H., Cui, Y., Yang, Y., 2020. Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 277–295. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0292-4>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11988–11992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11988>
- Hung, K.-L., Wang, S.-J., Wang, Y.-C., Chiang, T.-R., Wang, C.-C., 2014. Upregulation of presynaptic proteins and protein kinases associated with enhanced glutamate release from axonal terminals (synaptosomes) of the medial prefrontal cortex in rats with neuropathic pain. *Pain* 155, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.10.026>
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., 2001. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 695–703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Isaacs, D.P., Leman, R.P., Everett, T.J., Lopez-Beltran, H., Hamilton, L.R., Oleson, E.B., 2020. Buprenorphine is a weak dopamine releaser relative to heroin, but its pretreatment attenuates heroin-evoked dopamine release in rats. *Neuropsychopharmacol. Rep.* 40, 355–364. <https://doi.org/10.1002/npr2.12139>
- Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O.J., Barrot, M., Georges, F., 2011. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16446–16450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105418108>
- Jarcho, J.M., Mayer, E.A., Jiang, Z.K., Feier, N.A., London, E.D., 2012. Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction. *Pain* 153, 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.002>
- Jhou, T.C., Fields, H.L., Baxter, M.G., Saper, C.B., Holland, P.C., 2009. The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* 61, 786–800. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.001>
- Jiang, S.Z., Xu, W., Emery, A.C., Gerfen, C.R., Eiden, M.V., Eiden, L.E., 2017. NCS-Rapgef2, the Protein Product of the Neuronal Rapgef2 Gene, Is a Specific Activator of D1 Dopamine Receptor-

- Dependent ERK Phosphorylation in Mouse Brain. *eNeuro* 4, ENEURO.0248-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0248-17.2017>
- 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. *Neuropsychopharmacology* 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>
- Johnson, B., Ulberg, S., Shivale, S., Donaldson, J., Milczarski, B., Faraone, S.V., 2014. Fibromyalgia, autism, and opioid addiction as natural and induced disorders of the endogenous opioid hormonal system. *Discov. Med.* 18, 209–220.
- Johnson, S.W., North, R.A., 1992. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 483–488. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00483.1992>
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561–572. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Kalivas, P.W., 2004. Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2003.11.002>
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1995. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res.* 675, 325–328. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00013-g](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00013-g)
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1993. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 276–284. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00276.1993>
- Kalivas, P.W., Volkow, N.D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.8.1403>
- Kaplan, G.B., Leite-Morris, K.A., Sears, M.T., 1994. Alterations of adenosine A1 receptors in morphine dependence. *Brain Res.* 657, 347–350. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90990-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90990-3)
- 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>
- Kelleher, I., Harley, M., Lynch, F., Arseneault, L., Fitzpatrick, C., Cannon, M., 2008. Associations between childhood trauma, bullying and psychotic symptoms among a school-based adolescent sample. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 193, 378–382. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.049536>
- Kelly, T.M., Daley, D.C., 2013. Integrated Treatment of Substance Use and Psychiatric Disorders. *Soc. Work Public Health* 28, 388–406. <https://doi.org/10.1080/19371918.2013.774673>
- Kenny, P.J., 2007a. Brain reward systems and compulsive drug use. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.01.008>
- Kenny, P.J., 2007b. Brain reward systems and compulsive drug use. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.01.008>
- Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O., Merikangas, K.R., Walters, E.E., 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 617–627. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.617>
- Keyes, P.C., Adams, E.L., Chen, Z., Bi, L., Nachtrab, G., Wang, V.J., Tessier-Lavigne, M., Zhu, Y., Chen, X., 2020. Orchestrating Opiate-Associated Memories in Thalamic Circuits. *Neuron* 107, 1113–1123.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.028>
- 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., de la Calle, A., Goldman-Rakic, P.S., 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11609–11614. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608362113>
- Kieffer, B.L., Gavériaux-Ruff, C., 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* 66, 285–306. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00008-4)
- Kim, H.-D., Hesterman, J., Call, T., Magazu, S., Keeley, E., Armenta, K., Kronman, H., Neve, R.L., Nestler, E.J., Ferguson, D., 2016. SIRT1 Mediates Depression-Like Behaviors in the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 8441–8452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0212-16.2016>
- Kim, S.-I., 2013. Neuroscientific model of motivational process. *Front. Psychol.* 4, 98. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00098>
- Kimura, M., 1995. Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neurosci. Res.* 22, 353–358. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00914-F](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00914-F)
- Kimura, M., Rajkowski, J., Evarts, E., 1984. Tonicly discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4998–5001. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.15.4998>
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1993. Determinants of Ca²⁺ 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)
- Kolodny, A., Courtwright, D.T., Hwang, C.S., Kreiner, P., Eadie, J.L., Clark, T.W., Alexander, G.C., 2015. The prescription opioid and heroin crisis: a public health approach to an epidemic of addiction. *Annu. Rev. Public Health* 36, 559–574. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031914-122957>
- Konradi, C., Leveque, J.C., Hyman, S.E., 1996. Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 4231–4239. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-13-04231.1996>
- Koob, G.F., Buck, C.L., Cohen, A., Edwards, S., Park, P.E., Schlosburg, J.E., Schmeichel, B., Vendruscolo, L.F., Wade, C.L., Whitfield, T.W., George, O., 2014. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.024>
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2008. Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 29–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
- Koob, G.F., Le Moal, M., 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52–58. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.52>
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *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)
- Kosten, T.R., Petrakis, I.L., 2021. The Hidden Epidemic of Opioid Overdoses During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic. *JAMA Psychiatry* 78, 585–586. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.4148>
- 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 7921–7928. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007>
- 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. *Nat. Neurosci.* 15, 816–818. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Kreitzer, A.C., 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 127–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>

- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2008. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60, 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J., 2007. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* 131, 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894–902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>
- 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. *Nat. Neurosci.* 18, 1230–1232. <https://doi.org/10.1038/nn.4068>
- Kupchik, Y.M., Kalivas, P.W., 2017. The Direct and Indirect Pathways of the Nucleus Accumbens are not What You Think. *Neuropsychopharmacology* 42, 369–370. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.160>
- Kuribara, H., 1995. Dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 retards methamphetamine sensitization in both combined administration and early posttreatment schedules in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 759–763. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00173-t](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00173-t)
- 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 D1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18005–18010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310145110>
- Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., Malenka, R.C., 2011. Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70, 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>
- Lammel, S., Lim, B.K., Malenka, R.C., 2014. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.019>
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., Malenka, R.C., 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Langås, A.-M., Malt, U.F., Opjordsmoen, S., 2011. Comorbid mental disorders in substance users from a single catchment area—a clinical study. *BMC Psychiatry* 11, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-11-25>
- Law, P.-Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 389–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.389>
- Le Magnen, J., Marfaing-Jallat, P., Miceli, D., Devos, M., 1980. Pain modulating and reward systems: a single brain mechanism? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 729–733. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90157-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90157-4)
- Le Merrer, J., Befort, K., Gardon, O., Filliol, D., Darcq, E., Dembele, D., Becker, J.A.J., Kieffer, B.L., 2012. Protracted abstinence from distinct drugs of abuse shows regulation of a common gene network: Drug abstinence and genes. *Addict. Biol.* 17, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00365.x>
- Le Merrer, J., Plaza-Zabala, A., Del Boca, C., Matifas, A., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2011. Deletion of the δ Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement. *Biol. Psychiatry, Reduced Behavioral Flexibility in Addiction* 69, 700–703. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.10.021>
- Le Moine, C., Bloch, B., 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418–426. <https://doi.org/10.1002/cne.903550308>

- Le Moine, C., Tison, F., Bloch, B., 1990. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 117, 248–252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90671-u](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90671-u)
- Lecca, S., Meye, F.J., Mameli, M., 2014. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1170–1178. <https://doi.org/10.1111/ejn.12480>
- 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)
- Lemos, J.C., Friend, D.M., Kaplan, A.R., Shin, J.H., Rubinstein, M., Kravitz, A.V., Alvarez, V.A., 2016. Enhanced GABA Transmission Drives Bradykinesia Following Loss of Dopamine D2 Receptor Signaling. *Neuron* 90, 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.040>
- Lerma, J., 2006. Kainate receptor physiology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.08.004>
- 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>
- Levinstein, M.R., Carlton, M.L., Di Ianni, T., Ventriglia, E.N., Rizzo, A., Gomez, J.L., Budinich, R.C., Shaham, Y., Airan, R.D., Zarate, C.A., Bonaventura, J., Michaelides, M., 2022. Mu Opioid Receptor Activation Mediates (S)-ketamine Reinforcement in Rats: Implications for Abuse Liability. *Biol. Psychiatry* S0006322322018546. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.12.019>
- 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 Rep.* 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 beta is required for hyperdopamine and D2 receptor-mediated inhibition of synaptic NMDA receptor function in the rat prefrontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 15551–15563. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3336-09.2009>
- 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.
- Liljeholm, M., O'Doherty, J.P., 2012. Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends Cogn. Sci.* 16, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.07.007>
- Lim, B.K., Huang, K.W., Grueter, B.A., Rothwell, P.E., Malenka, R.C., 2012. Anhedonia requires MC4R-mediated synaptic adaptations in nucleus accumbens. *Nature* 487, 183–189. <https://doi.org/10.1038/nature11160>
- Lim, S.A.O., Kang, U.J., McGehee, D.S., 2014. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front. Synaptic Neurosci.* 6.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E., Fisone, G., 2003. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4305–4309. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730708100>
- Linseman, M.A., 1977. Naloxone-precipitated withdrawal as a function of the morphine-naloxone interval. *Psychopharmacology (Berl.)* 54, 159–164. <https://doi.org/10.1007/BF00426773>
- Lipton, D.M., Gonzales, B.J., Citri, A., 2019. Dorsal Striatal Circuits for Habits, Compulsions and Addictions. *Front. Syst. Neurosci.* 13, 28. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00028>
- Liu, B., Du, Y., Xu, C., Liu, Q., Zhang, L., 2023. Antidepressant effects of repeated s-ketamine administration as NMDAR Antagonist: Involvement of CaMKII α and mTOR signaling in the hippocampus of CUMS mice. *Brain Res.* 1811, 148375. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148375>

- Liu, X.-Y., Chu, X.-P., Mao, L.-M., Wang, M., Lan, H.-X., Li, M.-H., Zhang, G.-C., Parelkar, 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>
- Lobo, M.K., Covington, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D., 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, 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. *Front. Neuroanat.* 5, 41. <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., 2013. Δ FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 18381–18395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>
- Lopez, J., Bagot, R.C., 2021. Defining Valid Chronic Stress Models for Depression With Female Rodents. *Biol. Psychiatry* 90, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.03.010>
- Lu, L., Shepard, J.D., Hall, F.S., Shaham, Y., 2003. Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 457–491. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(03)00073-3)
- Lucantonio, F., Li, S., Lu, J., Roeglin, J., Bontempi, L., Shields, B.C., Zarate, C.A., Tadross, M.R., Pignatelli, M., 2023. Ketamine rescues anhedonia by cell-type and input specific adaptations in the Nucleus Accumbens. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2023.06.08.544088. <https://doi.org/10.1101/2023.06.08.544088>
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 13180–13190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2369-11.2011>
- Lüscher, C., Janak, P.H., 2021. Consolidating the Circuit Model for Addiction. *Annu. Rev. Neurosci.* 44, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-092920-123905>
- 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>
- Lüscher, C., Pascoli, V., 2012. Approche optogénétique de suppression de la plasticité synaptique induite par la cocaïne - Normalisation de la sensibilisation locomotrice. *médecine/sciences* 28, 353–355. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012284006>
- Lutz, P.-E., Ayranci, G., Chu-Sin-Chung, P., Matifas, A., Koebel, P., Filliol, D., Befort, K., Ouagazzal, A.-M., Kieffer, B.L., 2014. Distinct mu, delta, and kappa opioid receptor mechanisms underlie low sociability and depressive-like behaviors during heroin abstinence. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 2694–2705. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.126>
- Lutz, P.-E., Kieffer, B.L., 2013. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci.* 36, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.002>
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro.25.112701.142758>
- Mameli, M., Lüscher, C., 2011. Synaptic plasticity and addiction: Learning mechanisms gone awry. *Neuropharmacology, Synaptic Plasticity and Addiction* 61, 1052–1059. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.036>
- Mansouri-Guilani, N., Bernard, V., Vigneault, E., Vialou, V., Daumas, S., El Mestikawy, S., Gangarossa, G., 2019. VGLUT3 gates psychomotor effects induced by amphetamine. *J. Neurochem.* 148, 779–795. <https://doi.org/10.1111/jnc.14644>

- Mao, J., 1999. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res. Rev.* 30, 289–304. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00020-X)
- Mao, L.-M., Wang, W., Chu, X.-P., Zhang, G.-C., Liu, X.-Y., Yang, Y.-J., Haines, M., Papasian, C.J., Fibuch, E.E., Buch, S., Chen, J.-G., Wang, J.Q., 2009. Stability of surface NMDA receptors controls synaptic and behavioral adaptations to amphetamine. *Nat. Neurosci.* 12, 602–610. <https://doi.org/10.1038/nn.2300>
- Margolis, E.B., Lock, H., Chefer, V.I., Shippenberg, T.S., Hjelmstad, G.O., Fields, H.L., 2006. Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2938–2942. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511159103>
- Martikainen, I.K., Nuechterlein, E.B., Peciña, M., Love, T.M., Cummiford, C.M., Green, C.R., Stohler, C.S., Zubieta, J.-K., 2015. Chronic Back Pain Is Associated with Alterations in Dopamine Neurotransmission in the Ventral Striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 9957–9965. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4605-14.2015>
- Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2009. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459, 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature08028>
- Matthes, H.W.D., Maldonadot, R., Simonin, F., Valverdet, O., Slowet, S., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the f.l-Opioid-receptor gene 383, 5.
- 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)
- McDonald, S., Darke, S., Kaye, S., Torok, M., 2013. Deficits in social perception in opioid maintenance patients, abstinent opioid users and non-opioid users. *Addict. Abingdon Engl.* 108, 566–574. <https://doi.org/10.1111/add.12040>
- McEwen, B.S., Bowles, N.P., Gray, J.D., Hill, M.N., Hunter, R.G., Karatsoreos, I.N., Nasca, C., 2015. Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* 18, 1353–1363. <https://doi.org/10.1038/nn.4086>
- 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3531–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03531.2003>
- McGrath, J.J., Lim, C.C.W., Plana-Ripoll, O., Holtz, Y., Agerbo, E., Momen, N.C., Mortensen, P.B., Pedersen, C.B., Abdulmalik, J., Aguilar-Gaxiola, S., Al-Hamzawi, A., Alonso, J., Bromet, E.J., Bruffaerts, R., Bunting, B., de Almeida, J.M.C., de Girolamo, G., De Vries, Y.A., Florescu, S., Gureje, O., Haro, J.M., Harris, M.G., Hu, C., Karam, E.G., Kawakami, N., Kiejna, A., Kovess-Masfety, V., Lee, S., Mneimneh, Z., Navarro-Mateu, F., Orozco, R., Posada-Villa, J., Roest, A.M., Saha, S., Scott, K.M., Stagnaro, J.C., Stein, D.J., Torres, Y., Viana, M.C., Ziv, Y., Kessler, R.C., de Jonge, P., 2020. Comorbidity within mental disorders: a comprehensive analysis based on 145 990 survey respondents from 27 countries. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* 29, e153. <https://doi.org/10.1017/S2045796020000633>
- McKendrick, G., Garrett, H., Tanniru, S., Ballard, S., Sun, D., Silberman, Y., Grigson, P.S., Graziane, N.M., 2020. A novel method to study reward-context associations and drug-seeking behaviors. *J. Neurosci. Methods* 343, 108857. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108857>
- McKendrick, G., Graziane, N.M., 2020. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.* 14.
- Mercer Lindsay, N., Chen, C., Gilam, G., Mackey, S., Scherrer, G., 2021. Brain circuits for pain and its treatment. *Sci. Transl. Med.* 13, eabj7360. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7360>
- Meye, F.J., Trusel, M., Soiza-Reilly, M., Mameli, M., 2017. Neural circuit adaptations during drug withdrawal - Spotlight on the lateral habenula. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.08.007>

- 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>
- Milton, A.L., Lee, J.L.C., Butler, V.J., Gardner, R., Everitt, B.J., 2008. Intra-amygdala and systemic antagonism of NMDA receptors prevents the reconsolidation of drug-associated memory and impairs subsequently both novel and previously acquired drug-seeking behaviors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8230–8237. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1723-08.2008>
- 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. <https://doi.org/10.1097/00001756-199511270-00011>
- Miranda, J., Lamana, S.M.S., Dias, E.V., Athie, M., Parada, C.A., Tambeli, C.H., 2015. Effect of pain chronification and chronic pain on an endogenous pain modulation circuit in rats. *Neuroscience* 286, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.049>
- 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, 801–808. <https://doi.org/10.2174/156802606777057562>
- Mitsi, V., Zachariou, V., 2016. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. *Neuroscience, Nociception, Pain, and Analgesia* 338, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.017>
- Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., 2008. Roles of micro-opioid receptors in GABAergic synaptic transmission in the striosome and matrix compartments of the striatum. *Mol. Neurobiol.* 37, 104–115. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8023-2>
- Moles, A., Kieffer, B.L., D’Amato, F.R., 2004. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 304, 1983–1986. <https://doi.org/10.1126/science.1095943>
- Mondoloni, S., Mameli, M., Congiu, M., 2022. Reward and aversion encoding in the lateral habenula for innate and learned behaviours. *Transl. Psychiatry* 12, 3. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01774-0>
- 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>
- Morel, C., Montgomery, S.E., Li, L., Durand-de Cuttoli, R., Teichman, E.M., Juarez, B., Tzavaras, N., Ku, S.M., Flanigan, M.E., Cai, M., Walsh, J.J., Russo, S.J., Nestler, E.J., Calipari, E.S., Friedman, A.K., Han, M.-H., 2022. Midbrain projection to the basolateral amygdala encodes anxiety-like but not depression-like behaviors. *Nat. Commun.* 13, 1532. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29155-1>
- Moss, J., Bolam, J.P., 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 11221–11230. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2780-08.2008>
- Mucha, R.F., Kalant, H., Linseman, M.A., 1979. Quantitative relationships among measures of morphine tolerance and physical dependence in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10, 397–405. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(79\)90204-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(79)90204-1)
- Muscat, R., Papp, M., Willner, P., 1992. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology (Berl.)* 109, 433–438. <https://doi.org/10.1007/BF02247719>
- Nagai, Y., Takayama, K., Nishitani, N., Andoh, C., Koda, M., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Nagayasu, K., Yamanaka, A., Kaneko, S., 2020. The Role of Dorsal Raphe Serotonin Neurons in the Balance between Reward and Aversion. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2160. <https://doi.org/10.3390/ijms21062160>
- 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. *Biol. 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. *Neurosci. Res.* 43, 111–117. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00027-5)
- Nasseef, M.T., Devenyi, G.A., Mechling, A.E., Harsan, L.-A., Chakravarty, M.M., Kieffer, B.L., Darcq, E., 2018. Deformation-based Morphometry MRI Reveals Brain Structural Modifications in Living Mu Opioid Receptor Knockout Mice. *Front. Psychiatry* 9, 643. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00643>
- National Institute on Drug Abuse, 2018. Comorbidity: Substance Use and Other Mental Disorders [WWW Document]. *Natl. Inst. Drug Abuse*. URL <https://nida.nih.gov/research-topics/comorbidity/comorbidity-substance-use-other-mental-disorders-infographic> (accessed 9.27.23).
- Natsubori, A., Tsutsui-Kimura, I., Nishida, H., Bouchekioua, Y., Sekiya, H., Uchigashima, M., Watanabe, M., de Kerchove d’Exaerde, A., 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 2723–2733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017>
- Nelson, A.B., Bussert, T.G., Kreitzer, A.C., Seal, R.P., 2014. Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 8772–8777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0901-14.2014>
- Nelson, A.B., Kreitzer, A.C., 2014. Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 117–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013916>
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128. <https://doi.org/10.1038/35053570>
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00653-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00653-0)
- Nestler, E.J., Carlezon, W.A., 2006. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., Olney, J.W., 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2, 219–232. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2000.2.3/jnewcomer>
- Nguyen, C., Mondoloni, S., Le Borgne, T., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., Solié, C., Reynolds, L.M., Durand-de Cuttoli, R., Tolu, S., Valverde, S., Didiene, S., Hanneke, B., Fiancette, J.-F., Pons, S., Maskos, U., Deroche-Gamonet, V., Dalkara, D., Hardelin, J.-P., Mourot, A., Marti, F., Faure, P., 2021. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron* 109, 2604–2615.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>
- Nicola, S.M., 2007. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 521–550. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0510-4>
- Nicola, S.M., Surmeier, D.J., Malenka, R.C., 2000. Dopaminergic Modulation of Neuronal Excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 185–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.185>
- 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>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- O’Brien, C.P., McLellan, A.T., 1996. Myths about the treatment of addiction. *Lancet Lond. Engl.* 347, 237–240. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90409-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90409-2)
- 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. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 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>
- Oliva, I., Saberi, S.A., Rangel-Barajas, C., Iyer, V., Bunner, K.D., Lai, Y.Y., Kulkarni, P.M., Garai, S., Thakur, G.A., Crystal, J.D., Rebec, G.V., Hohmann, A.G., 2022. Inhibition of PSD95-nNOS protein–protein interactions decreases morphine reward and relapse vulnerability in rats. *Addict. Biol.* 27, e13220. <https://doi.org/10.1111/adb.13220>
- Oluigbo, C.O., Salma, A., Rezai, A.R., 2012. Targeting the affective and cognitive aspects of chronic neuropathic pain using basal forebrain neuromodulation: rationale, review and proposal. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 19, 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.04.002>
- Ortiz, D.M.D., Kim, M., Lee, H.J., Botanas, C.J., Custodio, R.J.P., Sayson, L.V., Campomayor, N.B., Lee, C., Lee, Y.S., Cheong, J.H., Kim, H.J., 2023. 4-F-PCP, a Novel PCP Analog Ameliorates the Depressive-Like Behavior of Chronic Social Defeat Stress Mice via NMDA Receptor Antagonism. *Biomol. Ther.* <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.159>
- Ortiz, V., Costa Campos, R., Fofó, H., Fernandez, S.P., Barik, J., 2022. Nicotinic receptors promote susceptibility to social stress in female mice linked with neuroadaptations within VTA dopamine neurons. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 47, 1587–1596. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01314-4>
- Oude Ophuis, R.J.A., Boender, A.J., van Rozen, A.J., Adan, R.A.H., 2014. Cannabinoid, melanocortin and opioid receptor expression on DRD1 and DRD2 subpopulations in rat striatum. *Front. Neuroanat.* 8, 14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00014>
- Ozdemir, D., Allain, F., Kieffer, B.L., Darcq, E., 2023. Advances in the characterization of negative affect caused by acute and protracted opioid withdrawal using animal models. *Neuropharmacology* 232, 109524. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109524>
- 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.* 293, 6161–6171. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001300>
- Pałucha-Poniewiera, A., Pilc, A., 2016. Glutamate-Based Drug Discovery for Novel Antidepressants. *Expert Opin. Drug Discov.* 11, 873–883. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1213234>
- Pantazis, C.B., Gonzalez, L.A., Tunstall, B.J., Carmack, S.A., Koob, G.F., Vendruscolo, L.F., 2021. Cues conditioned to withdrawal and negative reinforcement: Neglected but key motivational elements driving opioid addiction. *Sci. Adv.* 7, eabf0364. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf0364>
- 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>
- Paoletti, P., Neyton, J., 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol., Neurosciences* 7, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Papaleo, F., Contarino, A., 2006. Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. *Behav. Brain Res.* 170, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.02.009>
- Papaleo, F., Kieffer, B.L., Tabarin, A., Contarino, A., 2007. Decreased motivation to eat in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3398–3405. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05595.x>
- Papp, M., Gruca, P., Litwa, E., Lason, M., Willner, P., 2023. Optogenetic stimulation of transmission from prelimbic cortex to nucleus accumbens core overcomes resistance to venlafaxine in an animal model of treatment-resistant depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 123, 110715. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110715>
- Papp, M., Moryl, E., 1994. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* 263, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90516-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90516-9)

- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 39, 2041–2051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2822-18.2018>
- Parent, A., Côté, P.Y., Lavoie, B., 1995. Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog. Neurobiol.* 46, 131–197.
- Parise, E.M., Parise, L.F., Sial, O.K., Cardona-Acosta, A.M., Gyles, T.M., Juarez, B., Chaudhury, D., Han, M.-H., Nestler, E.J., Bolaños-Guzmán, C.A., 2021. The Resilient Phenotype Induced by Prophylactic Ketamine Exposure During Adolescence Is Mediated by the Ventral Tegmental Area–Nucleus Accumbens Pathway. *Biol. Psychiatry, BPS 90/7Pharmacologic Prevention and Treatment of Posttraumatic Stress Disorder* 90, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.05.002>
- Parnaudeau, S., Dongelmans, M.-L., Turiault, M., Ambroggi, F., Delbes, A.-S., Cansell, C., Luquet, S., Piazza, P.-V., Tronche, F., Barik, J., 2014. Glucocorticoid receptor gene inactivation in dopamine-innervated areas selectively decreases behavioral responses to amphetamine. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 35. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00035>
- Parsons, C.G., 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 71–78. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01307-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01307-3)
- 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. *Biol. Psychiatry* 69, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.031>
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 Activation by Addictive Drugs: A Signal Toward Pathological Adaptation. *Biol. Psychiatry, N-Methyl-D-Aspartate Receptors, Synaptic Plasticity, Psychopathology, and Treatment* 76, 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.005>
- Pascoli, V., Hiver, A., Van Zessen, R., 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., Hiver, A., Lüscher, C., 2015. Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. *Neuron* 88, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.017>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF02244569>
- Pavlov, I.P., 1927. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex, Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford Univ. Press, Oxford, England.
- Pei, L., Lee, F.J.S., Moczynska, A., Vukusic, B., Liu, F., 2004. Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1149–1158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3922-03.2004>
- Pessiglione, M., 2014. Comment le cerveau motive le comportement : du circuit de la récompense au système des valeurs. *Bull. Académie Natl. Médecine* 198, 1283–1296. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31224-5](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31224-5)
- 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., Vassoler, F.M., 2013. Deep brain stimulation for the treatment of addiction: basic and clinical studies and potential mechanisms of action. *Psychopharmacology (Berl.)* 229, 487–491. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3214-6>
- Pignatelli, M., Bonci, A., 2015. Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron* 86, 1145–1157. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>
- Pignatelli, M., Tejada, H.A., Barker, D.J., Bontempi, L., Wu, J., Lopez, A., Palma Ribeiro, S., Lucantonio, F., Parise, E.M., Torres-Berrio, A., Alvarez-Bagnarol, Y., Marino, R.A.M., Cai, Z.-L., Xue, M., Morales, M., Tammenga, C.A., Nestler, E.J., Bonci, A., 2021. Cooperative synaptic and intrinsic plasticity in a disynaptic limbic circuit drive stress-induced anhedonia and passive coping in mice. *Mol. Psychiatry* 26, 1860–1879. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0686-8>
- Plattner, F., Hayashi, K., Hernández, A., Benavides, D.R., Tassin, T.C., Tan, C., Day, J., Fina, M.W., Yuen, E.Y., Yan, Z., Goldberg, M.S., Nairn, A.C., Greengard, P., Nestler, E.J., Taussig, R., Nishi, A., Houslay, M.D., Bibb, J.A., 2015. The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors. *Nat. Neurosci.* 18, 1094–1100. <https://doi.org/10.1038/nn.4066>
- Polis, A.J., Fitzgerald, P.J., Hale, P.J., Watson, B.O., 2019. Rodent ketamine depression-related research: Finding patterns in a literature of variability. *Behav. Brain Res.* 376, 112153. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112153>
- Pollock, J., Kornetsky, C., 1989. Evidence for the role of dopamine D1 receptors in morphine induced stereotypic behavior. *Neurosci. Lett.* 102, 291–296. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90094-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90094-3)
- Pomrenze, M.B., Cardozo Pinto, D.F., Neumann, P.A., Llorach, P., Tucciarone, J.M., Morishita, W., Eshel, N., Heifets, B.D., Malenka, R.C., 2022. Modulation of 5-HT release by dynorphin mediates social deficits during opioid withdrawal. *Neuron* S0896627322008637. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.09.024>
- Potenza, M.N., 2013. Biological Contributions to Addictions in Adolescents and Adults: Prevention, Treatment, and Policy Implications. *J. Adolesc. Health, Emerging Issues in Adolescent Health* 52, S22–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2012.05.007>
- Pradhan, A.A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2011. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.008>
- Prasad, A.A., McNally, G.P., 2020. The ventral pallidum and relapse in alcohol seeking. *Br. J. Pharmacol.* 177, 3855–3864. <https://doi.org/10.1111/bph.15160>
- Pulido, R., 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. *EMBO J.* 17, 7337–7350. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7337>
- Pulvirenti, L., Maldonado-Lopez, R., Koob, G.F., 1992. NMDA receptors in the nucleus accumbens modulate intravenous cocaine but not heroin self-administration in the rat. *Brain Res.* 594, 327–330. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91145-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91145-5)
- Pulvirenti, L., Swerdlow, N.R., Koob, G.F., 1991. Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroin or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 841–845. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90095-j](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90095-j)
- Qiao, H., Li, M.-X., Xu, C., Chen, H.-B., An, S.-C., Ma, X.-M., 2016. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast.* 2016, 8056370. <https://doi.org/10.1155/2016/8056370>
- Qu, Y., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Dong, C., Hashimoto, K., 2018. Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. *Acta Neuropsychiatr.* 30, 117–122. <https://doi.org/10.1017/neu.2017.16>
- Quello, S.B., Brady, K.T., Sonne, S.C., 2005. Mood disorders and substance use disorder: a complex comorbidity. *Sci. Pract. Perspect.* 3, 13–21. <https://doi.org/10.1151/spp053113>
- Ramirez, F., Moscarello, J.M., LeDoux, J.E., Sears, R.M., 2015. Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3470–3477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1331-14.2015>

- 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. *Synap. N. Y. N* 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)
- Reiner, A., Levitz, J., 2018. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98, 1080–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
- Reiner, A., Medina, L., Veenman, C.L., 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res. Rev.* 28, 235–285. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00016-2)
- Ren, W., Centeno, M.V., Berger, S., Wu, Y., Na, X., Liu, X., Kondapalli, J., Apkarian, A.V., Martina, M., Surmeier, D.J., 2016. The indirect pathway of the nucleus accumbens shell amplifies neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 19, 220–222. <https://doi.org/10.1038/nn.4199>
- Resendez, S.L., Keyes, P.C., Day, J.J., Hambro, C., Austin, C.J., Maina, F.K., Eidson, L.N., Porter-Stransky, K.A., Nevárez, N., McLean, J.W., Kuhnmuensch, M.A., Murphy, A.Z., Mathews, T.A., Aragona, B.J., 2016. Dopamine and opioid systems interact within the nucleus accumbens to maintain monogamous pair bonds. *eLife* 5, e15325. <https://doi.org/10.7554/eLife.15325>
- Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., 2005. NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res. Bull.* 64, 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.10.005>
- Richardson, N.R., Roberts, D.C., 1996. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Methods* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00153-0)
- 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>
- 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>
- Robles, C.F., McMackin, M.Z., Campi, K.L., Doig, I.E., Takahashi, E.Y., Pride, M.C., Trainor, B.C., 2014. Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females. *Behav. Brain Res.* 262, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.003>
- 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>
- Roeper, J., 2013. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 36, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.003>
- Rosoff, D.B., Smith, G.D., Lohoff, F.W., 2021. Prescription Opioid Use and Risk for Major Depressive Disorder and Anxiety and Stress-Related Disorders: A Multivariable Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Psychiatry* 78, 151–160. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.3554>
- Ross, S., Peselow, E., 2012. Co-Occurring Psychotic and Addictive Disorders: Neurobiology and Diagnosis. *Clin. Neuropharmacol.* 35, 235–243. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e318261e193>
- Rost, B.R., Wietek, J., Yizhar, O., Schmitz, D., 2022. Optogenetics at the presynapse. *Nat. Neurosci.* 25, 984–998. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01113-6>
- Ruiz, F., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Maldonado, R., 1996. Similar decrease in spontaneous morphine abstinence by methadone and RB 101, an inhibitor of enkephalin catabolism. *Br. J. Pharmacol.* 119, 174–182. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15691.x>
- Russo, S.J., Murrrough, J.W., Han, M.-H., Charney, D.S., Nestler, E.J., 2012. Neurobiology of resilience. *Nat. Neurosci.* 15, 1475–1484. <https://doi.org/10.1038/nn.3234>
- Russo, S.J., Nestler, E.J., 2013. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders 34.

- Saadé, N.E., Atweh, S.F., Bahuth, N.B., Jabbur, S.J., 1997. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res.* 751, 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01164-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01164-x)
- Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2020. From Signaling Molecules to Circuits and Behaviors: Cell-Type-Specific Adaptations to Psychostimulant Exposure in the Striatum. *Biol. Psychiatry* 87, 944–953. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.001>
- Schenk, S., Valadez, A., McNamara, C., House, D.T., Higley, D., Bankson, M.G., Gibbs, S., Horger, B.A., 1993. Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 111, 332–338. <https://doi.org/10.1007/BF02244949>
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 8549–8558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5179-05.2006>
- Schultz, W., 2010. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav. Brain Funct.* 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-24>
- Schultz, W., 2007. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.*, Fifty years of dopamine research 30, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.007>
- 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., 2000. Multiple reward signals in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 199–207. <https://doi.org/10.1038/35044563>
- Schultz, W., 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J. Neurophysiol.* 80, 1–27. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.1>
- Schultz, W., Dayan, P., Montague, P.R., 1997. A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science* 275, 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C., Ehlers, M.D., 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 3063–3072. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-09-03063.2001>
- 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, 762–767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505557103>
- Self, D.W., 2010. Dopamine Receptor Subtypes in Reward and Relapse, in: Neve, K.A. (Ed.), *The Dopamine Receptors, The Receptors*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 479–524. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6_17
- Selley, D.E., Lazenka, M.F., Sim-Selley, L.J., Secor McVoy, J.R., Potter, D.N., Chartoff, E.H., Carlezon, W.A., Negus, S.S., 2020. Attenuated dopamine receptor signaling in nucleus accumbens core in a rat model of chemically-induced neuropathy. *Neuropharmacology* 166, 107935. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107935>
- Sesack, S.R., Grace, A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27–47. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.93>
- Severino, A.L., Mittal, N., Hakimian, J.K., Velarde, N., Minasyan, A., Albert, R., Torres, C., Romaneschi, N., Johnston, C., Tiwari, S., Lee, A.S., Taylor, A.M., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., Evans, C.J., Cahill, C.M., Walwyn, W.M., 2020. μ -Opioid Receptors on Distinct Neuronal Populations Mediate Different Aspects of Opioid Reward-Related Behaviors. *eNeuro* 7, ENEURO.0146-20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0146-20.2020>
- Shadrina, M., Bondarenko, E.A., Slominsky, P.A., 2018. Genetics Factors in Major Depression Disease. *Front. Psychiatry* 9, 334. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00334>

- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., de Wit, H., Stewart, J., 2003. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl.)* 168, 3–20. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1224-x>
- She, K., Ferreira, J.S., Carvalho, A.L., Craig, A.M., 2012. Glutamate binding to the GluN2B subunit controls surface trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 27432–27445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345108>
- Shen, C.-J., Zheng, D., Li, K.-X., Yang, J.-M., Pan, H.-Q., Yu, X.-D., Fu, J.-Y., Zhu, Y., Sun, Q.-X., Tang, M.-Y., Zhang, Y., Sun, P., Xie, Y., Duan, S., Hu, H., Li, X.-M., 2019. Cannabinoid CB1 receptors in the amygdalar cholecystokinin glutamatergic afferents to nucleus accumbens modulate depressive-like behavior. *Nat. Med.* 25, 337–349. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0299-9>
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous Dopaminergic Control of Striatal Synaptic Plasticity. *Science* 321, 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1160575>
- 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)
- Sian, J., Youdim, M.B.H., Riederer, P., Gerlach, M., 1999. Biochemical Anatomy of the Basal Ganglia and Associated Neural Systems, in: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th Edition. Lippincott-Raven.
- Sinha, R., 2009. Modeling stress and drug craving in the laboratory: implications for addiction treatment development. *Addict. Biol.* 14, 84–98. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00134.x>
- Smaga, I., Wydra, K., Piechota, M., Caffino, L., Fumagalli, F., Sanak, M., Filip, M., 2021. Cocaine abstinence modulates NMDA receptor subunit expression: An analysis of the GluN2B subunit in cocaine-seeking behavior. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 109, 110248. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110248>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5720>
- Smith, A.D., Bolam, J.P., 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* 13, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90106-k](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90106-k)
- Smith, M.L., Hostetler, C.M., Heinricher, M.M., Ryabinin, A.E., 2016. Social transfer of pain in mice. *Sci. Adv.* 14.
- 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., 2020. Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol. Psychiatry* 25, 3241–3255. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0484-3>
- Song, S.S., Kang, B.J., Wen, L., Lee, H.J., Sim, H.-R., 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, 336. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00336>
- Sophie, M., Ford, B., 2012. Management of pain in Parkinson’s disease. *CNS Drugs* 26, 937–948. <https://doi.org/10.1007/s40263-012-0005-2>
- Spahn, V., Stein, C., 2017. Targeting delta opioid receptors for pain treatment: drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 155–160. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1275562>
- Spanagel, R., 2017. Animal models of addiction. *Dialogues Clin. Neurosci.* 19, 247–258.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2046–2050. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2046>

- Speranza, L., di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A., Volpicelli, F., 2021. Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. *Cells* 10, 735. <https://doi.org/10.3390/cells10040735>
- Stefano, G.B., Goumon, Y., Casares, F., Cadet, P., Fricchione, G.L., Rialas, C., Peter, D., Sonetti, D., Guarna, M., Welters, I.D., Bianchi, E., 2000. Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* 23, 436–442. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01611-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01611-8)
- Stein, C., 2016. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Med.* 67, 433–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093100>
- Steketee, J.D., Kalivas, P.W., 2011. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol. Rev.* 63, 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Stephenson-Jones, M., Ericsson, J., Robertson, B., Grillner, S., 2012. Evolution of the basal ganglia: Dual-output pathways conserved throughout vertebrate phylogeny. *J. Comp. Neurol.* 520, 2957–2973. <https://doi.org/10.1002/cne.23087>
- Strang, J., Volkow, N.D., Degenhardt, L., Hickman, M., Johnson, K., Koob, G.F., Marshall, B.D.L., Tyndall, M., Walsh, S.L., 2020. Opioid use disorder. *Nat. Rev. Dis. Primer* 6, 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0137-5>
- 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. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 853–863. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300619>
- Tan, K.R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J.J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K.M., Lüscher, C., 2012. GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron* 73, 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
- Tanimoto, H., Heisenberg, M., Gerber, B., 2004. Event timing turns punishment to reward. *Nature* 430, 983–983. <https://doi.org/10.1038/430983a>
- Tao, R., Auerbach, S.B., 2005. μ -Opioids disinhibit and κ -opioids inhibit serotonin efflux in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 1049, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.076>
- Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J., 2008. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5504–5512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>
- Tecuapetla, F., Koós, T., Tepper, J.M., Kabbani, N., Yeckel, M.F., 2009. Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8977–8990. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6145-08.2009>
- 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, 4315. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Tejeda, H.A., Wu, J., Kornspun, A.R., Pignatelli, M., Kashtelyan, V., Krashes, M.J., Lowell, B.B., Carlezon, W.A., Bonci, A., 2017. Pathway- and Cell-Specific κ -Opioid Receptor Modulation of Excitation-Inhibition Balance Differentially Gates D1 and D2 Accumbens Neuron Activity. *Neuron* 93, 147–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.005>
- 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.
- Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koós, T., Ibáñez-Sandoval, O., 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front. Neuroanat.* 4, 150. <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. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 1779–1789. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.345>
- Thériault, R.-K., Manduca, J.D., Perreault, M.L., 2021. Sex differences in innate and adaptive neural oscillatory patterns link resilience and susceptibility to chronic stress in rats. *J. Psychiatry Neurosci.* 46, E258–E270. <https://doi.org/10.1503/jpn.200117>

- Thompson, B.L., Oscar-Berman, M., Kaplan, G.B., 2021. Opioid-induced structural and functional plasticity of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 120, 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.015>
- Thomsen, M., Caine, S.B., 2011. False positive in the intravenous drug self-administration test in C57BL/6J mice. *Behav. Pharmacol.* 22, 239–247. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328345f8f2>
- Thorndike, E.L., 1933. A PROOF OF THE LAW OF EFFECT. *Science* 77, 173–175. <https://doi.org/10.1126/science.77.1989.173-a>
- Thorndike, E.L., 1911. *Animal intelligence: Experimental studies*, Animal intelligence: Experimental studies. Macmillan Press, Lewiston, NY, US. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.55072>
- Tidey, J.W., Miczek, K.A., 1996. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 721, 140–149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00159-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00159-x)
- 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>
- Tomazi, L., Mello, C.F., Schöffler, A.P., Girardi, B.A., Frühauf, P.K.S., Rubin, M.A., 2017. A Nonrewarding NMDA Receptor Antagonist Impairs the Acquisition, Consolidation, and Expression of Morphine Conditioned Place Preference in Mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 710–721. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9678-0>
- Torrisi, S.A., Rizzo, S., Laudani, S., Ieraci, A., Drago, F., Leggio, G.M., 2023. Acute stress alters recognition memory and AMPA/NMDA receptor subunits in a sex-dependent manner. *Neurobiol. Stress* 25, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100545>
- Tovar-Díaz, J., Pomrenze, M.B., Kan, R., Pahlavan, B., Morikawa, H., 2018. Cooperative CRF and α 1 Adrenergic Signaling in the VTA Promotes NMDA Plasticity and Drives Social Stress Enhancement of Cocaine Conditioning. *Cell Rep.* 22, 2756–2766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.039>
- 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>
- Trezza, V., Damsteegt, R., Achterberg, E.J.M., Vanderschuren, L.J.M.J., 2011. Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 6362–6370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-10.2011>
- 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, 64–74. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.09.003>
- Trifilieff, P., Lavour, J., Pascoli, V., Kappès, V., Brami-Cherrier, K., Pagès, C., Micheau, J., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2009. Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.04.006>
- Trifilieff, P., Rives, M.-L., Urizar, E., Piskorowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, 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, 111–118. <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>
- Tritsch, N.X., Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76, 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., Schütz, G., 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103. <https://doi.org/10.1038/12703>

- Trujillo, K.A., 2002. The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox. Res.* 4, 373–391. <https://doi.org/10.1080/10298420290023954>
- Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G.D., Bonci, A., de Lecea, L., Deisseroth, K., 2009. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324, 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>
- Tye, K.M., Mirzabekov, J.J., Warden, M.R., Ferenczi, E.A., Tsai, H.-C., Finkelstein, J., Kim, S.-Y., Adhikari, A., Thompson, K.R., Andalman, A.S., Gunaydin, L.A., Witten, I.B., Deisseroth, K., 2013. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493, 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature11740>
- Tyree, S.M., de Lecea, L., 2017. Lateral Hypothalamic Control of the Ventral Tegmental Area: Reward Evaluation and the Driving of Motivated Behavior. *Front. Syst. Neurosci.* 11.
- Tzschentke, T.M., 2007. REVIEW ON CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- Ungless, M.A., Argilli, E., Bonci, A., 2010. Effects of stress and aversion on dopamine neurons: Implications for addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev., Novel Perspectives on Drug Addiction and Reward* 35, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.006>
- Ungless, M.A., Magill, P.J., Bolam, J.P., 2004. Uniform Inhibition of Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area by Aversive Stimuli. *Science* 303, 2040–2042. <https://doi.org/10.1126/science.1093360>
- 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>
- Valentinova, K., Tchenio, A., Trusel, M., Clerke, J.A., Lalive, A.L., Tzanoulinou, S., Matera, A., Moutkine, I., Maroteaux, L., Paolicelli, R.C., Volterra, A., Bellone, C., Mameli, M., 2019. Morphine withdrawal recruits lateral habenula cytokine signaling to reduce synaptic excitation and sociability. *Nat. Neurosci.* 22, 1053–1056. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0421-4>
- Valjent, E., Corbillé, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., 2006. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2932–2937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511030103>
- Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R., Caboche, J., 2000. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8701–8709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08701.2000>
- 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, 491–496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408305102>
- van Zessen, R., Phillips, J.L., Budygin, E.A., Stuber, G.D., 2012. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron* 73, 1184–1194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.016>
- Vanderschuren, L.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 (Berl.)* 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. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 366–371. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00073-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00073-4)
- Veeneman, M.M.J., Damsteegt, R., Vanderschuren, L.J.M.J., 2015. The nucleus accumbens shell and the dorsolateral striatum mediate the reinforcing effects of cocaine through a serial connection. *Behav. Pharmacol.* 26, 193–199. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000099>

- Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., Nestler, E.J., 2013. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 59–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134540>
- Vicente, A.M., Galvão-Ferreira, P., Tecuapetla, F., Costa, R.M., 2016. Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Curr. Biol.* CB 26, R267-269. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.036>
- Volkow, N.D., 2020. Collision of the COVID-19 and Addiction Epidemics. *Ann. Intern. Med.* 173, 61–62. <https://doi.org/10.7326/M20-1212>
- Volkow, N.D., 2004. The reality of comorbidity: depression and drug abuse. *Biol. Psychiatry* 56, 714–717. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.07.007>
- Volkow, N.D., Blanco, C., 2023. Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry* 22, 203–229. <https://doi.org/10.1002/wps.21073>
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Baler, R., Telang, F., 2009. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- Volkow, N.D., McLellan, A.T., 2016. Opioid Abuse in Chronic Pain — Misconceptions and Mitigation Strategies. *N. Engl. J. Med.* 374, 1253–1263. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1507771>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Tomasi, D., Telang, F., Baler, R., 2010. Addiction: decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 32, 748–755. <https://doi.org/10.1002/bies.201000042>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Tomasi, D., Baler, R.D., 2013. Unbalanced neuronal circuits in addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.002>
- Voon, P., Karamouziyan, M., Kerr, T., 2017. Chronic pain and opioid misuse: a review of reviews. *Subst. Abuse Treat. Prev. Policy* 12, 36. <https://doi.org/10.1186/s13011-017-0120-7>
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953–990. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Walsh, J.J., Christoffel, D.J., Malenka, R.C., 2023. Neural circuits regulating prosocial behaviors. *Neuropsychopharmacology* 48, 79–89. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01348-8>
- Walter, S., Kuschinsky, K., 1989. Conditioning of morphine-induced locomotor activity and stereotyped behaviour in rats. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 78, 231–247. <https://doi.org/10.1007/BF01249232>
- Wang, M., Wong, A.H., Liu, F., 2012. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Res., Brain Integration - from Molecular to Network Level* 1476, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.029>
- Wang, S., 2019. Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors. *Cell Transplant.* 28, 233–238. <https://doi.org/10.1177/0963689718811060>
- Wasli, N.S., Ridzwan, I.E., Azzubaidi, M.S., Kasmuri, A.R., Ahmed, Q.U., Ming, L.C., Mohamed, N., Syd Mohamad Faudzi, S.M.S., 2020. Striatum Hyperactivity Triggers Relapse to Morphine and Methamphetamine (Polydrug) Dependence in Mice. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 12, S826–S830. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_379_19
- Wee, S., Koob, G.F., 2010. The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 121–135. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1825-8>
- 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>
- Welsch, L., Bailly, J., Darcq, E., Kieffer, B.L., 2020. The Negative Affect of Protracted Opioid Abstinence: Progress and Perspectives From Rodent Models. *Biol. Psychiatry* 87, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.07.027>

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6840–6845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610790104>
- Willmore, L., Cameron, C., Yang, J., Witten, I.B., Falkner, A.L., 2022. Behavioural and dopaminergic signatures of resilience. *Nature* 611, 124–132. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05328-2>
- Wise, R.A., 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>
- Wise, R.A., Koob, G.F., 2014. The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Wisłowska-Stanek, A., Lehner, M., Tomczuk, F., Gawryluk, A., Kołosowska, K., Sułek, A., Krząśnik, P., Sobolewska, A., Wawer, A., Płaźnik, A., Skórzewska, A., 2023. The effects of the recurrent social isolation stress on fear extinction and dopamine D2 receptors in the amygdala and the hippocampus. *Pharmacol. Rep. PR* 75, 119–127. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00430-8>
- Witten, I.B., Steinberg, E.E., Lee, S.Y., Davidson, T.J., Zalocusky, K.A., Brodsky, M., Yizhar, O., Cho, S.L., Gong, S., Ramakrishnan, C., Stuber, G.D., Tye, K.M., Janak, P.H., Deisseroth, K., 2011. Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 72, 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.028>
- 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. Ther.* 313, 594–603. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.080200>
- Wolf, M.E., 2010. Regulation of AMPA receptor trafficking in the nucleus accumbens by dopamine and cocaine. *Neurotox. Res.* 18, 393–409. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9176-0>
- Woods, A.S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., 2005. 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.
- Wouda, J.A., Diergaarde, L., Riga, D., van Mourik, Y., Schoffelmeer, A.N.M., De Vries, T.J., 2010. Disruption of Long-Term Alcohol-Related Memory Reconsolidation: Role of β -Adrenoceptors and NMDA Receptors. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 179. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00179>
- Wu, X.-B., Jing, P.-B., Zhang, Z.-J., Cao, D.-L., Gao, M.-H., Jiang, B.-C., Gao, Y.-J., 2018. Chemokine receptor CCR2 contributes to neuropathic pain and the associated depression via increasing NR2B-mediated currents in both D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 43, 2320–2330. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0115-8>
- Xia, Y., Driscoll, J.R., Wilbrecht, L., Margolis, E.B., Fields, H.L., Hjelmstad, G.O., 2011. Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons Target Non-Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 31, 7811–7816. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-11.2011>
- 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 Res.* 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)
- Yang, H., de Jong, J.W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H.S., Lammel, S., 2018. Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* 97, 434–449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>

- Yates, J.W., Meij, J.T.A., Sullivan, J.R., Richtand, N.M., Yu, L., 2007. Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice. *Neurosci. Lett.* 427, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.011>
- Yehuda, R., 2004. Risk and resilience in posttraumatic stress disorder. *J. Clin. Psychiatry* 65 Suppl 1, 29–36.
- Yelnik, J., 2008. Modeling the organization of the basal ganglia. *Rev. Neurol. (Paris)* 164, 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2008.04.019>
- Yelnik, J., 2002. Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 17 Suppl 3, S15–21. <https://doi.org/10.1002/mds.10138>
- Yelnik, J., François, C., Percheron, G., Tandé, D., 1991. Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. *J. Comp. Neurol.* 313, 273–294. <https://doi.org/10.1002/cne.903130207>
- Zanos, P., Georgiou, P., Gonzalez, L.R., Hourani, S., Chen, Y., Kitchen, I., Kieffer, B.L., Winsky-Sommerer, R., Bailey, A., 2016a. Emotional Impairment and Persistent Upregulation of mGlu₅ Receptor following Morphine Abstinence: Implications of an mGlu₅-MOPr Interaction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, pyw011. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw011>
- Zanos, P., Georgiou, P., Wright, S.R., Hourani, S.M., Kitchen, I., Winsky-Sommerer, R., Bailey, A., 2014. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 855–865. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.285>
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G.I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H.J., Singh, N.S., Dossou, K.S.S., Fang, Y., Huang, X.-P., Mayo, C.L., Wainer, I.W., Albuquerque, E.X., Thompson, S.M., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Gould, T.D., 2016b. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 533, 481–486. <https://doi.org/10.1038/nature17998>
- 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. *J. Neurosci.* 29, 2948–2960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4424-08.2009>
- 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>
- Zhou, F.-M., Wilson, C.J., Dani, J.A., 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53, 590–605. <https://doi.org/10.1002/neu.10150>
- Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Pan, H.-L., 2011. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 4, 379–388. <https://doi.org/10.1586/ecp.11.17>
- Zhou, K., Xu, H., Lu, S., Jiang, S., Hou, G., Deng, X., He, M., Zhu, Y., 2022. Reward and aversion processing by input-defined parallel nucleus accumbens circuits in mice. *Nat. Commun.* 13, 6244. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33843-3>
- Zhou, L., Zhu, D.-Y., 2009. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001>
- Zhu, Y., Wienecke, C.F.R., Nachtrab, G., Chen, X., 2016. A thalamic input to the nucleus accumbens mediates opiate dependence. *Nature* 530, 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature16954>
- Zweifel, L.S., Fadok, J.P., Argilli, E., Garelick, M.G., Jones, G.L., Dickerson, T.M.K., Allen, J.M., Mizumori, S.J.Y., Bonci, A., Palmiter, R.D., 2011. Activation of Dopamine Neurons is Critical for Aversive Conditioning and Prevention of Generalized Anxiety. *Nat. Neurosci.* 14, 620–626. <https://doi.org/10.1038/nn.2808>

Annexes

Annexe I : [Andrianarivelo et al., \(2021\) *Sciences Advances*](#)

« Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing »

Annexe II : [Forget et al., \(2022\) *Molecular Psychiatry*](#)

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

Annexe III : [Lissek et al., \(2021\) *EMBO reports*](#)

« Npas4 regulates medium spiny neuron physiology and gates cocaine-induced hyperlocomotion »

Annexe IV : [Allichon et al., \(2021\) *Frontiers in Synaptic Neuroscience*](#)

« Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse »

NEUROSCIENCE

Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing

Andry Andrianarivelo^{1,2,3}, Estefani Saint-Jour^{1,2,3}, Paula Pousinha^{4,5}, Sebastian P. Fernandez^{4,5}, Anna Petitbon⁶, Veronique De Smedt-Peyrusse⁶, Nicolas Heck^{1,2,3}, Vanesa Ortiz^{4,5}, Marie-Charlotte Allichon^{1,2,3}, Vincent Kappès^{1,2,3}, Sandrine Betuing^{1,2,3}, Roman Walle⁶, Ying Zhu^{7,8}, Charlene Joséphine⁹, Alexis-Pierre Bemelmans⁹, Gustavo Turecki¹⁰, Naguib Mechawar¹⁰, Jonathan A. Javitch^{7,8,11}, Jocelyne Caboche^{1,2,3}, Pierre Trifilieff⁶, Jacques Barik^{4,5}, Peter Vanhoutte^{1,2,3*}

Addictive drugs increase dopamine in the nucleus accumbens (NAc), where it persistently shapes excitatory glutamate transmission and hijacks natural reward processing. Here, we provide evidence, from mice to humans, that an underlying mechanism relies on drug-evoked heteromerization of glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) with dopamine receptor 1 (D1R) or 2 (D2R). Using temporally controlled inhibition of D1R-NMDAR heteromerization, we unraveled their selective implication in early phases of cocaine-mediated synaptic, morphological, and behavioral responses. In contrast, preventing D2R-NMDAR heteromerization blocked the persistence of these adaptations. Interfering with these heteromers spared natural reward processing. Notably, we established that D2R-NMDAR complexes exist in human samples and showed that, despite a decreased D2R protein expression in the NAc, individuals with psychostimulant use disorder display a higher proportion of D2R forming heteromers with NMDAR. These findings contribute to a better understanding of molecular mechanisms underlying addiction and uncover D2R-NMDAR heteromers as targets with potential therapeutic value.

INTRODUCTION

Drug addiction is characterized by compulsive patterns of drug-seeking and drug-taking behavior despite detrimental consequences and a high rate of relapse after abstinence. A hallmark of addictive drugs is their ability to increase dopamine (DA) concentration in discrete brain regions, which persistently shapes excitatory glutamate transmission within the reward circuit, thereby hijacking natural reward processing (1, 2). This calls for a better understanding of the precise molecular events underlying the detrimental interplay between DA and glutamate signaling triggered by drugs of abuse.

The enduring behavioral alterations induced by protracted drug exposure are largely believed to result from persistent drug-evoked neuronal adaptations within the striatum, especially in its ventral part, the nucleus accumbens (NAc) (1, 3). The striatum is indeed a key target structure of drugs of abuse that integrates convergent glutamate inputs from limbic, thalamic, and cortical regions, encoding components of drug-associated stimuli and environment,

and DA signals that mediate reward prediction error and incentive values (4). Integration of DA and glutamate signals is achieved by the two segregated subpopulations of γ -aminobutyric acid–releasing (GABAergic) medium-sized spiny neurons (MSNs) expressing either the dopamine receptor (DAR) type 1 (D1R) or type 2 (D2R), although a fraction of MSN in the NAc expresses both receptors (5). Cell type–specific manipulations of neuronal activity showed that inhibiting and activating D1R-MSN dampen and potentiate long-term drug-evoked responses, respectively, in line with their “proreward” action (2, 6–9). By contrast, most studies support an inhibitory role of D2R-MSN activation on drug-mediated adaptations (6, 7, 10–12). These studies, based on direct manipulations of MSN activity, were instrumental in highlighting the role of MSNs as putative players in drug-related behavioral adaptations. However, they do not establish how drugs of abuse persistently affect the functionality of each MSN subpopulation or the underlying cellular and molecular mechanisms. In this context, increasing evidence suggests that such a central role of MSN subpopulations in drug-induced behavioral adaptations originates, at least in part, from DA-dependent long-lasting changes at excitatory striatal synapses. Long-term potentiation of specific glutamatergic afferents impinging onto D1R-MSNs induced by DA is responsible for both the induction and maintenance of long-lasting behavioral adaptations to repeated cocaine exposure (13–15). Glutamate transmission onto D2R-MSNs seems to be spared by cocaine exposure but selectively altered during cocaine craving after long access to high doses of cocaine (16).

It is therefore timely to identify molecular mechanisms by which drug-evoked increases in DA can permanently hijack glutamate transmission onto MSNs. Although a number of studies have described the cross-talk between D1R and glutamate receptors of the

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 et 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'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, MIRCen, and CNRS UMR 9199, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 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.

*Corresponding author. Email: peter.vanhoutte@sorbonne-universite.fr

N-methyl-D-aspartate (NMDAR) subtype as a key player in the behavioral effects of psychostimulants (2, 17–22), the underlying molecular mechanisms remain elusive. Moreover, the processes by which DA impairs D2R-MSN activity to promote long-lasting drug-induced reinforcement are yet unknown.

Heteromeric complexes formed between DARs and glutamate NMDAR have been proposed as integrators of DA and glutamate signals in both MSN populations (23). Receptor heteromers are of particular interest not only because of their ability to dynamically modulate the component receptor's functions in time and space but also because they exhibit functional properties distinct from the component receptors, making them attractive targets for the development of more selective pharmacological strategies (24–27). Most evidence generated to date regarding DAR-NMDAR heteromers' functions comes from *in vitro* and *ex vivo* studies, and their potential role in long-term drug-induced adaptations has been overlooked. D1R heteromers formed with glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1 (GluN1) subunits of NMDAR have been described *in vitro* (28, 29) and *ex vivo* in the striatum (30, 31). We established that acutely perturbing D1R-NMDAR interaction blunts the facilitation of NMDAR signaling by DA in D1R-MSN in striatal slices, as well as cocaine-induced locomotor sensitization (31). However, the impact of chronic disruption of D1R-NMDAR on the sensitizing and rewarding effects of repeated cocaine exposure is unknown. In contrast, the interaction of D2R with GluN2B subunits of NMDAR has been shown to mediate the inhibition of NMDA currents by DA in D2R-MSNs and control acute stereotypic locomotor responses to high cocaine doses (32). Nonetheless, the implication of D2R-NMDAR heteromerization in long-lasting behavioral alterations induced by cocaine has not been studied. However, D2R-dependent transmission is largely believed to be a main actor in the development of addiction based on clinical and preclinical findings (2, 33).

We therefore investigated whether heteromers formed by DAR and NMDAR constitute molecular substrates by which drugs of abuse enduringly alter glutamate transmission and mediate long-lasting sensitizing and rewarding effects of cocaine. We found that repeated cocaine exposure triggers a transient increase in D1R-NMDAR heteromerization throughout the entire striatum, which returns to baseline after an abstinence period. By contrast, cocaine induces a stable increase in heteromerization of D2R-NMDAR that is mostly restricted to the NAc and persists over 7 days of abstinence. Using a temporally controlled disruption of these receptor heteromers, combined with electrophysiological recordings, imaging, and behavioral assessments, we showed that D1R-NMDAR heteromerization controls the development of cocaine-evoked long-term synaptic plasticity and morphological changes in D1R-MSNs, as well as behavioral adaptations. D2R-NMDAR heteromerization not only contributes to the development of the sensitizing and rewarding effects of cocaine but, more importantly, also mediates the persistence of these adaptations after a period of abstinence, followed by a reexposure to the drug. The targeting of either type of heteromers preserves natural reward processing. Notably, we found that these receptor complexes also exist in human postmortem brain samples and showed that, despite a substantial decrease in D2R protein expression, individuals with a history of psychostimulant use disorder display a significantly higher proportion of D2R that form heteromers with GluN2B-containing NMDAR in the NAc. Our results support a model by which the heteromerization of DA and glutamate receptors induced by drugs of abuse in D1R- and D2R-MSNs is a key

molecular event underlying the detrimental interplay between these two neurotransmitter systems in drug addiction. The role of D2R-NMDAR heteromers in the persistence of the sensitizing and rewarding effects of drugs makes them potential targets not only for treating addiction in humans but also, more broadly, in multiple neuropsychiatric disorders.

RESULTS

Detection and temporally controlled disruption of striatal D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization *in vivo*

A prerequisite for the study of DAR-NMDAR heteromer modulation and function in cocaine-evoked adaptations was to develop approaches to both visualizing and interfering with receptor interactions *in vivo*. Detection of endogenous D1R-NMDAR proximity was first assessed in the NAc of naïve mice through proximity ligation assay (PLA) (34). The bright-field PLA assay yielded a brown punctate signal for D1R-NMDAR complexes that was absent when one of the two primary antibodies was omitted (Fig. 1A), similar to what was previously found when PLA was performed in D1R receptor knockout mice (31). To study the function of D1R-NMDAR heteromers, we designed an adeno-associated virus (AAV)-based strategy to disrupt heteromers in a spatially and temporally controlled manner (Fig. 1B). The AAV-Tet-On-GluN1C1 allows a doxycycline (dox)-inducible bicistronic expression of the red fluorescent protein (RFP) reporter protein together with a peptide corresponding to the C1 cassette (D₈₆₄-T₉₀₀) of GluN1 that binds to D1R (28). This peptide blocks D1R-NMDAR interaction *in vitro* while preserving the functions of individual D1R and NMDAR independently of their heteromerization (31). The control virus, Tet-On-GluN1C1Δ, encodes a C1 cassette deleted of nine amino acids that are required for electrostatic interactions between D1R and GluN1 (35). This mutated cassette does not interfere with D1R-GluN1 interaction *in vitro* (31). After stereotaxic injections in the NAc, the treatment with dox triggered a rapid and sustained expression of the RFP reporter (Fig. 1B). Analysis of D1R-NMDAR proximity in RFP-positive neurons showed that Tet-On-GluN1C1 significantly reduced D1R-NMDAR PLA puncta when compared to the control AAV (Fig. 1, C and D). Notably, we also verified that blocking D1R-NMDA heteromerization altered downstream cocaine-mediated signaling events (20, 31), including GluN2B phosphorylation and extracellular signal-regulated kinase pathway activation (fig. S1), without compromising neuronal survival (Fig. 1E). As for D1R-NMDAR heteromers, bright-field PLA detection of D2R-NMDAR proximity appeared as a brown punctate signal, which disappeared upon omission of one primary antibody (Fig. 1F). To interfere with D2R-NMDAR interaction, we generated AAV-Tet-On-D2R-IL3, which drives a dox-inducible expression of a peptide corresponding to a small fragment (T₂₂₅-A₂₃₄) located within the third intracellular loop (IL3). This IL3 domain is known to play a key role for D2R-NMDAR interaction (32). Since critical amino acids responsible for D2R-NMDAR interaction have not been yet identified within this D2R-IL3 fragment, we used a control virus (Tet-On-D2R-IL3-scr) driving the expression of a scrambled peptide (Fig. 1G). We found that Tet-On-D2R-IL3 efficiently reduced D2R-NMDAR PLA puncta (Fig. 1, H and I) while preserving neuronal survival (Fig. 1J). Together, these results validate both an efficient disruption of receptor heteromerization and the accuracy of using PLA to detect DAR-NMDAR heteromers *in vivo*.

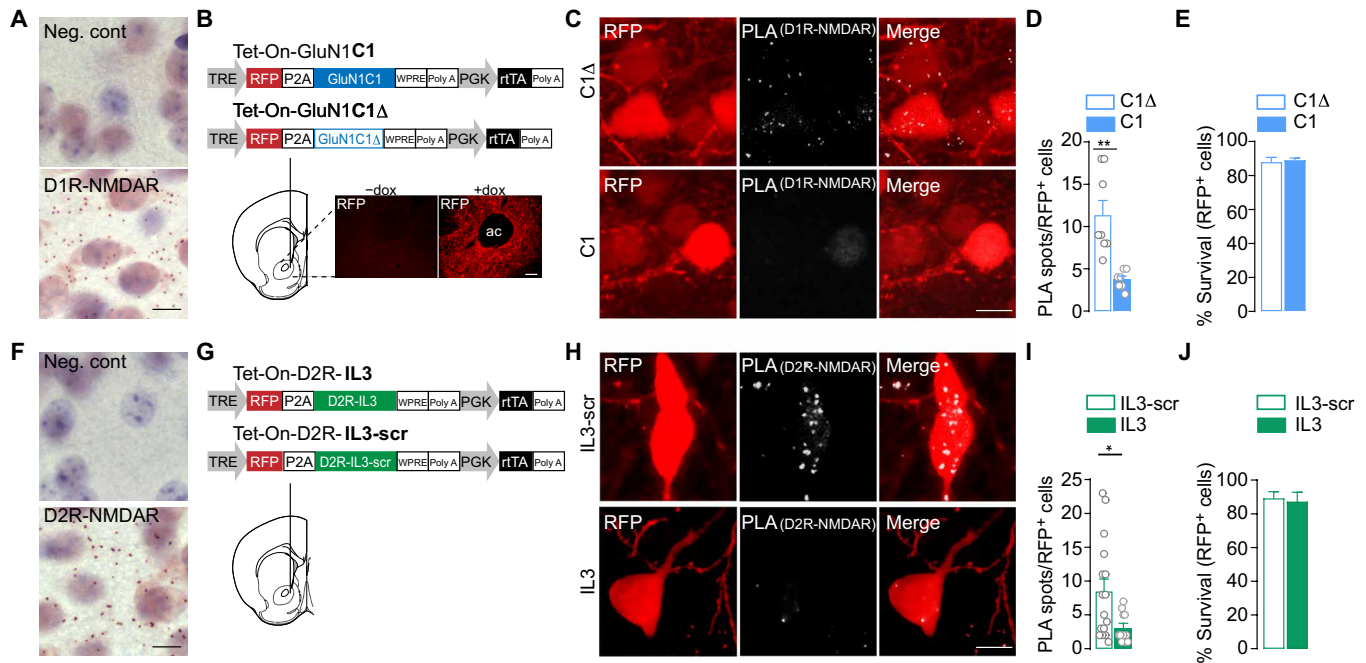


Fig. 1. Detection and temporally controlled disruption of striatal D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization in vivo. (A) Example images of D1R-NMDAR heteromer PLA detection and related negative (Neg. cont) showing the absence of signal when one primary antibody is omitted. (B) Top: Viral-based strategy for expression of interfering peptide to disrupt D1R-NMDAR interaction [Tet-On-GluN1C1 (C1)] and control [Tet-On-GluN1C1Δ (C1Δ)] in the NAc. Bottom: Example image of dox (+dox)-mediated RFP expression [anterior commissure (ac)]. TRE, tetracycline response element; P2A, 2A peptide; PGK, phosphoglycerate kinase 1 promoter; rtTA, reverse tetracycline-controlled transactivator. (C) Example image of D1R-NMDAR heteromer detection by PLA in C1Δ- and C1-transduced neurons. (D) Quantifications of the fluorescent PLA signal in C1Δ- and C1-transduced neurons. Two-sided Student's *t* test, $t = 4.078$, $df = 13$, $**P = 0.0013$, $n = 7$ to 8 cells from four mice per group. (E) Neuronal survival of C1Δ- and C1-transduced neurons. Two-sided Student's *t* test, $t = 0.354$ $df = 6$, $P = 0.735$, $n = 4$ mice per group. (F) Same as in (A), for D2R-NMDAR heteromer PLA detection. (G) Viral strategy for expression of interfering peptide to prevent D2R-NMDAR heteromerization [Tet-On-D2R-IL3 (IL3)] and control [Tet-On-D2R-IL3-scr (IL3-scr)]. (H) Representative image D2R-NMDAR heteromer detection by PLA in IL3-scr- and IL3-transduced neurons. (I) Quantifications of the fluorescent PLA signal in IL3-scr- and IL3-transduced neurons. Two-sided Student's *t* test, $t = 2.393$, $df = 25$, $*P = 0.0246$, $n = 11$ to 16 cells from 4 mice per group. (J) Neuronal survival of IL3-scr- and IL3-transduced neurons. Two-sided Student's *t* test, $t = 0.2767$ $df = 6$, $P = 0.7913$, $n = 4$ mice per group. Scale bars, 10 μm . Error bars denote SEMs.

Behavioral sensitization to cocaine is associated with transient D1R-NMDAR heteromerization and prolonged D2R-NMDAR heteromerization in the NAc

We investigated whether a cocaine regimen that triggers persistent behavioral adaptations can modulate the formation of these receptor complexes in vivo in the striatum. Mice were subjected to five daily injections of cocaine (15 mg/kg), which elicits a progressive locomotor sensitization (Fig. 2A) that is known to persist despite several weeks of abstinence. This behavioral paradigm is a straightforward model to study the mechanisms involved in drug-induced behavioral adaptations (2, 36). Mice were euthanized 1 day after the last injection to detect endogenous DAR-NMDAR proximity in distinct striatal subregions through PLA (34). We found that cocaine-treated mice displayed increased D1R-NMDAR heteromerization in the dorsolateral striatum (DL Str) and dorsomedial striatum (DM Str), as well as in the NAc core and NAc shell subdivisions (Fig. 2B). Cocaine also increased D2R-NMDAR heteromerization, but primarily in the NAc, with a smaller effect in the DL Str (Fig. 2C). This increased heteromerization occurred in the absence of changes in global expression levels of the component receptors (fig. S2A,B). Notably and as previously observed (37), repeated cocaine exposure decreases expression levels of the synaptic scaffold protein postsynaptic density 95 (PSD-95) (fig. S2C), which could

partly explain our results as the interaction of NMDAR and D1R with PSD-95, through partly overlapping domains, has been described to prevent D1R-NMDAR interaction (38).

To study the kinetics of receptor heteromerization, mice were subjected to a cocaine-induced locomotor sensitization paradigm, followed by 1-week abstinence period and a challenge injection of saline or cocaine. We found that cocaine-mediated D1R-NMDAR heteromerization was transient, as it returned to baseline levels after 7 days of abstinence in the NAc core, DM Str, and DL Str and was significantly decreased below saline-treated mice in the NAc shell. After a challenge injection of cocaine, D1R-NMDAR heteromerization increased again in all striatal subregions except in the DL Str, after the challenge injection of cocaine (Fig. 2D). Notably, D2R-NMDAR heteromerization appeared to be sustained ($15 \pm 3.5\%$ compared to the saline-treated group) over the abstinence period, specifically in the NAc core. The challenge injection of cocaine further increased D2R-NMDAR heteromers in the NAc, but not in dorsal parts of the striatum (Fig. 2D). To assess the role of D1R or D2R stimulation for receptor heteromerization, mice underwent a cocaine-locomotor sensitization followed by an abstinence period. Before a cocaine challenge, mice received an intraperitoneal injection of D1R or D2R antagonist that blunted the expression of behavioral sensitization. This allowed us to show that the stimulation

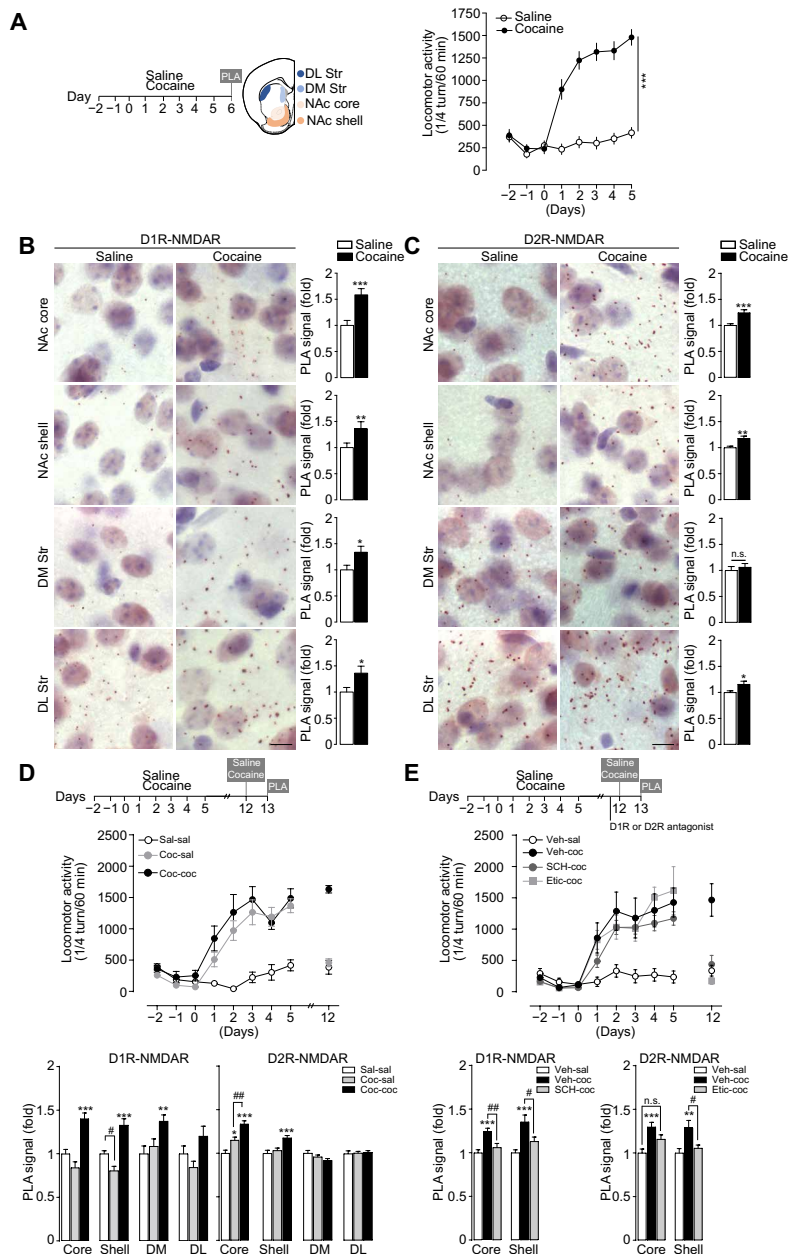


Fig. 2. Behavioral sensitization to cocaine is associated with transient D1R-NMDAR heteromerization and prolonged D2R-NMDAR heteromerization in the NAc.

(A) Experimental time frame [NAc core and NAc shell and measurements of locomotor activity before and during 5 days of saline or cocaine (15 mg/kg) injections]. Two-way analysis of variance (ANOVA): treatment effect, $F_{1,24} = 67.79$, $***P < 0.0001$ saline versus cocaine on day 5, $n = 13$ mice per group. DM, dorso-medial striatum; DL, dorso-lateral striatum. (B) Detection and quantifications of D1R-NMDAR heteromerization in saline- and cocaine-treated groups. PLA signal is represented as fold increase normalized to the saline group. Two-sided Student's *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ (saline versus cocaine); $n = 28$ to 84 fields of view per structure (NAc core, 4; NAc shell, 12; DM, 6; DL, 6; fields of view per mice) from seven mice per group. (C) Same as for (B) for D2R-NMDAR heteromerization. (D) Experimental time frame, measurements of locomotor activity, and quantifications of D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization. PLA signal is represented as fold increase normalized to the saline group. One-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ (saline-saline versus cocaine-saline/cocaine-cocaine); # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ (cocaine-saline versus cocaine-cocaine); $n = 28$ to 84 fields of view per structure from seven mice per group. (E) Same as for (D) except that mice received either a vehicle solution (Veh) or the D1R antagonist SCH23390 (SCH) or the D2R antagonist eticlopride (Etic) before a cocaine challenge. One-way ANOVA: ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (vehicle-saline versus vehicle-cocaine); # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ (vehicle-cocaine versus SCH-cocaine or cocaine versus Etic-cocaine); n.s., not significant; $n = 28$ to 84 fields of view per structure from seven mice per group. Scale bars, 10 μm (B and C). Error bars denote SEMs.

of D1R or D2R was essential for cocaine-induced D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization, respectively (Fig. 2E). Together, these data show that behavioral sensitization to cocaine is associated with a DAR-dependent transient heteromerization

of D1R-NMDAR throughout the whole striatum, whereas D2R-NMDAR heteromerization occurs primarily in the NAc and is maintained in the core subdivision during a 7-day abstinence from cocaine.

Cocaine-evoked potentiation of glutamate transmission onto D1R-MSNs requires D1R-NMDAR heteromerization

Long-lasting changes of glutamate transmission at cortical projections onto D1R-MSN of the NAc have been causally implicated in the development of cocaine-induced locomotor sensitization (13). To study the contribution of D1R-NMDAR heteromerization to drug-induced plasticity at these synapses, we injected mice with Tet-On-GluN1C1 together with a mixture of AAV-PPTA-Cre, driving the expression of the Cre recombinase under the control of the D1R-MSN-specific preprotachykinin (PPTA) promoter, and AAV-Double-floxed inverse Open reading frame (DIO)-eGFP (enhanced green fluorescent protein) to tag D1R-MSN (fig. S3A) (7, 39, 40). These mice were supplemented with dox before and during daily injections of saline or cocaine for 5 days, followed by a 10-day abstinence period. As previously shown (16), cocaine triggered an increase in 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 inhibition of D1R-GluN1 heteromerization blunted the cocaine-evoked increase in A/N ratio (Fig. 3, A and B), without modifying the amplitude or the kinetics of NMDAR excitatory postsynaptic currents (EPSCs; Fig. 3, C and D). These data show that D1R-NMDAR heteromerization controls cocaine-evoked changes in glutamate transmission in D1R-MSNs.

D1R-NMDAR heteromerization controls the development of cocaine-induced locomotor sensitization

We next evaluated the role of D1R-NMDAR heteromerization in the behavioral sensitizing properties of cocaine by supplementing Tet-On-AAV-injected mice with dox before and during saline or cocaine administration (Fig. 3E). Uncoupling D1R from GluN1 subunits of NMDAR did not affect basal locomotion nor the acute hyperlocomotor

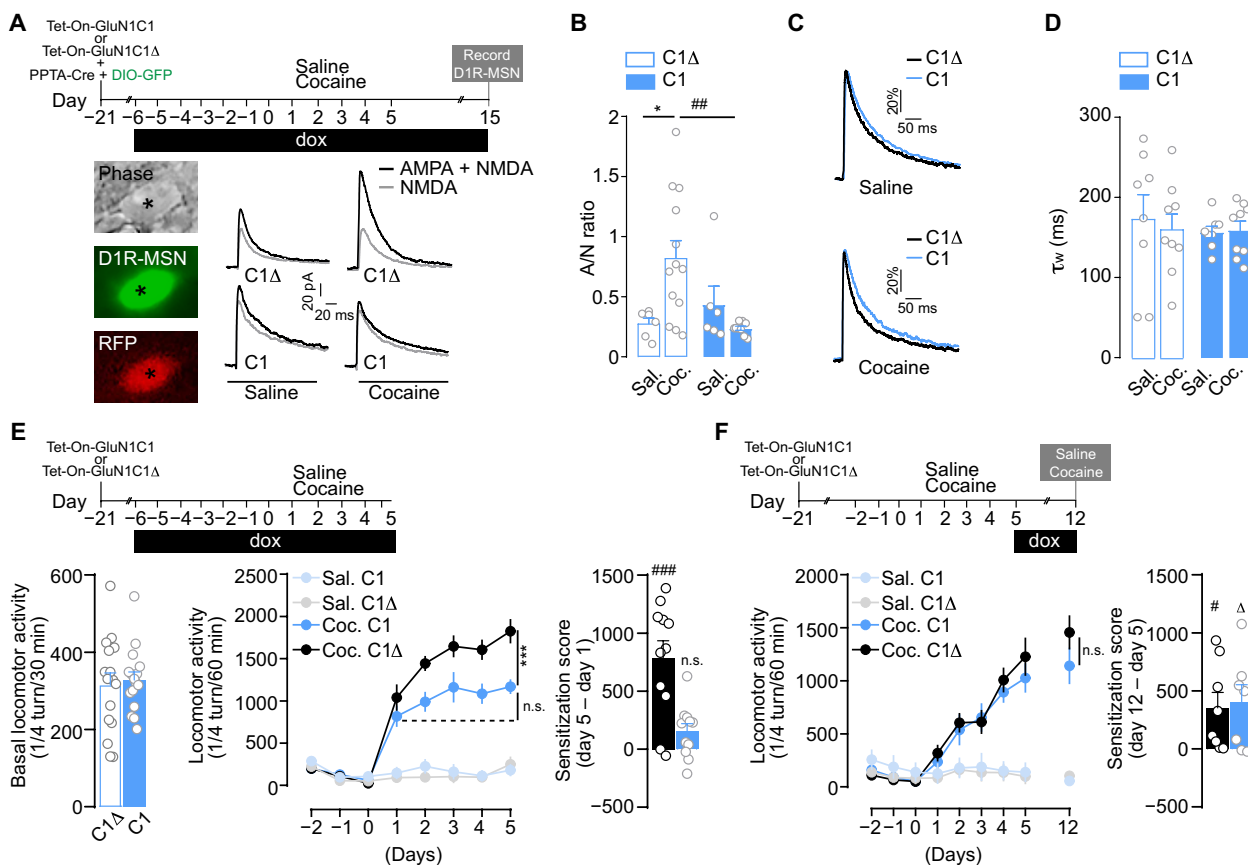


Fig. 3. D1R-NMDAR heteromerization controls cocaine-evoked potentiation of glutamate transmission onto D1R-MSN and the development of behavioral sensitization. (A) Experimental design and example trace of AMPA+NMDA (black) and NMDA (gray) currents in neurons (asterisk) expressing GFP [i.e., D1R-MSN (see fig. S3A)], and C1 or C1Δ (RFP⁺). (B) A/N ratios. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,30} = 2.511$, $*P = 0.033$ and $###P = 0.0061$, $n = 3$ to 4 mice per group and $n = 6$ to 13 cells per group. (C) Comparison of representative recordings of pharmacologically isolated NMDAR EPSCs, normalized to the peak amplitude (in percentage). (D) Deactivation kinetics of NMDAR EPSCs. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,30} = 0.205$, $P > 0.999$, $n = 3$ to 4 mice per group and $n = 8$ to 9 cells per group. (E) Top: Experimental time frame and basal locomotor activity. Bottom left: Two-sided Student's t test, $t = 0.332$ $df = 30$, $P = 0.742$, $n = 16$ mice per group. Bottom middle: Inhibition of D1R-NMDAR heteromerization during the development of locomotor sensitization. Three-way ANOVA: virus effect, $F_{1,256} = 13.72$, $***P = 0.0003$; $n.s.$, $P > 0.9999$, $n = 7$ to 11 mice per group. Bottom right: Sensitization scores of cocaine-treated mice injected with Tet-On-GluN1C1Δ (black) or Tet-On-GluN1C1 (blue). One-sample Student's t test: $t = 5.289$, $df = 10$, $###P = 0.0004$ (cocaine C1Δ versus 0); $t = 2.197$; $df = 10$; $n.s.$, $P > 0.05$ (cocaine C1 versus 0). (F) Top: Experimental time frame. Bottom left: Inhibition of D1R-NMDAR heteromerization during 7 days of abstinence, followed by a challenge cocaine injection. Three-way ANOVA: virus effect, $F_{1,243} = 0.6160$, $P > 0.9999$, $n = 7$ to 8 mice per group. Bottom right: Sensitization scores of cocaine-treated mice injected with Tet-On-GluN1C1Δ (black) or Tet-On-GluN1C1 (blue). One-sample Student's t test, $t = 5.289$, $df = 7$, $#P = 0.0325$ (cocaine C1Δ versus 0); $t = 2.599$, $df = 6$, $\Delta P = 0.0407$ (cocaine C1 versus 0). Error bars denote SEMs.

response triggered by the first cocaine injection but fully blocked the development of the behavioral sensitization induced by subsequent injections (Fig. 3E). Notably, dox supplementation did not alter body weight, basal locomotion, or behavioral sensitization to cocaine in mice that were not injected with Tet-On viruses (fig. S4, A to C).

By temporally controlling expression of the interfering peptides, we assessed the contribution of D1R-NMDAR heteromerization to the maintenance phase of locomotor sensitization. Mice injected with Tet-On viruses were treated with saline or cocaine for 5 days 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-NMDAR heteromerization after behavioral sensitization, dox was given after the last saline or cocaine injection and during a 7-day abstinence period, followed by a challenge injection of saline or cocaine (Fig. 3F, top). We found that mice displayed the same level of sensitization in response to the cocaine challenge regardless of the AAV used, demonstrating that D1R-NMDAR heteromerization is not required for the maintenance of locomotor sensitization (Fig. 3F, bottom). Since cocaine also enhanced D1R-NMDAR heteromerization in the dorsal striatum (Fig. 2B), we also targeted heteromers in this striatal subregion and obtained the same results (fig. S4, D and E). Overall, these data show that D1R-NMDAR heteromerization in the striatum controls the development, but not the maintenance, of cocaine's sensitizing effects.

D2R-NMDAR heteromerization is involved in the development and maintenance of cocaine's sensitizing effects

In light of the significant and persistent impact of cocaine on D2R-NMDAR heteromerization in the NAc (Fig. 2, C to E), we studied the consequences of disrupting D2R-NMDAR interaction on glutamate transmission onto D2R-MSN and on the sensitizing effects of cocaine using AAV-Tet-On-D2R-IL3 (see Fig. 1, G to I). Because repeated cocaine exposure does not modify A/N ratio in D2R-MSN (16), the influence of uncoupling D2R from NMDAR was studied in saline-treated animals with virally tagged D2R-MSN owing to the coinjection of AAV-PPE-Cre, driving the expression of the Cre recombinase under the control of the D2R-MSN-specific preproenkephalin (PPE) promoter (7) and AAV-DIO-eGFP (fig. S3B). We found that inhibiting D2R-NMDAR heteromerization did not alter, by itself, A/N ratio in D2R-MSN (Fig. 4, A and B). The AAV-Tet-On-D2R-IL3 also left unchanged the amplitude and kinetics of NMDA currents (Fig. 4, C and D), indicating a lack of nonspecific effects of our strategy on NMDAR functionality. Notably, disrupting D2R-NMDAR interaction with AAV-Tet-On-D2R-IL3 also spared the ability of a D2R agonist to inhibit cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) production in a heterologous system (Fig. 4E), demonstrating that our interfering strategy selectively perturbs D2R-NMDAR heteromerization while preserving the functions of individual component receptors.

At the behavioral level, interfering with D2R-NMDAR heteromerization preserved basal locomotion but blunted the development of cocaine-induced locomotor sensitization (Fig. 4F). Notably, as opposed to D1R-NMDAR complexes, we found that the inhibition of D2R-NMDAR heteromerization during the abstinence period also reduced the maintenance of the behavioral sensitization compared to cocaine-treated mice injected with the control virus (Fig. 4G). These mice were euthanized 24 hours after the last cocaine exposure to analyze expression levels of Δ FosB, which has been shown to be persistently expressed in response to cocaine (41). Although modulating Δ FosB expression levels in D2R-MSN has

been shown to not affect behavioral responses to cocaine (42–44), Δ FosB expression was used here as a readout for potential signaling and transcriptional alterations induced in D2R-MSN as a consequence of D2R-NMDAR heteromer disruption during abstinence and re-exposure to cocaine. Notably, we observed a significant increase in the number of Δ FosB-positive D2R-MSN after the cocaine challenge upon inhibition of D2R-NMDAR interaction (fig. S5A). This suggests that D2R-NMDAR heteromer disruption is associated with signaling pathway activation in D2R-MSN. Regardless, these data demonstrate that D2R-NMDAR heteromerization controls both the development and the maintenance of cocaine's sensitizing effects.

Differential roles of D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromers in controlling the rewarding effects of cocaine

We next investigated the role 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 NMDAR were uncoupled (Fig. 5A). Although single or repeated cocaine administration has been shown to trigger dendritic spine formation in D1R-MSN (39, 45), there is no study showing these morphological changes in the NAc in the context of CPP. Mice were thus euthanized the day after the behavioral test to perform a three-dimensional morphological analysis of GFP-tagged D1R-MSN. Control mice, which developed CPP to cocaine, displayed a significant increase in dendritic spine density in D1R-MSN, which was inhibited when D1R and NMDAR were uncoupled (Fig. 5B). To study the implication of D1R-NMDAR heteromerization on cocaine-induced reinstatement of CPP, AAV-injected mice were initially trained for CPP in the absence of dox. Once mice developed CPP, dox was added to alter D1R-NMDAR interaction during an extinction period, followed by a cocaine-induced reinstatement of CPP. We observed that the inhibition of D1R-NMDAR interaction did not alter the kinetics of extinction nor the reinstatement of CPP (Fig. 5C), thus supporting a critical role for D1R-NMDAR heteromers in the development of the rewarding effects of cocaine, as observed for locomotor sensitization, but not in the extinction or reinstatement of CPP.

The uncoupling of D2R from NMDAR also blocked the development of cocaine CPP (Fig. 5D), but this was not correlated to morphological changes in D2R-MSNs since the CPP paradigm did not trigger any modification of dendritic spine density in D2R-MSN regardless of the AAV used (Fig. 5E). Inhibiting D2R-NMDAR heteromerization once the mice had developed CPP did not affect the extinction of CPP but significantly reduced cocaine-induced reinstatement of CPP (Fig. 5F). Notably, this inhibitory effect of D2R-NMDAR heteromer disruption on cocaine-induced reinstatement of CPP was associated with an increased expression of Δ FosB in D2R-MSN (fig. S5B), similar to what we observed after a challenge injection of cocaine in the locomotor sensitization paradigm.

Together, these results indicate that D2R-NMDAR heteromerization is required for both the development and reinstatement of cocaine-induced CPP, independently of morphological changes in GFP-tagged D2R-MSNs.

Inhibiting D1R-NMDAR or D2R-NMDAR heteromerization does not alter CPP for food

Manipulating D1R-NMDAR or D2R-NMDAR heteromerization *in vivo* allowed us to reveal their selective implication in controlling

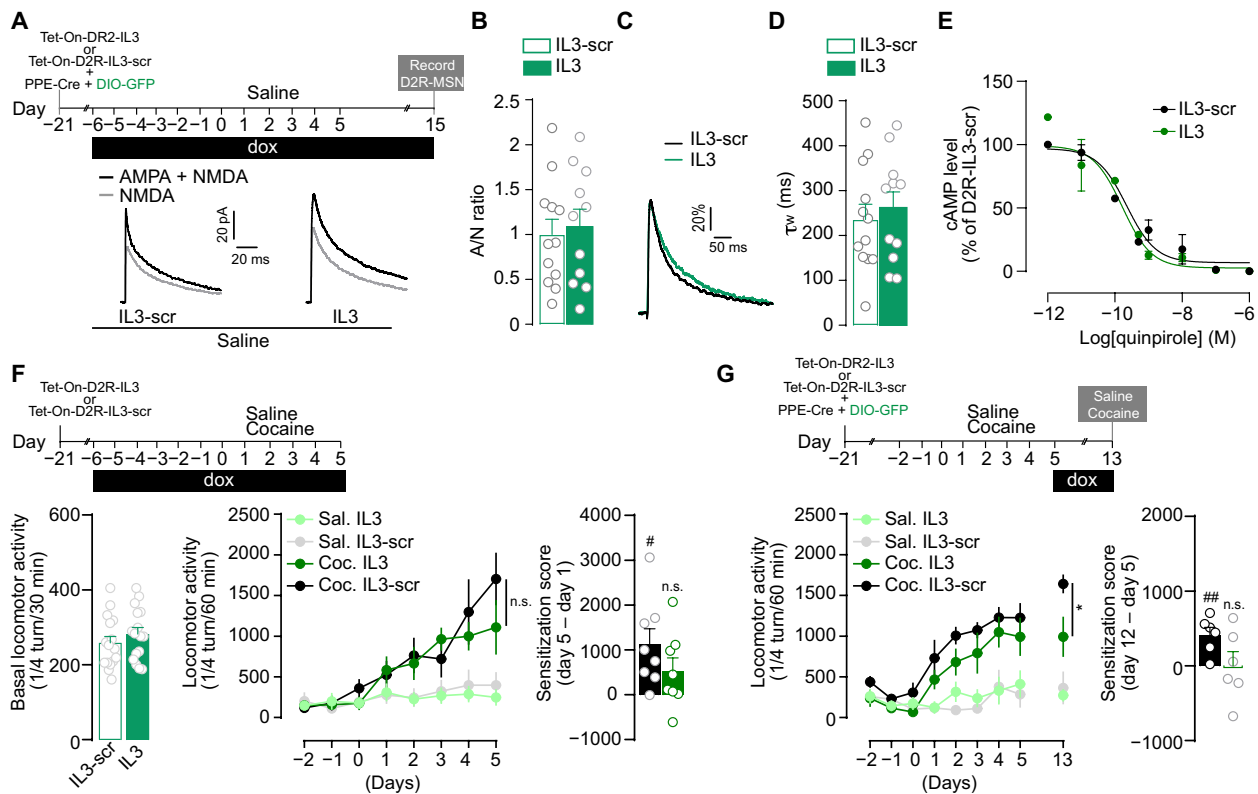


Fig. 4. D2R-NMDAR heteromerization is involved in the development and maintenance of cocaine's sensitizing effects. (A) Experimental time frame and representative traces of AMPA + NMDA (black) and NMDA (gray) currents in neurons expressing GFP [i.e., D2R-MSN (see fig. S3B)] and IL3 or IL3-scr (RFP⁺) (B) A/N ratios. Two-sided Student's *t* test: $t = 0.3397$, $df = 21$, $P = 0.7375$, $n = 4$ to 6 mice per group and $n = 11$ to 12 cells per group. (C) Comparison of representative recordings of pharmacologically isolated NMDAR EPSCs, normalized to the peak amplitude (in percentage). (D) Deactivation kinetics of NMDA EPSCs. Two-sided Student's *t* test: $t = 0.5129$, $df = 21$, $P = 0.6134$, $n = 11$ to 12 cells to group. (E) Tet-On-D2R-IL3 spares quinpirole-induced inhibition of forskolin-induced accumulation of cAMP. LogIC_{50} is -9.78 for D2R-IL3 and -9.65 for D2R-IL3-Scr. $n = 3$ independent experiments per condition. (F) Top: Experimental time frame. Bottom left: Basal locomotor activity. Two-sided Student's *t* test, $t = 0.994$, $df = 30$, $P = 0.3282$, $n = 16$ mice per group. Bottom middle: Inhibition of D2R-NMDAR heteromerization blunts the development of locomotor sensitization. Three-way ANOVA: virus effect, $F_{1,192} = 1.984$; n.s., $P > 0.9999$; $n = 6$ to 8 mice per group. Bottom right: Sensitization scores of cocaine-treated mice injected with Tet-On-D2R-IL3-scr (black) or Tet-On-D2R-IL3 (green). One-sample Student's *t* test, $t = 3.258$, $df = 7$, $\#P = 0.0139$ (cocaine IL3-Scr versus 0); $t = 1.782$, $df = 7$, $P > 0.05$ (cocaine IL3 versus 0). (G) Top: Experimental time frame. Bottom left: Impact of D2R-NMDAR heteromer inhibition on the maintenance of cocaine-evoked locomotor sensitization. Three-way ANOVA: virus effect, $F_{1,198} = 7.278$, $\#P = 0.0330$, $n = 6$ mice per group. Bottom right: Sensitization scores of cocaine-treated mice injected with Tet-On-D2R-IL3-scr (black) or Tet-On-D2R-IL3 (green). One-sample Student's *t* test: $t = 4.170$, $df = 5$, $\#\#P = 0.0087$ (cocaine IL3-Scr versus 0); $t = 0.00$, $df = 5$, $P > 0.05$ (cocaine IL3 versus 0). Error bars denote SEMs.

distinct phases of long-term cocaine-evoked adaptations. We next examined whether receptor heteromerization also controls non-drug reward processing. We found that disrupting either heteromer subtype, using comparable conditions as for our studies with cocaine, failed to alter the reinforcing properties of food (Fig. 6), supporting a role of these heteromers in controlling the rewarding effects of cocaine but not a nondrug reward.

D2R-NMDAR heteromerization is increased in postmortem brain samples from individuals with psychostimulant use disorder despite decreased D2R expression

As evidenced above in mice, D2R-NMDAR heteromerization plays a cardinal role in the maintenance of cocaine's effects without affecting natural reward processing, which positions this heteromer subtype as a potential therapeutic target for drug addiction. We therefore investigated whether D2R-NMDAR heteromerization could be detected in human brain tissues and if it was modulated in subjects with a history of psychostimulant dependence.

PLA has recently been shown to be a suitable approach to detecting single proteins or receptor heteromers, including D2R-A2AR (adenosine A2 receptor), in human brain samples (46, 47). We therefore performed single detection of D2R, the GluN2B subunit of NMDAR, and D2R-NMDAR heteromers in postmortem human samples from control subjects and matched individuals with a history of psychostimulant dependence. Although often suffering from a polydrug use disorder, these individuals were selected for their main dependence on psychostimulants and the presence of traces of psychostimulants in their blood at the time of death (table S1). 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 (fig. S6).

D2R single detection produced a dense punctate pattern in control subjects (Fig. 7A), as already reported (46). As expected, this signal was absent when PLA was performed in the absence of the primary antibody. We detected a significant decrease in relative

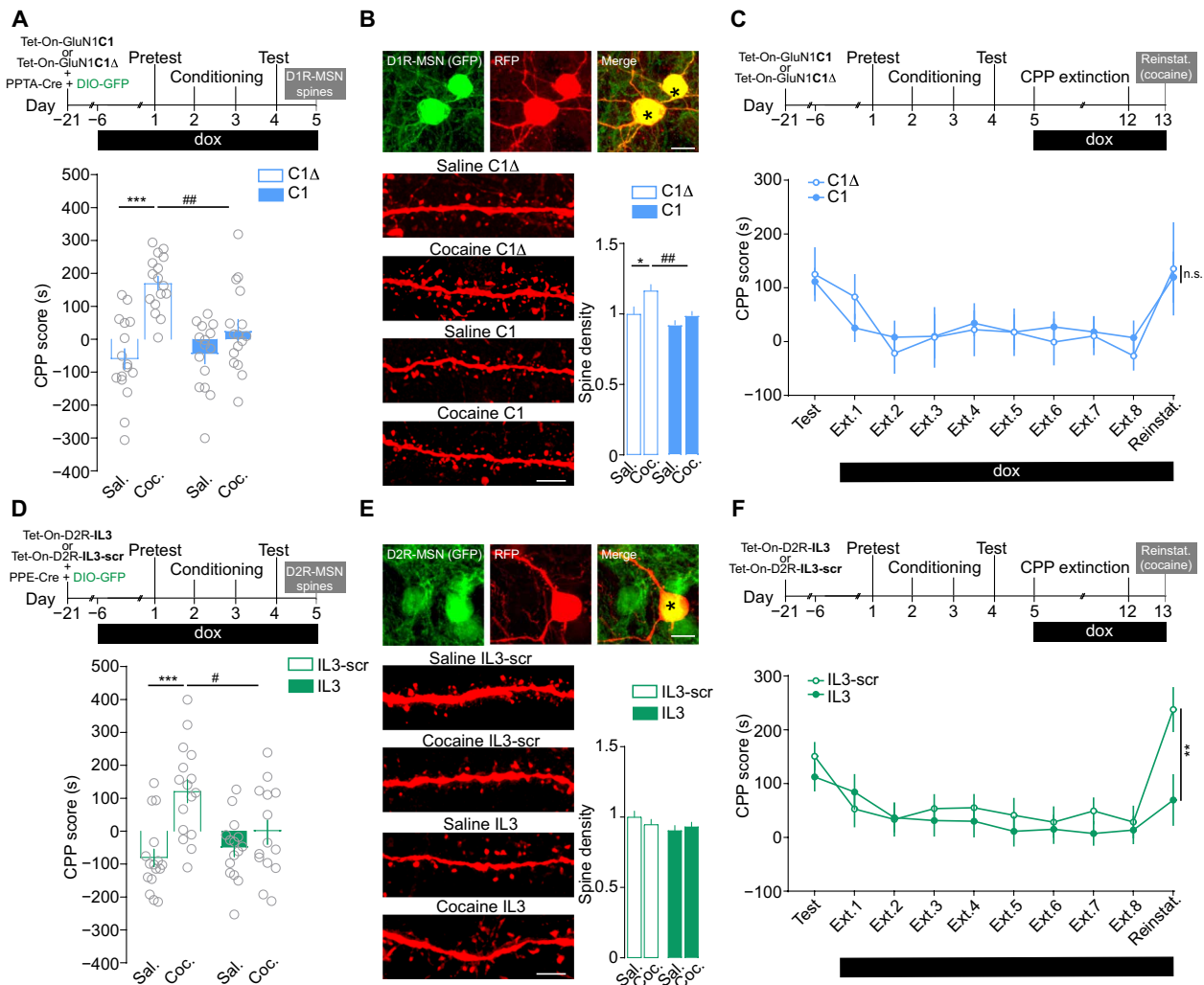


Fig. 5. Differential roles of D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization in controlling the rewarding effects of cocaine. (A) Experimental time frame and CPP score upon inhibition of D1R-NMDAR heteromerization. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,59} = 5.281$, $***P < 0.0001$ and $##P = 0.0040$, $n = 15$ to 16 mice per group. (B) Top: Low magnification images of D1R-MSN (GFP⁺; see fig. S3A) infected (RFP) shown by the asterisks. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. Bottom: High magnification of dendritic segments. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. Spine density analysis. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,162} = 11.14$, $*P = 0.0446$ and $##P = 0.0043$, $n = 27$ to 69 dendrites from six mice per group. (C) Experimental time frame to study the impact of D1R-NMDAR uncoupling on the extinction and cocaine-induced reinstatement (Reinstat.) of CPP. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,24} = 0.004$, $P > 0.999$ (cocaine C1 versus cocaine C1 Δ , CPP score on relapse day), $n = 10$ to 16 mice per group. (D) Same as for (A) upon inhibition of D2R-NMDAR heteromerization. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,57} = 2.424$, $***P < 0.0001$ and $\#P = 0.0396$, $n = 14$ to 16 mice per group. (E) Top: Low-magnification images of D2R-MSN (GFP; see fig. S3B) infected (RFP) shown by the asterisk. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. Bottom: High-magnification of dendritic segments. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. Spine density analysis. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,166} = 0.1268$; n.s., $P > 0.999$ (saline IL3-scr versus cocaine IL3-scr); $n = 30$ to 53 dendrites from six mice per group. (F) CPP score upon inhibition of D2R-NMDAR during CPP during extinction and cocaine-induced reinstatement. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,31} = 0.899$, $**P = 0.0018$ (cocaine IL3 versus cocaine IL3-scr CPP score on reinstatement day), $n = 16$ to 17 mice per group. Error bars denote SEMs.

D2R protein expression in samples from individuals with psychostimulant use disorder compared to control subjects (Fig. 7, A and B), consistent with the well-established decrease in striatal D2R availability reported in individuals suffering from psychostimulant misuse by positron emission tomography (PET) imaging (33, 48–51). By contrast, the single detection of GluN2B subunits of NMDAR produced a dense PLA signal that was not different between both groups of subjects (Fig. 7, C and D). The double recognition of D2R-NMDAR proximity yielded a punctate signal in control subjects, which was undetectable when one of the two primary antibodies was omitted (Fig. 7E). In samples from individuals with psychostimulant use disorder, there was a trend toward an increase in D2R-NMDAR

heteromers (Fig. 7F) despite the marked decrease in D2R levels. We therefore analyzed whether a correlation between individual receptor levels and D2R-NMDAR heteromerization could exist in individuals with a history of psychostimulant use disorder. We found a significant inverse correlation between these two parameters for D2R (Fig. 7G), but not GluN2B (Fig. 7H), suggesting that despite the lower levels of D2R expression, the remaining pool of D2R was preferentially involved in D2R-NMDAR heteromerization. In accordance, when normalizing the D2R-NMDAR PLA signal to D2R levels for each individual, we found a significant increase in relative D2R heteromerization with NMDAR in samples from people with psychostimulant use disorder when compared to controls (Fig. 7I).

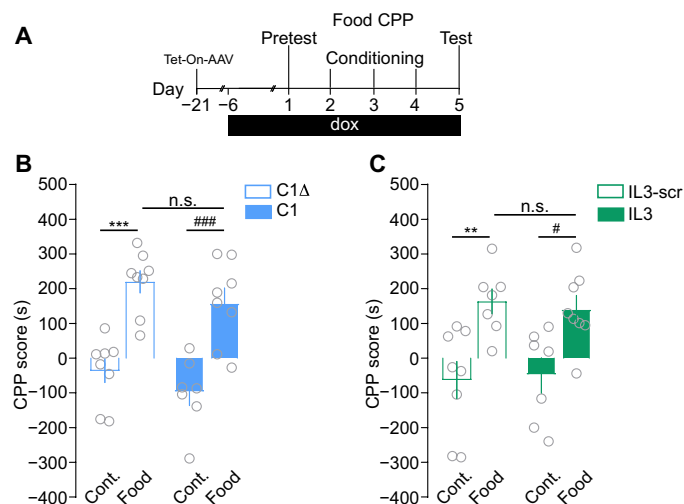


Fig. 6. Inhibiting D1R-NMDAR or D2R-NMDAR heteromerization does not alter CPP for food. (A) Experimental time frame to study the consequences of inhibition of heteromerization on the development of food-induced CPP. (B) Impact of inhibiting D1R-NMDAR heteromerization on the CPP score. Two-way ANOVA: virus effect, $F_{1,27} = 2.756$, $***P = 0.0002$ (control C1 Δ versus food C1 Δ); $###P = 0.0002$ (control C1 versus food C1); n.s., $P > 0.999$ (food C1 versus food C1 Δ); $n = 7$ to 8 mice per group. (C) Effect of inhibiting D2R-NMDAR heteromerization on the CPP score. Two-way ANOVA: virus effect $F_{1,26} = 0.007$, $**P < 0.0098$ (control IL3-scr versus food IL3-scr); $\#P = 0.0366$ (control IL3 versus food IL3); n.s., $P > 0.999$ (food IL3 versus food IL3-scr); $n = 7$ to 8 mice per group. Error bars denote SEMs.

Expression levels of D1R and GluN1 subunits of NMDAR, as well as D1R-NMDAR heteromerization, were also analyzed by PLA from the same human postmortem samples. Comparable levels of these two proteins were found in caudate putamen from control subjects and individuals with a history of psychostimulant misuse (fig. S7, A to D). By contrast, we observed decreased D1R-NMDAR heteromerization in individuals with psychostimulant use disorders (fig. S7, E to H). This latter result is reminiscent of the lower D1R-NMDAR interaction that we observed in mice after a 7-day period of abstinence in the NAc shell (see Fig. 2D).

To the best of our knowledge, these results provide the first direct evidence of a decreased D2R protein expression in the striatum of individuals with psychostimulant use disorder, which is associated with an increase in D2R-NMDAR heteromerization. Together with our interventional approach in mice, our data support D2R-NMDAR heteromers as therapeutic targets of potential interest in addiction.

DISCUSSION

Optogenetic studies have shown that distinct phases of drug-induced behavioral adaptations rely on DA-evoked synaptic adaptations at specific glutamate inputs onto MSN subpopulations (13–15, 52, 53). Nonetheless, the underlying molecular mechanisms remain poorly understood (2). This is an important issue because the identification of events responsible for such a detrimental interplay between DA and glutamate signaling may help in the development of innovative strategies with therapeutic potential. Here, we provide multiple lines of evidence, from mice to humans, that the heteromerization of glutamate NMDAR with D1R or D2R is modulated by psychostimulants and differentially controls the development and maintenance phases of cocaine-evoked long-term adaptations.

The focus on DAR and NMDAR heteromers as potential integrators of DA and glutamate inputs that may control drug-mediated adaptations stems from *in vitro* and *ex vivo* studies showing that such a direct physical interaction allows a reciprocal fine-tuning of the component receptors' functions (23, 27). In particular, patch clamp recording from striatal slices showed that D1R-NMDAR and D2R-NMDAR interactions facilitate and inhibit NMDAR-mediated signaling upon DA increase, respectively (31, 32). An appealing hypothesis would therefore be 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 recreational drug consumption to addiction (3, 54).

In agreement with this model, our PLA analysis showed that locomotor sensitization induced by repeated cocaine injections was associated with an increase in both heteromers in the NAc. We also found that this increased heteromerization requires DAR stimulation. While the PLA method cannot establish the direct physical contact of the two proteins or the stoichiometry of the complex, it does indicate that the proteins are in close molecular proximity (34). Nonetheless, previous studies have provided evidence for direct interactions between the D1R-NMDAR and D2R-NMDAR (28, 32), and we find that our viral minigenes selectively decrease the PLA signals; we therefore interpret these PLA data as support for receptor heteromerization. While in-depth characterization of the molecular events responsible for this increased receptor interaction upon cocaine exposure is beyond the scope of this study, a possible explanation may lie in the observation that repeated cocaine exposure decreases PSD-95 expression in the NAc (37). PSD-95 is a known endogenous inhibitor of D1R-NMDAR interaction (38) that also binds to D2R (55) and the C-terminal end of GluN2B subunits of NMDAR (56). Although the PLA approach is able to provide a snapshot of the impact of cocaine on receptor heteromerization *in situ* in their native environment (31, 34, 57), future work is needed to investigate whether heteromerization of DAR and NMDAR is an input-specific process and whether it relies on the modulation of receptor surface expression and/or dynamics.

The development of the sensitizing effects of cocaine has been previously causally linked to the potentiation of glutamate transmission at cortical projections onto D1R-MSN of the NAc (13). Since we observed that preventing D1R-NMDAR heteromerization reversed both alterations in A/N ratio and the development of behavioral sensitization while sparing the function of individual component receptors [see (31)], our results suggest that D1R-NMDAR heteromers are key molecular platforms for the development of cocaine-induced long-term adaptations. In contrast, disrupting D1R-NMDAR interaction during abstinence from cocaine did not disrupt maintenance of the sensitized state, supporting a preferential role of this heteromer subtype in the initial phases of cocaine-mediated adaptations. In agreement with this hypothesis, we observed that preventing D1R-NMDAR heteromerization during CPP conditioning also blocked the development of the rewarding effects of cocaine but failed to alter the extinction and reinstatement phases. This critical time window of D1R-NMDAR heteromer function restricted to the early developmental phase of cocaine-evoked adaptations agrees with our observation that cocaine-induced D1R-NMDAR heteromerization is a transient mechanism that does not outlast a 7-day abstinence period. Instead, the temporally controlled disruption of D2R-NMDAR

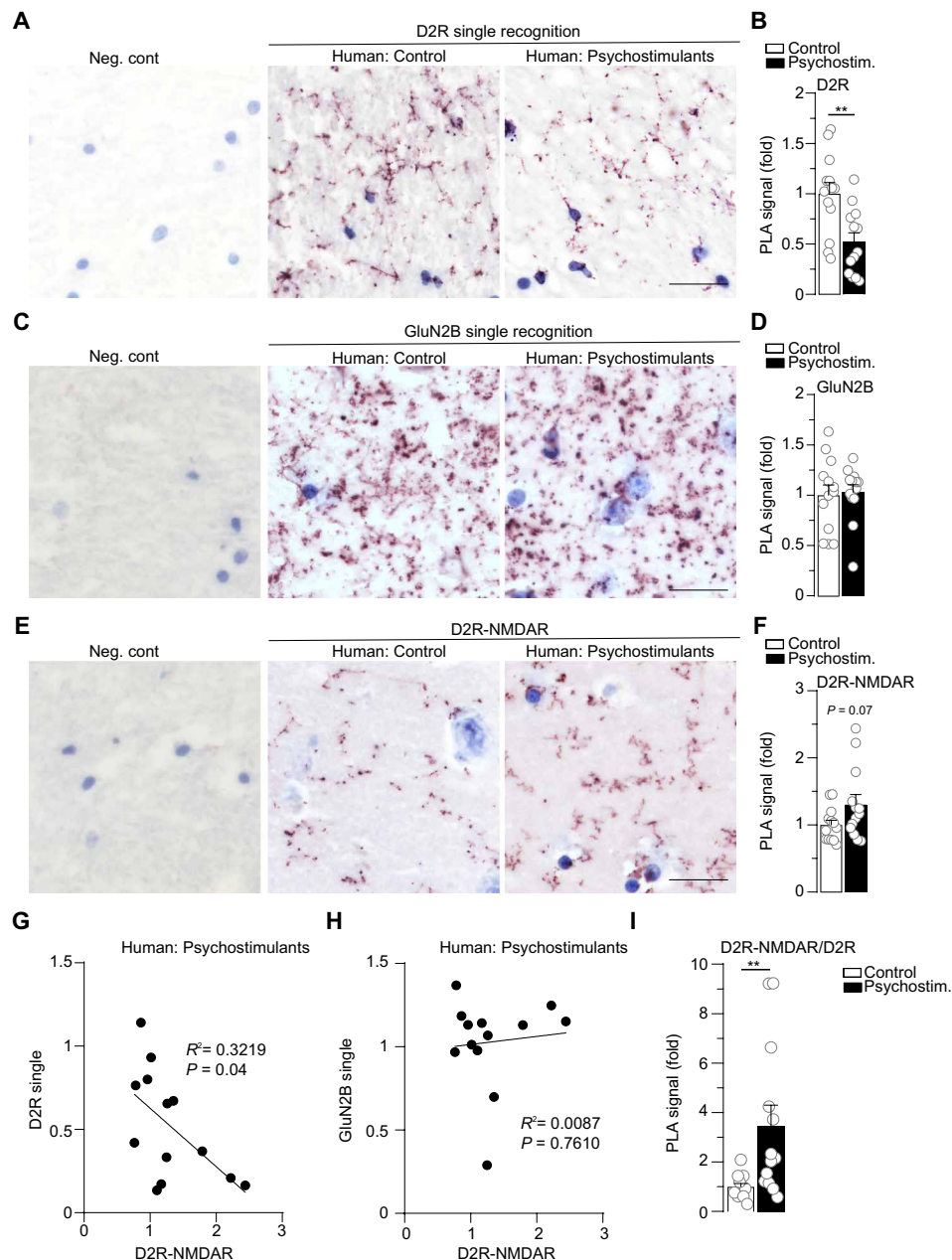


Fig. 7. D2R-NMDAR heteromerization is increased in postmortem brain samples from individuals with psychostimulant use disorder despite decreased D2R expression. (A) Representative images of D2R single recognition by PLA in human control subjects (Human: Control) or individuals having suffered from psychostimulant use disorder (Human: Psychostimulants) and negative control, in which the primary antibody is omitted (left; Neg. cont; see fig. S6). (B) Quantifications of D2R single PLA signal represented as fold decrease compared to control subjects. Two-sided Student's *t* test: $t = 3.331$ $df = 24$, $**P = 0.0028$, $n = 13$ subjects per group. (C) Example images of GluN2B subunit of NMDAR single detection and Neg. cont. (D) Quantifications of GluN2B PLA signal. Two-sided Student's *t* test: $t = 0.224$ $df = 24$, $P = 0.8243$, $n = 13$ subjects per group. (E) Illustrative images of D2R-NMDAR heteromer detection by PLA and Neg. cont. (GluN2B antibody omitted). (F) Quantifications of D2R-NMDAR 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-NMDAR heteromerization for each sample from all individuals having suffered from psychostimulant use disorder. $R^2 = 0.3219$, $P = 0.0432$. (H) Same as in (G) for the Pearson correlation between GluN2B expression levels and D2R-NMDAR. $R^2 = 0.0087$, $P = 0.761$. (I) Quantifications of D2R-NMDAR PLA signal normalized to D2R expression levels for each subject. Two-sided Student's *t* test, $t = 2.882$ $df = 24$, $**P = 0.0082$, $n = 13$ subjects per group. Scale bars, 25 μm (A, C, and E). Error bars denote SEMs.

heteromers revealed their important role in controlling both the development and maintenance of the sensitizing and rewarding effects of cocaine. In agreement with these findings, we found that D2R-NMDAR heteromerization persisted through abstinence from cocaine. Moreover, this persistent heteromerization was specifically

observed in the NAC core, which has been identified as a common output structure of neuronal circuits involved in both cue- and drug-induced reinstatement (58). Since the optogenetic activation of D2R-MSNs in the NAC has been shown to preserve cocaine-induced locomotor sensitization but to blunt its expression after abstinence

(59), our results support a model by which inhibiting endogenous D2R-NMDAR interaction during abstinence hinders the persistence of cocaine-evoked responses by potentiating D2R-MSN activity. Since D2R-GluN2B heteromerization has been shown to mediate the D2R agonist-induced inhibition of NMDAR functions *ex vivo* (32), we reasoned that disrupting D2R-NMDAR interaction, by preventing the inhibitory effect of DA on NMDAR signaling, could artificially activate signaling pathways and transcription in D2R-MSN. To test this hypothesis, we studied expression levels of Δ FosB in D2R-MSN upon blockade of D2R-NMDAR interaction. Δ FosB expression has been used here as a reporter gene for the activation of signaling pathways and gene expression. We found that disrupting D2R-NMDAR heteromerization during an abstinence period was associated with an increase in Δ FosB in D2R-MSN upon reexposure to the drug. Because Δ FosB overexpression in D2R-MSN has been shown not to affect behavioral responses to cocaine (42–44), the increased Δ FosB expression in D2R-MSN that we observed upon blockade of D2R-NMDAR heteromerization is unlikely responsible for the alteration of the persistence of the sensitization and rewarding effects of cocaine CPP but rather reflects the ability of D2R-NMDAR to modulate cocaine-induced signaling in D2R-MSN. Nevertheless, our results strongly support that D2R-NMDAR heteromerization is a key molecular mechanism triggered by cocaine that alter signaling in D2R-MSN and contributes to the persistence of cocaine-evoked adaptations.

Notably, there exists another epitope within the IL3 of D2R (_{217RRRRKRR222}) that is involved in the interaction of D2R with A2AR (60). Furthermore, cocaine self-administration has been shown to trigger an increase in D2R-A2AR heteromerization in the NAc (61), which plays a functional role at the behavioral level (62). On the basis of these findings and as opposed to previous work targeting D2R-NMDAR heteromerization (32), we designed AAV-Tet-On-D2R-IL3 to express a fragment of D2R-IL3 that does not include the D2R-IL3 fragment responsible for D2R-A2AR interaction. This suggests that the inhibition of the development and persistence of cocaine-evoked adaptations that we observed are likely due to a direct inhibitory effect of AAV-Tet-On-D2R-IL3 on D2R-NMDAR interaction. However, because D2R binds to both NMDAR and A2AR, we cannot exclude the possibility that disrupting D2R-NMDAR interaction may indirectly modulate D2R-A2AR heteromerization. Regardless, our results strongly support D2R-NMDAR heteromers as molecular targets with a potential therapeutic value.

Direct manipulations of MSN activity have clearly revealed that D1R-MSN and D2R-MSN activation facilitates and blunts the development and maintenance phases of psychostimulant-induced behavioral adaptations, respectively (2). Notably, our findings that D1R-NMDAR and D2R-NMDAR heteromerization controls distinct phases of cocaine-induced locomotor sensitization highlight that these receptor complexes mediate discrete properties of MSN subpopulations and play complementary roles to mediate the full panel of cocaine-induced adaptations. In further support of specific functions of DA and glutamate receptor heteromers, we established that their roles in shaping reward processing depend on the nature of the reward since the disruption of either receptor heteromer blocked the development of cocaine-induced CPP but spared food-mediated CPP. Although the mechanisms underlying this selectivity to drug reward remain to be established, our findings suggest that targeting DA-glutamate receptor heteromers has the potential to preferentially alleviate pathological adaptations induced by drugs of abuse. In particular, the role for D2R-NMDAR heteromerization in maintaining cocaine-induced adaptations, combined with its lack

of implication in reward processing to a natural reinforcer, suggests that D2R-NMDAR heteromers are targets of choice from a translational standpoint. This first led us to investigate whether this heteromer subtype could be detected in postmortem human samples and modulated in subjects with a history of psychostimulant consumption.

Our PLA analysis revealed a strong reduction of D2R protein levels in the NAc of individuals with psychostimulant use disorder. This first observation of a decreased D2R protein expression in postmortem brain samples from individuals having suffered from psychostimulant misuse is consistent with the down-regulation of D2R mRNA levels that has been described after long-term cocaine exposure in rats (63). This finding could also partly account for the decrease in D2R binding readily observed with PET imaging in the striatum of subjects with psychostimulant use disorder (33, 48–51). Despite this down-regulation of D2R protein, the proportion of D2R forming heteromers with GluN2B subunits of NMDAR was threefold higher in samples from subjects with a history of psychostimulant misuse compared to control subjects. Notably, individuals with psychostimulant use disorder bearing the lowest D2R expression displayed the highest density of D2R-NMDAR. This raises questions regarding the underlying molecular mechanism of D2R-NMDAR heteromer formation in response to psychostimulant exposure in human. On the basis of our findings in mice that cocaine-induced D2R-NMDAR heteromerization depends on D2R stimulation, it is tempting to speculate that repeated increases of phasic DA levels resulting from recurrent psychostimulant consumption could be responsible for the higher D2R-NMDAR receptor proximity. By contrast, we observed a decreased D1R-NMDAR heteromerization in subjects with psychostimulant use disorder. This decrease might be linked to the transient nature of cocaine-induced D1R-NMDAR heteromerization that we identified in mice treated with cocaine and subjected to an abstinence period. In the case of human samples, although the history of drug use disorder was accurately characterized, we do not have information about when these individuals last consumed psychostimulants. Therefore, the decrease in D1R-NMDAR heteromers that we measured in subjects with a history of psychostimulant use disorder may result from the delay between the last drug consumption and the time of death. By contrast, the increase in D2R-NMDAR heteromerization that we observed in the ventral striatum of subjects with psychostimulant use disorder agrees with our finding that cocaine-induced D2R-NMDAR heteromerization in the NAc core of mice outlasts a 7-day abstinence period. Nonetheless, the increased D2R-NMDAR heteromerization that we observed in human samples from individuals with psychostimulant use disorder, together with interventional approaches in mice, emphasizes their roles in the persistence of cocaine's behavioral effects. These findings constitute an important breakthrough in our understanding of the molecular bases of cocaine-induced adaptations and highlight the potential benefit of targeting D2R-NMDAR heteromerization not only in the field of addiction but also potentially for multiple neuropsychiatric disorders associated with an imbalance of DA and glutamate transmission.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six-week-old C57BL/6J male mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). The animals were housed four per cage, in a 12-hour light/12-hour dark cycle, under 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% (w/v) NaCl].

9-*tert*-butyl dox hydrochloride (9TB-dox; tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) was dissolved in a saline solution containing dimethyl sulfoxide (DMSO; 5%) and Tween 20 (5%). SCH23390 (0.25 mg/kg) or eticlopride (0.5 mg/kg) dissolved in a saline solution [0.9% (w/v) NaCl] were administered 30 min before the challenge cocaine injection.

Viral constructions

All AAV recombinant genomes were packaged in serotype 9 capsids. AAV-Tet-On-GluN1C1 bicatrically expresses the fluorescent reporter protein RFP and the C1 cassette of the GluN1 subunit (₈₆₄DRKSGRAEPDPKKAATFRITSTLASSFKRRRSSKDT₉₀₀) upon dox treatment. The related control virus AAV-Tet-On-GluN1C1Δ expresses a truncated version of C1 that is deleted from a stretch of nine positively charged amino acids (₈₉₀SFKRRRSSK₈₉₈), which are required for D1R-GluN1 interaction (54). The AAV-Tet-On-D2R-IL3 encodes a sequence of the IL3 of the D2R (₂₂₅TKRSSRAFRA₂₃₄) interacting with GluN2B. The control AAV-Tet-On-D2R-scr expresses a scrambled sequence (KFARRTSASR) of the D2R-IL3 (full AAV sequences are available upon request). All Tet-On AAV were injected bilaterally by infusing 0.7 μl of a solution at 5.10¹⁵ viral genomes/ml per hemisphere for the NAc (2 μl for the dorsal striatum). The AAV-PPTA-Cre and AAV-PPE-Cre contain an expression cassette consisting of the Cre recombinase driven by the promoter of the PPTA gene or the PPE gene, which are specifically expressed in D1R-MSN and D2R-MSN, respectively (see fig. S3) (7, 39, 40). AAV PPTA-Cre or AAV-PPE-Cre were coinjected with the AAV-pCAG-DIO-eGFP-Woodchuck hepatitis virus Post-translational Regulatory Element (WPRE) (Upenn) expressing flexed eGFP under the cytomegalovirus/actin hybrid promoter (CAG). All viruses were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.001% pluronic.

Stereotaxic injections

Mice were anesthetized with ketamine (150 mg/kg) and xylazine (10 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 1 mm 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 μl/min using a 10-μl syringe (Hamilton 1700 series, PHYMEP, Paris, France) with a 200-μm 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.

Dox treatments

Three weeks after stereotaxic injections of Tet-On-AAV, the expression of the constructs was triggered by daily intraperitoneal

injection of 9TB-dox (10 mg/kg) for 4 days. To maintain expression, mice were then supplemented with a mix containing dox HCl (2 mg/ml), 9TB-dox HCl (80 μg/ml), and sucrose (1%) added in drinking water.

Behavioral testing

All behavioral tests were conducted during the light phase (8:00 to 19:00). Animals were randomly assigned to the saline or cocaine groups after viral injection. Before behavioral testing, mice were handled daily for 7 days in the experiment room. All mice were perfused with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) 24 hours after 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., nonbilateral 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 90 min 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 after injections. To study the consequences of uncoupling DAR from NMDAR on the maintenance of cocaine-induced locomotor sensitization, mice were treated for five consecutive days with saline or cocaine in the absence of dox. After the last injections, mice were supplemented with dox during an abstinence period, followed by a challenge injection of saline or cocaine. To analyze whether cocaine-treated groups injected with Tet-On viruses developed significant behavioral sensitization, we calculated a sensitization score defined as the locomotor at day 5 minus locomotion at day 1. Similarly, to assess the impact of Tet-On viruses on the maintenance of locomotor sensitization in the cocaine-treated groups, we calculated a sensitization score corresponding to the locomotion at day 12 (cocaine challenge) minus the locomotion at day 5. One-sample Student's *t* tests were used to determine whether sensitization scores obtained in each group were significantly different from 0, corresponding to the sensitization score of animals displaying an absence of sensitization.

Cocaine CPP

To study the impact of DAR-NMDAR heteromerization on 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 20 min. On day 1, mice were placed in the center of the apparatus and allowed to explore both compartments freely. 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 1 hour, 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 and 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-AAV that developed a preference for the cocaine-paired chamber in the absence of dox. Mice were then treated with dox until 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 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 before and during behavioral assessment. Experiments were performed in the same apparatus and conditions as for cocaine-induced CPP with the 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 1 hour, mice were placed in the other closed compartment. This was repeated on days 3 and 4. The test was performed on day 5.

Mouse tissue preparation

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Euthasol (100 mg/kg; Le Vet, Oudewater, The 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, postfixed overnight in 4% PFA, and stored at 4°C. Coronal sections (30 μm in thickness) were performed with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) and kept at –20°C in a cryoprotective solution containing 30% (v/v) ethylene glycol, 30% (v/v) glycerol, 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 and 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 50 mM NaF for 2 hours at room temperature (RT) before overnight 4°C incubation with primary antibodies (see Table 1) 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 Table 1). The anti-FosB antibody recognizes full-length FosB and ΔFosB, but at the time point studied (24 hours after cocaine), all FosB-immunoreactive protein represents ΔFosB (43). After three 5-min rinses in TBS, sections were incubated for 5 min with Hoechst (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).

Immunoblotting

Mice were euthanized by decapitation, and their heads were immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Microdiscs of NAc were punched out using disposable biopsy punches (1 mm in 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, and 0.5 M urea diluted in water. Protein concentrations were determined using a Bicinchoninic Acid (BCA) assay kit (Pierce, Rockford, IL). A fixed amount of protein (30 μg per lane) was separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (12%) before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 1 hour at RT in a blocking solution containing TBS with 0.1% Tween and 5% nonfat dry milk. Membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibodies (see Table 1). Membranes were then washed three times in TBS-Tween and then incubated for 1 hour at RT with secondary antibodies (see Table 1) coupled to horseradish peroxidase (HRP). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescent 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 ($n = 13$ per 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 (64).

Dissections of ventral striatum were performed with the guidance of a human brain atlas (65) 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, and 3 × 100%) for 1.5 hours each, followed by clearing in three changes of 100% xylene (2 hours and 2 × 1.5 hours). The samples were then infiltrated in three changes of molten paraffin, 3 hours each before embedding. Slices of 6 μm in thickness were then prepared with microtome at the histology facility of the ICM Institute (Paris).

Proximity ligation assay

PLA on mouse brain sections (30 μm in thickness) was performed in 48-well plates according to the manufacturer's instructions for free-floating sections. PLA on human postmortem paraffin-embedded tissue was performed on sections mounted on Superfrost plus slides (Thermo Fisher Scientific). Human caudate putamen sections (6 μm in thickness) 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 bright-field 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, sections were incubated for 1 hour at RT with blocking buffer (Duolink blocking buffer for PLA) and then with primary antibodies (see Table 1) diluted in the Duolink antibody dilution buffer overnight at 4°C. Anti-rat PLA plus and minus probes were made using the

Table 1. List of primary and secondary antibodies. IHC, immunohistochemistry; WB, Western blot; IgG, immunoglobulin G.

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 Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA, ref.: A11034	1:500
Rabbit monoclonal to phospho-Erk1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA; ref.: 43705	IHC	1:400	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, ref.: A11034	1:500
Rat monoclonal to D1R	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 D2R	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 Biotechnology; ref.: sc-48	IHC	1:500	Cy5 goat anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch; ref.: AB_2338013	1:1000

PLA Probemaker Kit (Sigma-Aldrich) with a goat anti-rat immunoglobulin G antibody (Jackson ImmunoResearch) according to the manufacturer's instructions. Immunofluorescent PLA and the remaining procedures for bright-field PLA were performed as previously described (31). For bright-field 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.

Image acquisition and analysis

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

For PLA image 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: minimum size, 6; maximum 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 versus D2R-MSN). RFP-positive cells that did not present any D1R-GluN1 or D2R-GluN2B PLA signal were discarded.

Mouse bright-field PLA images were taken using a microscope (Leica, DM4000) with a 63× objective. A minimum of six random fields per structure per mice were taken.

For human bright-field PLA, whole-slide images were taken using a Zeiss Axioscan with a 40× 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). Twenty-five regions of interest of 500 μm by 500 μm 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 bright-field PLA images were analyzed using an ImageJ homemade macro that uses the Find Maxima tool to detect the PLA punctate with prominence set to >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.

Neuronal survival

Neuronal survival was quantified manually on the basis of Hoechst-counterstained nuclei. Survival was defined as the percentage of viable neurons exhibiting large, uniform nuclei and even distribution of Hoechst among RFP-positive cells over RFP-positive cells classified as apoptotic on the basis of, at least, two of the following criteria: condensed nuclei, single chromatin clump, small nuclei size, non-circular nuclei shape, and increased Hoechst intensity.

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 on the basis of the presence of GFP driven by the coinjection of AAV-PPTA-Cre/AAV-pCAG-DIO-eGFP or AAV-PPE-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 a 63× objective with a pixel size of 65 nm and a z-step of 200 nm. For D2R-MSN, images were collected through a 40× objective with a pixel size of 95 nm and a z-step of 300 nm. The excitation wavelength was 488 nm for GFP and 561 nm for RFP, with an emission range of 500 to 550 nm and 570 to 650 nm, respectively. Images were acquired in sequential mode with a Hybrid detector (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 artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for slice preparation. Coronal 250- μ m slices containing the NAC were obtained in bubbled ice-cold 95% O₂/5% CO₂ aCSF containing 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 234 mM sucrose, and 26 mM NaHCO₃, using a HM650V vibratome (Microm, France). Slices were then incubated in aCSF containing 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 11 mM glucose, at 37°C for 1 hour, and then kept at RT. Slices were transferred and kept at 31°C in a recording chamber superfused with aCSF (2 ml/min) in the continuous presence of 50 μ M picrotoxin (dissolved in DMSO; Sigma-Aldrich, France) to block GABAergic transmission. Neurons were visualized by combined epifluorescent and infrared/differential interference contrast visualization using an Olympus upright microscope holding 5× and 40× 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). AMPAR/NMDAR ratio was assessed using an internal solution containing 130 mM CsCl, 4 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1.1 mM EGTA, 5 mM Hepes, 2 mM Na₂ adenosine 5'-triphosphate, 5 mM sodium creatine phosphate, 0.6 mM Na₃ guanosine 5'-triphosphate, and 0.1 mM 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 $V = +40$ mV in the absence and presence of the AMPAR antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione. In all cases, 30 consecutive EPSCs were averaged, and offline analyses were 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: $\tau_w = [(af \cdot \tau_f) + (as \cdot \tau_s)] / (af + as)$, where af and as are the relative amplitudes of the two exponential components and τ_f and τ_s are the corresponding time constants.

cAMP accumulation assay

Human embryonic kidney 293 cells stably expressing the D2R (66) were grown on polylysine (poly-D-lysine hydrobromide, Sigma-Aldrich) 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 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate, Gibco), and incubated for 5 hours. After transfection, cells were rinsed and wells were filled with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics to induce D2R expression [hygromycin (2 μ l/ml; Sigma-Aldrich), blasticidin (1.5 μ l/ml; ant-bl-1, Cayla InvivoGen), and tetracycline (1 μ l/ml; T7660-5g, Sigma-Aldrich)] and incubated overnight. Peptide expression was induced by addition of dox solution (1 μ g/ml), incubating for 48 hours. Following the dox treatment, cells were rinsed in DMEM before pretreatment with 1 mM 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 per well). After centrifugation at 600g for 10 min, protein concentration of supernatants was quantified by BCA (Uptima, Interchim). cAMP levels were determined in samples containing 10 μ g of protein. The accumulation of cAMP was measured using a cAMP Enzyme Immunoassay kit (Sigma-Aldrich) as described by the manufacturer using Victor3 (PerkinElmer) 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 means \pm SEM. Two-tailed Student's *t* test was used for the comparison of two independent groups. For more than two group comparison, one-way, two-way, or three-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Bonferroni 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.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abg5970>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

- C. Lüscher, R. C. Malenka, Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: From molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* **69**, 650–663 (2011).
- M. Salery, P. Trifilieff, J. Caboche, P. Vanhoutte, From signaling molecules to circuits and behaviors: Cell-type-specific adaptations to psychostimulant exposure in the striatum. *Biol. Psychiatry* **87**, 944–953 (2020).
- N. D. Volkow, M. Morales, The brain on drugs: From reward to addiction. *Cell* **162**, 712–725 (2015).
- S. E. Hyman, R. C. Malenka, E. J. Nestler, Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 565–598 (2006).
- J. Bertran-Gonzalez, C. Bosch, M. Maroteaux, M. Matamalas, D. Herve, E. Valjent, J.-A. Girault, Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* **28**, 5671–5685 (2008).
- S. M. Ferguson, D. Eskenazi, M. Ishikawa, M. J. Wanat, P. E. M. Phillips, Y. Dong, B. L. Roth, J. F. Neumaier, Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat. Neurosci.* **14**, 22–24 (2011).
- T. Hikida, K. Kimura, N. Wada, K. Funabiki, S. Nakanishi, Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* **66**, 896–907 (2010).
- A. V. Kravitz, L. D. Tye, A. C. Kreitzer, Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat. Neurosci.* **15**, 816–818 (2012).
- M. K. Lobo, H. E. Covington, D. Chaudhury, A. K. Friedman, H. Sun, D. Dames-Werno, D. M. Dietz, S. Zaman, J. W. Koo, P. J. Kennedy, E. Mouzon, M. Mogri, R. L. Neve, K. Deisseroth, M.-H. Han, E. J. Nestler, Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* **330**, 385–390 (2010).
- R. Bock, J. H. Shin, A. R. Kaplan, A. Dobi, E. Markey, P. F. Kramer, C. M. Gremel, C. H. Christensen, M. F. Adrover, V. A. Alvarez, Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat. Neurosci.* **16**, 632–638 (2013).
- P. F. Durieux, B. Bearzatto, S. Guiducci, T. Buch, A. Waisman, M. Zoli, S. N. Schiffmann, A. de Kerchove d'Exaerde, D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat. Neurosci.* **12**, 393–395 (2009).
- P. F. Durieux, S. N. Schiffmann, A. de Kerchove d'Exaerde, Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions: Dorsal striatum D1R- and D2R-neuron motor functions. *EMBO J.* **31**, 640–653 (2012).
- V. Pascoli, M. Turiault, C. Lüscher, Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* **481**, 71–75 (2012).
- V. Pascoli, J. Terrier, J. Espallergues, E. Valjent, E. C. O'Connor, C. Lüscher, Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* **509**, 459–464 (2014).
- V. Pascoli, A. Hiver, R. V. Zessen, M. Loureiro, R. Achargui, M. Harada, J. Flakowski, C. Lüscher, Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* **564**, 366–371 (2018).
- J. Terrier, C. Lüscher, V. Pascoli, 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).
- C. L. Heuser, R. D. Palmiter, Expression of mutant NMDA receptors in dopamine D1 receptor-containing cells prevents cocaine sensitization and decreases cocaine preference. *J. Neurosci.* **25**, 6651–6657 (2005).
- J. Schumann, R. Yaka, Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* **29**, 6955–6963 (2009).
- L. R. Beutler, M. J. Wanat, A. Quintana, E. Sanz, N. S. Bamford, L. S. Zweifel, R. D. Palmiter, Balanced NMDA receptor activity in dopamine D1 receptor (D1R)- and D2R-expressing medium spiny neurons is required for amphetamine sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4206–4211 (2011).
- V. Pascoli, A. Besnard, D. Hervé, C. Pagès, N. Heck, J.-A. Girault, J. Caboche, P. Vanhoutte, Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* **69**, 218–227 (2011).
- V. Pascoli, E. Cahill, F. Bellivier, J. Caboche, P. Vanhoutte, Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: A signal toward pathological adaptation. *Biol. Psychiatry* **76**, 917–926 (2014).
- M. E. Joffe, S. R. Vitter, B. A. Grueter, GluN1 deletions in D1- and A2A-expressing cell types reveal distinct modes of behavioral regulation. *Neuropharmacology* **112**, 172–180 (2017).
- A. Andrianarivelo, E. Saint-Jour, R. Walle, P. Trifilieff, P. Vanhoutte, Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology* **152**, 42–50 (2019).
- D. O. Borroto-Escuela, J. Carlsson, P. Ambrogini, M. Narváez, K. Wydra, A. O. Tarakanov, X. Li, C. Millón, L. Ferraro, R. Cuppini, S. Tanganelli, F. Liu, M. Filip, Z. Diaz-Cabiale, K. Fuxe, Understanding the role of GPCR heteroreceptor complexes in modulating the brain networks in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 37 (2017).
- S. Ferré, C. Quiroz, M. Orru, X. Guitart, G. Navarro, A. Cortés, V. Casadó, E. I. Canela, C. Lluis, R. Franco, Adenosine A(2A) receptors and A(2A) receptor heteromers as key players in striatal function. *Front. Neuroanat.* **5**, 36 (2011).
- K. Fuxe, D. O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, M. Palkovits, A. O. Tarakanov, F. Ciruela, L. F. Agnati, Moonlighting proteins and protein-protein interactions as neurotherapeutic targets in the G-protein-coupled receptor field. *Neuropsychopharmacology* **39**, 131–155 (2014).
- M. Wang, A. H. Wong, F. Liu, Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Res.* **1476**, 154–163 (2012).
- F. J. S. Lee, S. Xue, L. Pei, B. Vukusic, N. Chéry, Y. Wang, Y. T. Wang, H. B. Niznik, X. Yu, F. Liu, Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**, 219–230 (2002).
- L. Pei, F. J. S. Lee, A. Moszczynska, B. Vukusic, F. Liu, Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J. Neurosci.* **24**, 1149–1158 (2004).
- C. Fiorentini, F. Gardoni, P. Spano, M. D. Luca, C. Missale, Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 20196–20202 (2003).
- E. Cahill, V. Pascoli, P. Trifilieff, D. Savoldi, V. Kappès, C. Lüscher, J. Caboche, P. Vanhoutte, 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).
- X.-Y. Liu, X.-P. Chu, L.-M. Mao, M. Wang, H.-X. Lan, M.-H. Li, G.-C. Zhang, N. K. Parelkar, E. E. Fibuch, M. Haines, K. A. Neve, F. Liu, Z.-G. Xiong, J. Q. Wang, Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* **52**, 897–909 (2006).
- P. Trifilieff, F. Ducrocq, S. van der Veldt, D. Martinez, Blunted dopamine transmission in addiction: Potential mechanisms and implications for behavior. *Semin. Nucl. Med.* **47**, 64–74 (2017).
- P. Trifilieff, M.-L. Rives, E. Urizar, R. Piskorski, H. Vishwasrao, J. Castrillon, C. Schmauss, M. Slättman, M. Gullberg, J. Javitch, Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: Endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* **51**, 111–118 (2011).
- A. S. Woods, F. Ciruela, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluis, R. Franco, S. Ferré, Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J. Mol. Neurosci.* **26**, 125–132 (2005).
- T. E. Robinson, K. C. Berridge, The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* **18**, 247–291 (1993).
- W.-D. Yao, R. R. Gainetdinov, M. I. Arbuckle, T. D. Sotnikova, M. Cyr, J.-M. Beaulieu, G. E. Torres, S. G. N. Grant, M. G. Caron, Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* **41**, 625–638 (2004).
- J. Zhang, T.-X. Xu, P. J. Hallett, M. Watanabe, S. G. N. Grant, O. Isacson, W.-D. Yao, PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the D1/PSD-95/NMDA receptor complex. *J. Neurosci.* **29**, 2948–2960 (2009).
- M. Dos Santos, M. Salery, B. Forget, M. A. Garcia Perez, S. Betuing, T. Boudier, P. Vanhoutte, J. Caboche, N. Heck, Rapid synaptogenesis in the nucleus accumbens is induced by a single cocaine administration and stabilized by mitogen-activated protein kinase interacting kinase-1 activity. *Biol. Psychiatry* **82**, 806–818 (2017).
- S. Yagishita, A. Hayashi-Takagi, G. C. R. Ellis-Davies, H. Urakubo, S. Ishii, H. Kasai, A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* **345**, 1616–1620 (2014).
- E. J. Nestler, Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 119–128 (2001).
- M. B. Kelz, J. Chen, W. A. Carlezon, K. Whisler, L. Gilden, A. M. Beckmann, C. Steffen, Y.-J. Zhang, L. Marotti, D. W. Self, T. Tkatch, G. Baranaukas, D. J. Surmeier, R. L. Neve, R. S. Duman, M. R. Picciotto, E. J. Nestler, Expression of the transcription factor Δ FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**, 272–276 (1999).
- M. K. Lobo, S. Zaman, D. M. Dames-Werno, J. W. Koo, R. C. Bagot, J. A. DiNieri, A. Nugent, E. Finkel, D. Chaudhury, R. Chandra, E. Riberio, J. Rabkin, E. Mouzon, R. Cacho, J. F. Cheer, M.-H. Han, D. M. Dietz, D. W. Self, Y. L. Hurd, V. Vialou, E. J. Nestler, Δ FosB

- induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *J. Neurosci.* **33**, 18381–18395 (2013).
44. B. A. Grueter, A. J. Robison, R. L. Neve, E. J. Nestler, R. C. Malenka, Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1923–1928 (2013).
 45. J. Kim, B.-H. Park, J. H. Lee, S. K. Park, J.-H. Kim, Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. *Biol. Psychiatry* **69**, 1026–1034 (2011).
 46. Y. Zhu, J. Mészáros, R. Walle, R. Fan, Z. Sun, A. J. Dwork, P. Trifilieff, J. A. Javitch, Detecting G protein-coupled receptor complexes in postmortem human brain with proximity ligation assay and a Bayesian classifier. *Biotechniques* **68**, 122–129 (2019).
 47. Y. Zhu, A. J. Dwork, P. Trifilieff, J. A. Javitch, Detection of G protein-coupled receptor complexes in postmortem human brain by proximity ligation assay. *Curr. Protoc. Neurosci.* **91**, e86 (2020).
 48. G. F. Koob, N. D. Volkow, Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* **3**, 760–773 (2016).
 49. N. D. Volkow, J. S. Fowler, A. P. Wolf, D. Schlyer, C. Y. Shiu, R. Alpert, S. L. Dewey, J. Logan, B. Bendriem, D. Christman, Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am. J. Psychiatry* **147**, 719–724 (1990).
 50. N. D. Volkow, G.-J. Wang, J. S. Fowler, J. Logan, S. J. Gatley, A. Gifford, R. Hitzemann, Y.-S. Ding, N. Pappas, Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *AJP* **156**, 1440–1443 (1999).
 51. N. D. Volkow, G.-J. Wang, J. S. Fowler, F. Telang, Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 15037–15042 (2011).
 52. M. Creed, N. R. Ntamati, R. Chandra, M. K. Lobo, C. Lüscher, Convergence of reinforcing and anhedonic cocaine effects in the ventral pallidum. *Neuron* **92**, 214–226 (2016).
 53. A. F. MacAskill, J. M. Cassel, A. G. Carter, Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* **17**, 1198–1207 (2014).
 54. M. K. Lobo, E. J. Nestler, The striatal balancing act in drug addiction: Distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front. Neuroanat.* **5**, 41 (2011).
 55. P. Sun, J. Wang, W. Gu, W. Cheng, G. Jin, E. Friedman, J. Zheng, X. Zhen, PSD-95 regulates D1 dopamine receptor resensitization, but not receptor-mediated Gs-protein activation. *Cell Res.* **19**, 612–624 (2009).
 56. P. Paoletti, C. Bellone, Q. Zhou, NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 383–400 (2013).
 57. A. L. Frederick, H. Yano, P. Trifilieff, H. D. Vishwasrao, D. Biezonski, J. Mészáros, E. Urizar, D. R. Sibley, C. Kellendonk, K. C. Sonntag, D. L. Graham, R. J. Colbran, G. D. Stanwood, J. A. Javitch, Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Mol. Psychiatry* **20**, 1373–1385 (2015).
 58. P. W. Kalivas, K. McFarland, Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **168**, 44–56 (2003).
 59. S. S. Song, B. J. Kang, L. Wen, H. J. Lee, H. Sim, T. H. Kim, S. Yoon, B.-J. Yoon, G. J. Augustine, J.-H. Baik, Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization. *Front. Behav. Neurosci.* **8**, 336 (2014).
 60. F. Ciruela, J. Burgueño, V. Casadó, M. Canals, D. Marcellino, S. R. Goldberg, M. Bader, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferré, A. S. Woods, Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope–epitope electrostatic interactions between adenosine A_{2A} and dopamine D_2 receptors. *Anal. Chem.* **76**, 5354–5363 (2004).
 61. D. O. Borroto-Escuela, M. Narváez, K. Wydra, J. Pintsuk, L. Pinton, A. Jimenez-Beristain, M. Di Palma, J. Jastrzębska, M. Filip, K. Fuxe, 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 (2017).
 62. D. O. Borroto-Escuela, K. Wydra, X. Li, D. Rodríguez, J. Carlsson, J. Jastrzębska, M. Filip, K. Fuxe, Disruption of A2AR-D2R heteroreceptor complexes after A2AR transmembrane 5 peptide administration enhances cocaine self-administration in rats. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7038–7048 (2018).
 63. D. Belin, A. Belin-Rauscent, J. E. Murray, B. J. Everitt, Addiction: Failure of control over maladaptive incentive habits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 564–572 (2013).
 64. A. Dumais, A. D. Lesage, M. Alda, G. Rouleau, M. Dumont, N. Chawky, M. Roy, J. J. Mann, C. Benkelfat, G. Turecki, Risk factors for suicide completion in major depression: A case-control study of impulsive and aggressive behaviors in men. *AJP* **162**, 2116–2124 (2005).
 65. J. K. Mai, G. Paxinos, T. Voss, *Atlas of the Human Brain* (Elsevier, Academic Press, ed. 3, 2008).
 66. M. Michino, P. Donthamsetti, T. Beuming, A. Banala, L. Duan, T. Roux, Y. Han, E. Trinquet, A. H. Newman, J. A. Javitch, L. Shi, 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).
- Acknowledgments:** We would like to thank the imaging facility of the IBPS and the histology facility of the Institut du Cerveau et de Moëlle épinière (ICM). **Funding:** This work was supported by the CNRS; the 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., and ANR-10-IDEX-03-02 and ANR-16-CE16-0022 to P.T.; the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); DPA20140629798 to J.C. and DEQ20180339159 to J.B.); Institut de Recherche en Santé publique (IReSP) Aviesan APP-addiction 2019 (to P.V., P.T., and 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.); NIH grant MH54137 (to J.A.J.); and the Hope for Depression Research Foundation (to J.A.J.). The DBCBB is funded by platform support grants from the RQSHA and HBHL (CFREF). A.A. and R.W. are recipients of PhD fellowships from the French Ministry of Research. A.P. is a 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 contributions:** A.A. performed most PLA, viral injections, behavioral studies, immunohistochemistry, confocal imaging, and biochemistry and statistical analysis with the help of E.S.-J., M.-C.A., V.K., S.B., V.O., and R.W. Dendritic spine 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.-P.B. and produced by C.J. and A.-P.B., and cAMP assays were performed by V.D.S.-P. and A.P. G.T. and N.M. obtained, characterized, and provided human brain samples. Y.Z. and J.A.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, which was edited by the other authors. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.
- Submitted 15 January 2021
Accepted 30 August 2021
Published 20 October 2021
10.1126/sciadv.abg5970
- Citation:** A. Andrianarivelo, E. Saint-Jour, P. Pousinha, S. P. Fernandez, A. Petitbon, V. De Smedt-Peyrusse, N. Heck, V. Ortiz, M.-C. Allichon, V. Kappès, S. Betuing, R. Walle, Y. Zhu, C. Joséphine, A.-P. Bemelmans, G. Turecki, N. Mechawar, J. A. Javitch, J. Caboche, P. Trifilieff, J. Barik, P. Vanhoutte, Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Sci. Adv.* **7**, eabg5970 (2021).

Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing

Andry Andrianarivelo, Estefani Saint-Jour, Paula Pousinha, Sebastian P. Fernandez, Anna Petitbon, Veronique De Smedt-Peyrusse, Nicolas Heck, Vanesa Ortiz, Marie-Charlotte Allichon, Vincent Kapps, Sandrine Betuing, Roman Walle, Ying Zhu, Charlene Josphine, Alexis-Pierre Bemelmans, Gustavo Turecki, Naguib Mechawar, Jonathan A. Javitch, Jocelyne Caboche, Pierre Trifilieff, Jacques Barik, and Peter Vanhoutte

Sci. Adv., **7** (43), eabg5970.
DOI: 10.1126/sciadv.abg5970

View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abg5970>

Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

Science Advances (ISSN) is published by the American Association for the Advancement of Science. 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS.
Copyright © 2021 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).

ARTICLE OPEN



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

Benoit Forget^{1,2,3,4,5,13}, Elena Martin Garcia⁶, Arthur Godino^{1,2,3,4,7}, Laura Domingo Rodriguez⁶, Vincent Kappes^{1,2,3,4}, Pierre Poirier^{1,2,3,4}, Andry Andrianarivelo^{1,2,3,4,8,9,10}, Eric Senabre Marchan⁶, Marie-Charlotte Allichon^{1,2,3,4}, Mélanie Marias^{1,2,3,4}, Peter Vanhoutte^{1,2,3,4}, Jean-Antoine Girault^{2,11,12}, Rafael Maldonado⁶ and Jocelyne Caboche^{1,2,3,4,13}

© The Author(s) 2021

The persistent and experience-dependent nature of drug addiction may result in part from epigenetic alterations, including non-coding micro-RNAs (miRNAs), 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-SPNs) and D2 (D2-SPNs) dopamine receptor, and display distinct but complementary functions in drug-evoked responses. However, a cell-type-specific role for miRNAs 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 sustained cocaine exposure in mice and showed that these selected miRNAs were preferentially upregulated in the NAc. We focused on miR-1 considering the important role of some of its predicted mRNA targets, *Fosb* and *Npas4*, in the effects of cocaine. We validated these targets in vitro and in vivo. We explored the potential of miR-1 to regulate cocaine-induced behavior by overexpressing it in specific striatal cell populations. In DS D1-SPNs miR-1 overexpression downregulated *Fosb* and *Npas4* and reduced cocaine-induced CPP reinstatement, but increased cue-induced cocaine seeking. In DS D2-SPNs miR-1 overexpression reduced the motivation to self-administer cocaine. Our results indicate a role of miR-1 and its target genes, *Fosb* and *Npas4*, in these behaviors and highlight a precise cell-type- and region-specific modulatory role of miR-1, illustrating the importance of cell-specific investigations.

Molecular Psychiatry (2022) 27:918–928; <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01328-2>

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) neurons of the ventral tegmental area (VTA) projecting onto the ventral part of the striatum, the nucleus accumbens (NAc), and the prefrontal cortex [2, 3]. The striatum plays crucial roles in diverse behavioral processes including 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 SPNs 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-SPNs represent the “direct pathway”, which activation facilitates the initiation and execution of movement, while the activation of 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 activation of the direct pathway promoting 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-SPNs 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 (SA) [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

¹Neuroscience Paris Seine, Institut de Biologie Paris-Seine, Paris, France. ²Sorbonne Université, Faculty of Sciences, Paris, France. ³CNRS UMR8246, Paris, France. ⁴INSERM U1130, Paris, France. ⁵Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, rue du Docteur Roux, Paris, France. ⁶Laboratory of Neuropharmacology, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain. ⁷Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York 10029, USA. ⁸Saint Pères Paris Institute for the Neuroscience, Paris, France. ⁹University of Paris Descartes, Paris, France. ¹⁰CNRS UMR8118, Paris, France. ¹¹Institut du Fer à Moulin, Paris, France. ¹²INSERM UMR-S1270, Paris, France. ¹³These authors contributed equally: Benoit Forget, Jocelyne Caboche. ✉email: benoit.forget@pasteur.fr; jocelyne.caboche@upmc.fr

Received: 14 May 2020 Revised: 16 September 2021 Accepted: 28 September 2021
Published online: 16 November 2021

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 groups 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, target mRNA transcripts per miRNA, thereby inducing mRNA destabilization and subsequent degradation and/or repression of mRNA translation [23]. Changes in miRNAs expression levels have been shown to play a role in multiple neuronal functions and are 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 of Ago2 [27], 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-SPNs. 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 set of selected miRNAs, proposed to play a key role in cocaine action or neuronal plasticity after sub-chronic cocaine administrations [24, 25, 31]. We observed an increase in the expression of several miRNAs, including miR-1, in the Nacc but not the DS. MiR-1 targets included 2 mRNAs involved in addiction processes: *fosb* and *npas4*. Interestingly, *fosb* and *npas4* mRNA levels were upregulated by cocaine in the DS but not the NAcc, leading us to hypothesize that the absence of miR-1 upregulation in the DS might allow their induction in that area, while their induction was blunted by miR-1 in the NAc. In line with this homeostatic hypothesis, we next investigated the effect of miR-1 overexpression in D1- or D2-SPNs of the NAc or DS in multiple behaviors related to cocaine addiction by using a validated viral strategy [32–34]. We found a key role of miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS in 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 SA. We also observed a reduction of motivation for cocaine SA after miR-1 overexpression in D2-SPNs of the DS. 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. Statistical details are given in Supplementary Materials.

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-SPNs or D2-SPNs of the striatum, we used a combination of AAVs (AAV9-PP2A-Cre or AAV9-PPE-Cre, respectively; titers: 1×10^{12} in combination with AAV9-miR-1^{fllox} or AAV9-miR-Scr^{fllox} 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/10 g), 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 oligodT 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 Fig. 1a, 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-negative control from Qiagen (miScript miRNA Mimics). The protocol used is described in <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 3'UTR of mRNA of interest).

Cocaine-induced behavioral responses

The *locomotor activity* and its sensitization were evaluated using a circular corridor (actimeter) [36]. The *cocaine-induced conditioned place preference* (CPP), its extinction and reinstatement were 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 (see supplementary methods for more details). Two of the three chambers were used for the conditioning and distinguished by different floor textures and wall 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.

The operant self-administration of cocaine experiments were conducted in mouse operant chambers (Model ENV307A-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) is 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 two 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.

RESULTS

Ten day 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 one-week repeated treatment with cocaine mimicking a behavioral sensitization procedure (Fig. 1a) known to induce modifications in miRNAs expression [31]. The sequences of all miRNA primers used are presented in Supplementary Figure 1a. Interestingly, the repeated exposure to cocaine did not significantly alter miRNA levels in the DS but induced an upregulation of 11 of these 14 miRNAs in the NAc (Fig. 1b, 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 (Fig. 1b, c, right panels), indicating that the observed miRNA regulation did not result from alterations in the general miRNA processing machinery at the mRNA level.

In order to predict cocaine-related target genes of the selected miRNAs, we used a combination of databases, including miRBase, Miranda, TargetScan and Tarbase, crossed with literature data on cocaine addiction. We identified 9 potential interesting targets: *Bdnf*, *Fosb*, *Npas4*, *Gria2*, *Gria3*, *Grin2b*, *Grin3*, *Pi3k*, *Drd1* and *Mef2c* (Fig. 1d) and studied expression levels of these mRNAs in the DS and NAc after our protocol of sustained 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 where an increase in *Bdnf* expression was found (Fig. 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 upregulation of *FosB* and *Npas4* mRNAs by cocaine in the NAc might be due to cocaine-induced upregulation 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 potentially targeted both *fosB* and *npas4* mRNAs (Fig. 1d), which are key players in cocaine-induced long-term adaptations [39, 40]. We experimentally tested whether these potential targets were directly bound by miR-1 (Fig. 2) using a luciferase reporter assay with constructs containing either *FosB*, *Npas4* mRNA 3'UTRs (Fig. 2a, left panel), or the *Bdnf* 3'UTR as a positive control [41]. We observed a significant decrease in luciferase activity in HEK cells expressing the pmirGlo plasmid encoding the 3' UTR of *Bdnf*, *FosB* or *Npas4* in the presence of a mimic-miR-1 when compared to the negative miR-control (Fig. 2a, right panels). We thus validated in vitro that the 3'UTR of *Bdnf*, *FosB* and *Npas4* is directly targeted by miR-1.

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-SPNs or D2R-SPNs. We used a combination of two AAVs, with one expressing miR-1 in a Cre recombinase-dependent manner and the other one expressing Cre under a cell-type-specific promoter (PPE-Cre and PPTA-Cre, expressed in D1R-SPNs and D2R-SPNs respectively) as previously validated [32–34] (Fig. 2b, e, see also Supplementary Fig. 2a, b). As compared to the control group (injected with an AAV expressing scrambled RNA, Scr) we found a marked increase in miR-1 levels after overexpression of miR-1 in D1R- or D2R-SPNs in either the DS (Fig. 2c, f) or the NAc (Fig. 2d, g), with a concomitant decrease in the expression of *Fosb* and *Npas4* mRNAs, which was significant in several cases (Fig. 2c–g). We thus confirmed 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 [42], 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 Fig. 3a, b).

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

Having established the inhibitory role of miR-1 on *Fosb* and *Npas4* mRNA expression levels, we investigated the potential role of miR-1 overexpression on behavioral adaptations to cocaine. We specifically overexpressed miR-1 in D1- or D2-SPNs in regions where it is induced by cocaine (NAc) or not (DS). We first studied the consequences of this overexpression on cocaine-induced locomotor sensitization (15 mg/kg) (Supplementary Fig. 4a–e). The overexpression of miR-1 in either D1-SPNs or in D2-SPNs of the NAc or DS did not modify cocaine-induced locomotor activity or its sensitization (Supplementary Fig. 4b–e), indicating that miR-1 and its targets are not critical for the sensitizing effects of cocaine.

Cell-type- and region-specific effects of miR-1 in cocaine-induced conditioned place preference

We then measured the effects of cell-type-specific overexpression of miR-1 on the rewarding properties of cocaine using the cocaine-induced conditioned place preference (CPP) paradigm, which can be used as a proxy for the rewarding properties of cocaine. Overexpression of miR-1 in D1-SPNs of the DS did not alter cocaine-induced CPP (Fig. 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-SPNs of the DS did not modify CPP extinction (Fig. 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 (Fig. 3a, right panel).

We measured the levels of miR-1 and its target genes in the DS of these mice 1 h 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 (Fig. 3b, left panel). miR-1 overexpression in D1-SPNs blunted *Fosb* and *Npas4* mRNA upregulation observed in the control scramble group after cocaine-induced reinstatement of CPP (Fig. 3b, right panel). miR-1 overexpression in D1-SPNs of the NAc did not alter the development of cocaine-induced CPP, nor its extinction and cocaine-induced reinstatement (Fig. 3c). As shown in Fig. 4a, b, the overexpression of miR-1 in D2-SPNs of the DS or NAc had no consequence on cocaine-induced CPP, extinction or cocaine-induced reinstatement. These results indicate that miR-1-overexpression in DS D1-SPNs may specifically alter cocaine-induced CPP reinstatement, indicating a role of miR-1 targeting these genes in this behavior.

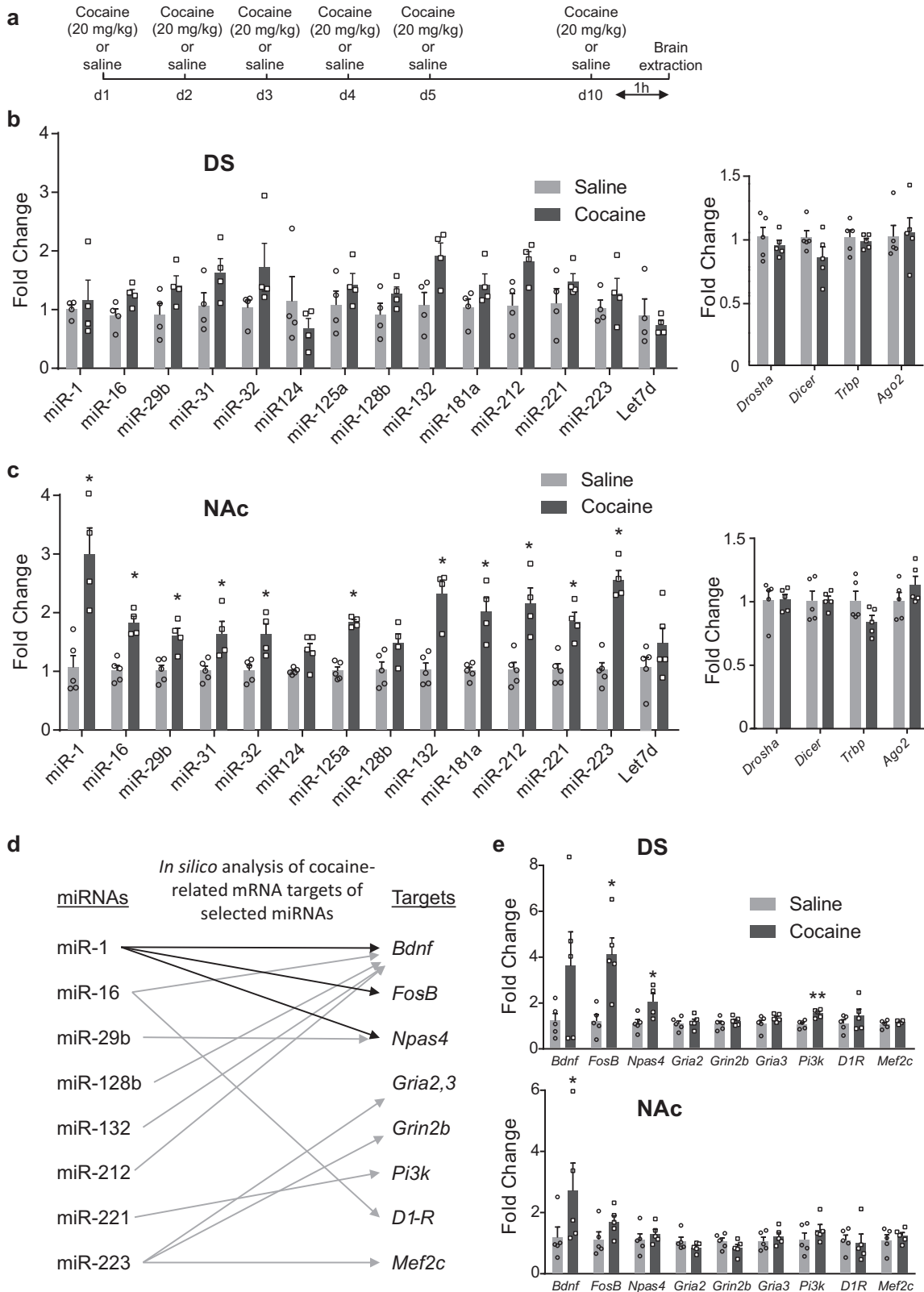


Fig. 1 A set of miRNAs is upregulated in the ventral (NAC), but not the dorsal (DS), striatum after sub-chronic treatment with cocaine. **a** Schematic representation of the timing of cocaine (20 mg/kg) or saline administrations and brain extraction. **b, c** Expression levels of miRNAs (left panels) and mRNAs involved in miRNA processing (right panels) were analyzed in the DS (**b**) and the NAC (**c**) one hour after the last injection of cocaine or saline on day 10. **d** *In silico* analysis of cocaine-related targets of miRNAs upregulated in the NAC, as indicated in (**c**). **e** Expression of predicted mRNA targets one hour after the last injection of cocaine or saline on day 10, in the DS (upper panel) or the NAC (lower panel). **b, c, e** Mean \pm SEM are represented. Mann–Whitney tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when comparing saline and cocaine groups.

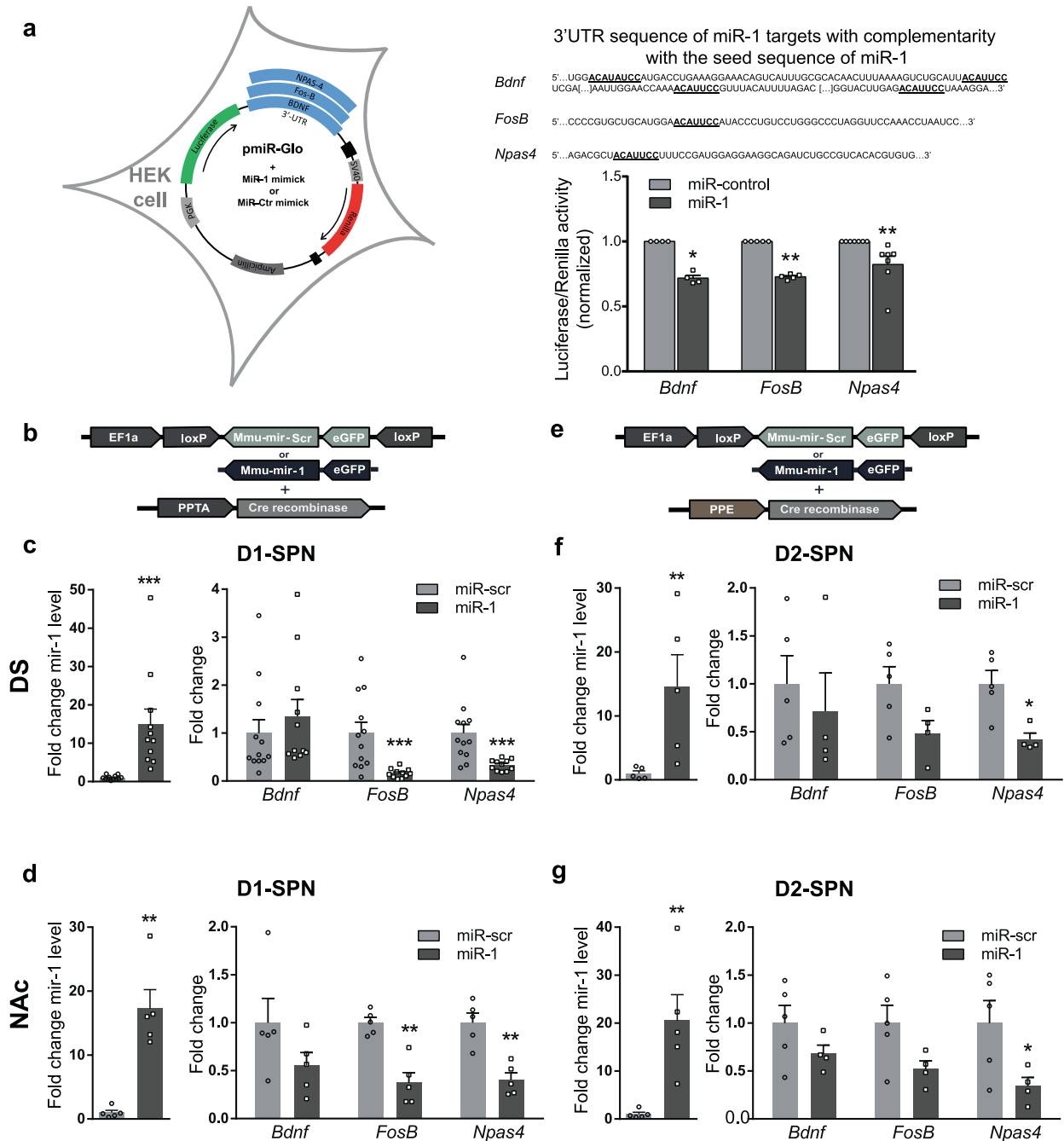


Fig. 2 Validation of miR-1 targets. **a** Left panel: schematic representation of the pmir-Glo constructs used in HEK cells. Right Panel, up: 3'UTR sequences of *bdnf*, *fosB* and *npas4* mRNAs. Bold and underlined nucleotides represent complementarity with the seed sequence of miR-1; lower part: normalized Luciferase/Renilla activity of pmir-Glo plasmid with *bdnf*, *fosB* and *npas4* 3'UTRs mRNAs in the presence of miRNA mimics for miR-1 (black bars) or miR-control (gray bars). **b–d** overexpression of miR-1 in D1-SPN. **b** representation of the combination of AAVs to infect D1-SPNs. **c**, **d** normalized fold changes in expression of miR-1 (over miR-scr condition) (left panels) and *bdnf*, *fos-B* or *npas4* mRNA (right panels) after viral injection of miR-1 or miR-scr sequences in D1-SPNs of the DS (**c**) or the NAc (**d**) of mice. **e–g** overexpression of miR-1 in D2-SPNs. **e** representation of the combination of AAVs to infect D2-SPNs. **f**, **g** normalized fold changes in expression of miR-1 (over miR-scr condition) (left panels) and *bdnf*, *fos-B* or *npas4* mRNA (right panels) after viral injection of miR-1 or miR-scr sequences in D2-SPNs of the DS (**f**) or the NAc (**g**) of mice. **a–g** Mean \pm SEM are represented. Mann–Whitney tests: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Cocaine self-administration, extinction and reinstatement after miR-1 overexpression in D1- or D2-SPNs of the DS of mice

We then investigated whether miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS altered cocaine SA. MiR-1 overexpression in DS D1-SPNs preserved the acquisition of SA, the motivation to self-administer cocaine assessed in a progressive ratio (PR) schedule of

reinforcement (Fig. 5a, b), and the extinction of this behavior (Fig. 5c). By contrast, miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS induced a significant increased cue-induced reinstatement of cocaine seeking (Fig. 5d). MiR-1 overexpression in D2-SPNs of the DS did not alter the acquisition of cocaine-SA (Fig. 5e). Interestingly, it reduced the breaking point for cocaine-SA under PR schedule of reinforcement (Fig. 5f, showing a reduced motivation

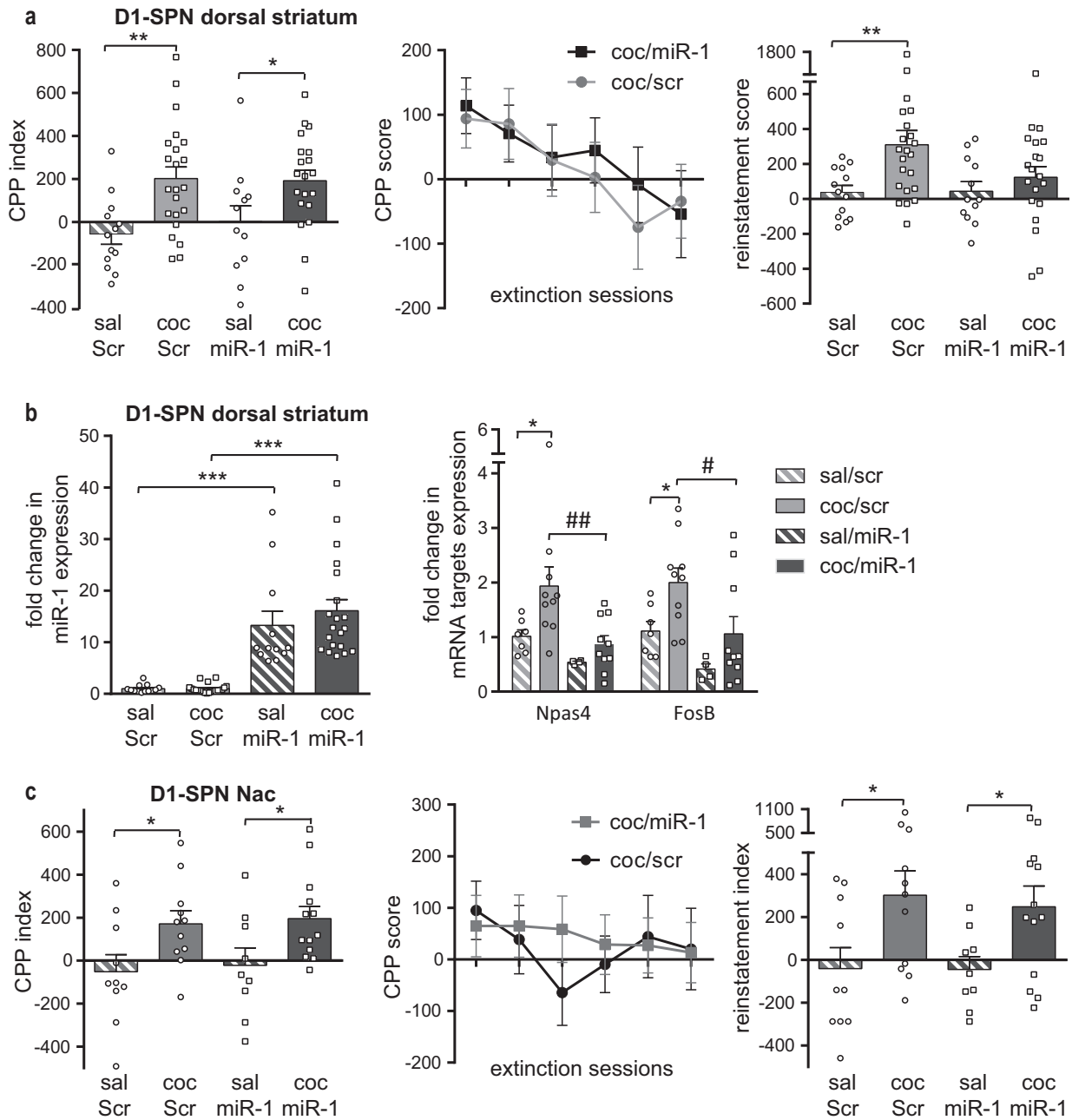


Fig. 3 Cocaine-induced conditioned place preference (CPP) and relapse in mice after miR-1 overexpression in D1-SPNs of the DS or NAc. **a–b** overexpression of miR-1 in D1-SPNs of the dorsal striatum. **a** Left panel: CPP after miR-1 overexpression in DS D1-SPNs. The CPP index is the difference of CPP 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 overexpression 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 after cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in mice with miR-1 or miR-Scr overexpression in D1-SPN of the DS. Right panel: normalized fold changes of expression levels of *npas4* and *fosB* mRNA after cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in mice with miR-1 overexpression 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** overexpression of miR-1 in D1-SPNs of the NAc. Left panel: CPP after miR-1 overexpression in D1-SPN of the NAc of mice. The CPP index is the difference of CPP score between the pretest and the test. Middle panel: extinction sessions for cocaine/miR-Scr and cocaine/miR-1 groups. Right panel: Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction in mice with miR-1 overexpression in D1-SPN of the NAc. Bonferroni's multiple comparison tests: * $p < 0.05$. **a–c** Mean and SEM are represented.

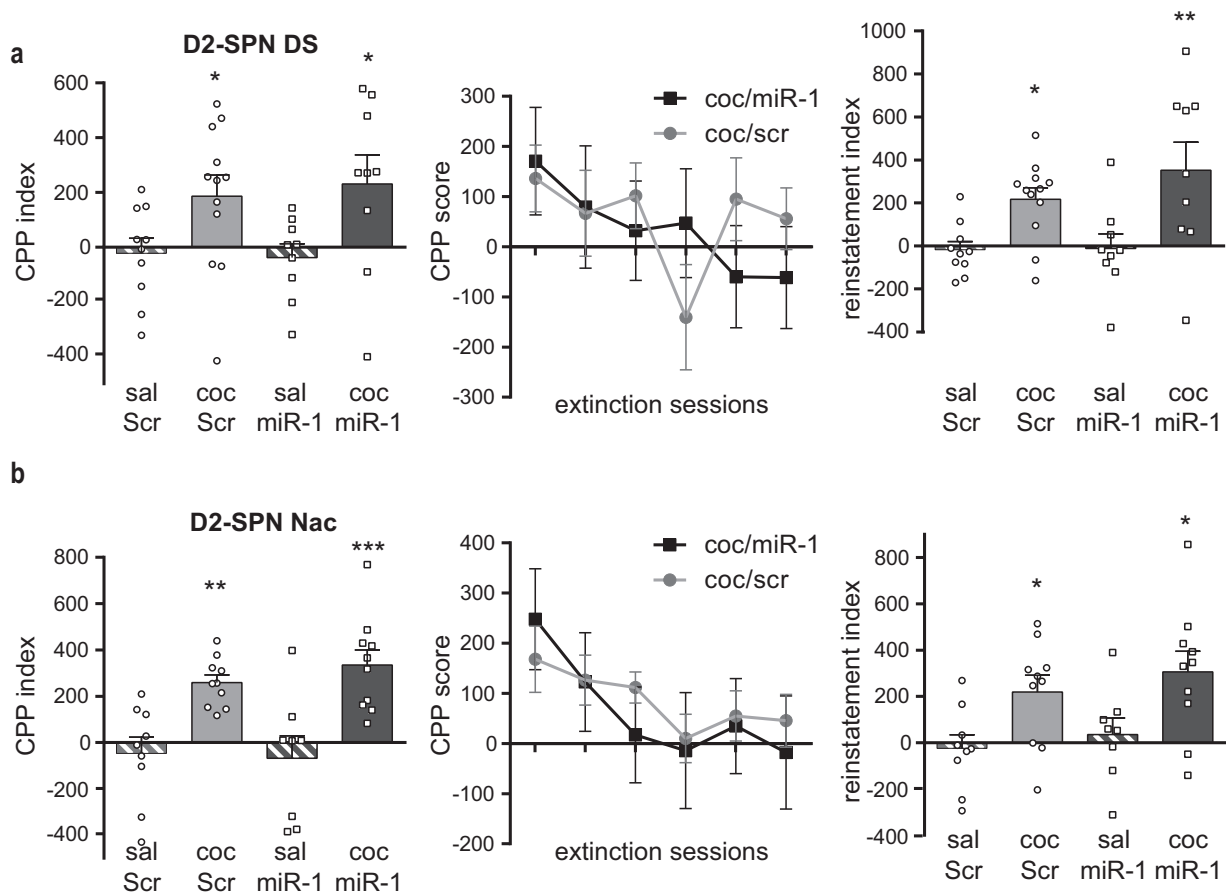


Fig. 4 Cocaine-induced conditioned place preference and relapse after miR-1 overexpression in D2-SPN of the dorsal striatum or NAc of mice. **a** miR-1 overexpression in D2-SPN of the dorsal striatum (DS) of mice. Left panel: CPP. The 2-way ANOVA performed on the CPP index indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction. Middle panel: extinction sessions for coc/ Scr and coc/miR-1 groups. The 2way ANOVA indicated a significant effect of session but not of AAV and no interaction. Right panel: Cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction. 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** miR-1 overexpression in D2-SPN of the NAc of mice. Left panel: CPP. 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. The two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment but not of AAV and no interaction. **a, b** Mean \pm SEM are represented. Post-hoc Bonferroni's multiple comparison tests * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

to self-administer cocaine-SA upon miR-1 overexpression in D2-SPN of the DS. In contrast to what we observed in D1-SPNs, miR-1 overexpression in D2-SPNs had no effect on SA extinction (Fig. 5g) or cue-induced reinstatement of cocaine seeking (Fig. 5h). Altogether these results establish a cell-type-specific function of miR-1 and its target genes in the DS in controlling distinct components of cocaine-adaptative behaviors.

DISCUSSION

Our data show that miR-1 is upregulated 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-SPNs of the DS decreases cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in a CPP paradigm, but increases cue-induced reinstatement of cocaine seeking in a SA protocol. In addition, overexpression of miR-1 in D2-SPNs of the DS reduces the breaking point for cocaine-SA under a progressive ratio schedule of reinforcement. These results unveil the modulatory capacity of miR-1, and

suggest that its target genes in DS neurons are involved in mediating specific aspects of cocaine-induced behavior.

Multiple miRNAs were reported to be modulated by cocaine [26]. In a miRNA profiling study, a panel of miRNAs was either up- or downregulated by prolonged cocaine exposure [43]. Induction of miR-132 and miR-212 occurred 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 evidence that miR-1 targets the mRNA encoding the transcription factor FosB, the spliced version of

SPN-subtype specific MiR-1 over-expression on cocaine -SA

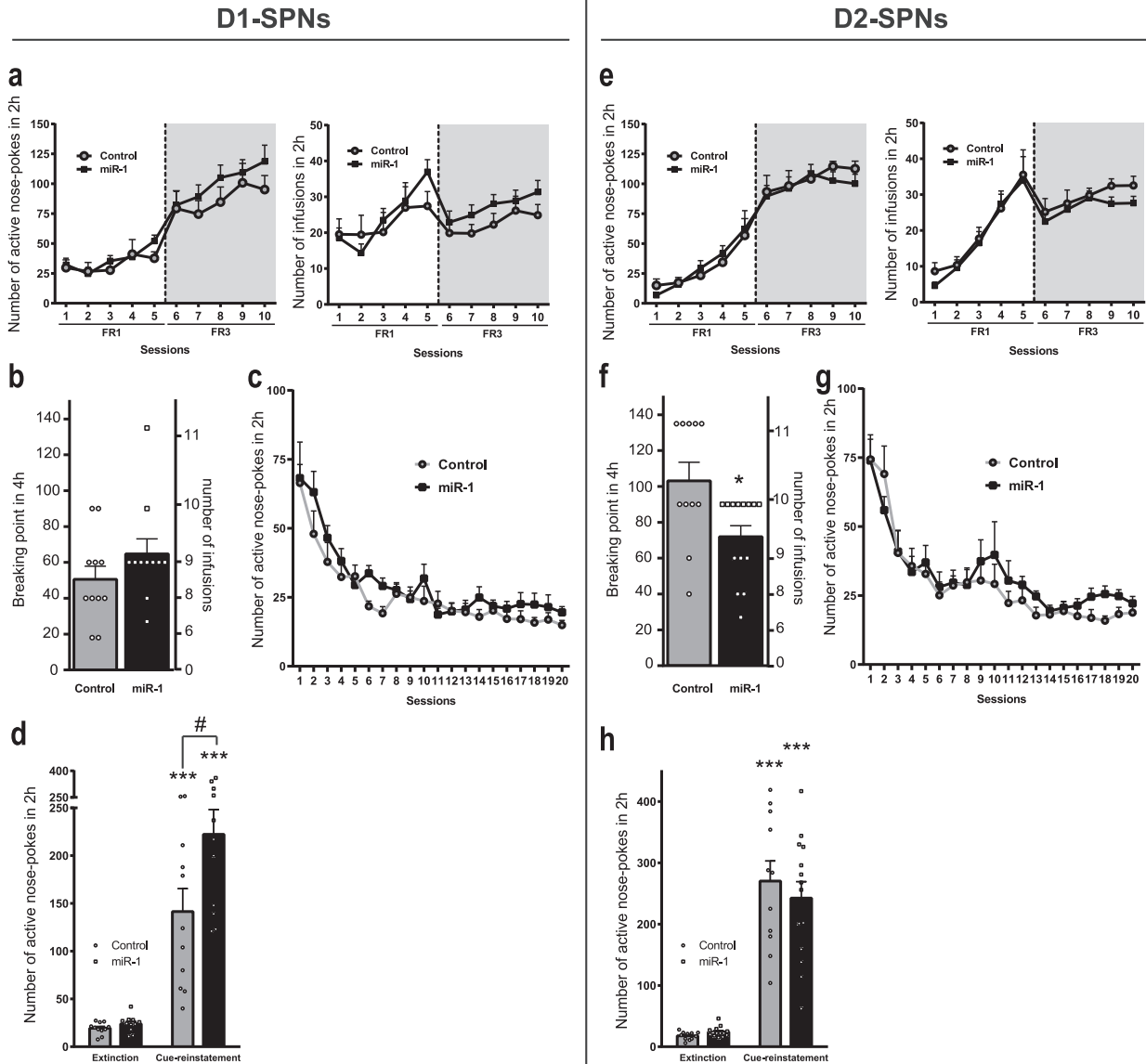


Fig. 5 Cocaine Self-Administration and relapse after extinction in mice with miR-1 overexpression in D1- or D2-SPNs of the dorsal striatum. **a–e** miR-1 overexpression in D1- SPNs of the dorsal striatum. **a** Cocaine Self-Administration. Left panel: active nose pokes during the acquisition of cocaine (0.5 mg/kg/infusion)-induced self-administration in mice with ($n = 11$) or without ($n = 11$, scr) miR-1 overexpression in the D1-SPNs of the DS. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of session, and no interaction. Right 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. **b** Breaking point for cocaine (0.5 mg/kg/infusion)-induced self-administration under a progressive ratio. The Mann–Whitney test indicated no AAV effect. **c** 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. **d** Cue-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction (miR-1 overexpression in the D1-SPNs of the DS). 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). **e–h** miR-1 overexpression in D2- SPNs of the dorsal striatum. **e** Cocaine Self-Administration. Left panel: active nose-pokes during the acquisition of cocaine (0.5 mg/kg/infusion)-induced self-administration in mice with ($n = 14$) or without ($n = 11$, scr) miR-1 overexpression in the D2-SPNs of the DS. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of session and no interaction. Right 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. **f** Breaking point for cocaine (0.5 mg/kg/infusion)-induced self-administration under a progressive ratio (miR-1 overexpression in the D2-SPNs of the DS). The Mann–Whitney test indicated a significant effect of miR-1 overexpression ($p = 0.018$). **g** Active nose-pokes during the extinction sessions after miR-1 overexpression in the D2-SPNs of the DS. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of session and no interaction. **h** Cue-induced reinstatement of cocaine seeking after extinction. The 2-way ANOVA indicated no effect of miR-1 overexpression, a significant effect of cue-reinstatement and no interaction. Post-hoc Bonferroni's multiple comparison test $***: p < 0.01$ (extinction vs cue-reinstatement). **a–h** Mean \pm SEM are represented.

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 D1-SPN cell-type-specific Δ FosB expression induced by psychostimulant was further confirmed in reporter lines [48, 49] or using ribosomal tagging approaches [50]. Furthermore, 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. For example, chronic cocaine treatment elevates Δ FosB protein levels in the NAc of isolated rats, but not in enriched conditions due to an already elevated basal accumulation of Δ FosB [53]. Furthermore, the facilitating effects of Δ FosB overexpression in D1-SPN on cocaine-induced behaviors were seen in individually housed animals [52]. 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. In our study, the mice were housed five per cage, and we did not observe a significant increase in *fosb* mRNAs in the NAc upon sustained cocaine administration, similarly to previous studies in rats [53]. The absence of the effect of miR-1 overexpression in D1-SPNs 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 previously observed in D1-SPNs of the NAc [47–49] 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 encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which also plays a key role in cocaine-induced behaviors [54]. In particular, data from several labs suggest a facilitating effect of BDNF in the NAc on cocaine-induced CPP and cocaine-primed reinstatement [55, 56]. However, the main source of BDNF within the striatum, including the NAc, arises from prefrontal cortical neurons release [57], which mediates the majority of BDNF effects on cocaine-related behaviors [58]. By contrast, *Bdnf* mRNA levels are very low in the striatum under basal conditions, as observed in our RT-qPCR data. Altogether, these observations can explain the lack of effect of miR-1 overexpression on *Bdnf* mRNA levels in vivo, despite a clear demonstration that miR-1 targets its 3'UTR region in vitro. Further experiments, which are out of the scope of our study, could include overexpression of miR-1 in prefrontal cortical neurons.

Finally, we demonstrate that *Npas4* is a target of miR-1 both in vitro and in vivo. *Npas4* encodes NPAS4, an activity-dependent transcription factor that plays a key role in neuronal plasticity and is induced in the NAc by cocaine [40]. 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 [40], another activity-related immediate early gene, which is selectively induced by cocaine in D1-SPN [60]. Conditional deletion of *Npas4* in the NAc significantly reduced cocaine-induced CPP and delayed the acquisition of cocaine-SA, without affecting cue-induced reinstatement of cocaine seeking [40]. 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.

From a behavioral point of view, we found effects 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 blunted 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 routes 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 [61–63] for reviews). It would have been interesting to evaluate the effect of miR-1 overexpression in D1-SPN on cocaine-induced reinstatement after SA and extinction, but cocaine priming does not induce reliable reinstatement of cocaine seeking in strain of mice (C57Bl6) [64] used in this study, contrasting with Swiss albino mice [65].

Finally, we found a decrease in breaking point for cocaine-SA under a PR schedule of reinforcement induced by miR-1 overexpression in D2-SPNs of the DS, suggesting a reduction in motivation for cocaine-SA. There are very few examples in the literature for specific reduction of motivation for cocaine-SA. D2-SPNs of the DS are inhibitory neurons projecting to the external part of the globus pallidus (GPe), which contains inhibitory neurons projecting to the subthalamic nucleus (STN). The inhibition of D2-SPN activity thus results in an inhibition of STN activity. Of interest, either lesion or inhibition of STN neurons can lead to a reduction in the breaking point for cocaine-SA without altering SA under a fixed ratio schedule [66] much like what we observed in the present study.

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 and on motivation for cocaine-SA. This contributes to the dissection of the mechanisms underlying addictive behaviors. Our results show the cell-type-specific and region-specific role of miR-1 and underline differences between cocaine- and cue-induced reinstatement in non-operant and operant paradigms. Although the expression of miR-1 is not induced in the DS after cocaine administration, our data provide valuable information about its role and the involvement of its targets FOSB and NPAS4 in specific neurons of the striatum in behaviors related to cocaine addiction and offers interesting therapeutic perspectives. Further studies investigating the effect of miR-1 knock-down in the VS will be interesting to test the intrinsic function of miR-1 in this structure. Altogether our results highlight the complexity of the control of addictive behaviors and emphasizes the importance of regional cell-type-specific investigations.

REFERENCES

1. Luscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011;69:650–63.
2. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:217–38.
3. Schultz W. Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1:199–207.
4. Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J Neurosci*. 2007;27:8161–5.
5. Kravitz AV, Kreitzer AC. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology*. 2012;27:167–77.
6. Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci*. 2012;15:816–8.
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. *Philos Trans R Soc Lond Ser B: Biol Sci*. 2008;363:3125–35.
8. Everitt BJ, Robbins TW. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37:194654.
9. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 1990;13:266–71.
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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:14845–50.

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;494:238–42.
12. Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. 2010;68:815–34.
13. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*. 2014;17:1022–30.
14. Soares-Cunha C, Coimbra B, Sousa N, Rodrigues AJ. Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;68:37086.
15. Vicente AM, Galvao-Ferreira P, Tecuapetla F, Costa RM. Direct and indirect dorso-lateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Curr Biol*. 2016;26:R267–9.
16. Salery M, Trifileff P, Caboche J, Vanhoutte P. From signaling molecules to circuits and behaviors: cell-type-specific adaptations to psychostimulant exposure in the striatum. *Biol Psychiatry*. 2020;87:944–53.
17. Lobo MK, Covington HE 3rd, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Dames-Werno D, et al. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*. 2010;330:385–90.
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. *Nat Neurosci*. 2013;16:632–8.
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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:2726–31.
20. Yager LM, Garcia AF, Donckels EA, Ferguson SM. Chemogenetic inhibition of direct pathway striatal neurons normalizes pathological, cue-induced reinstatement of drugseeking in rats. *Addiction Biol*. 2019;24:251–64.
21. Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 2014;76:259–68.
22. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447:396–8.
23. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
24. Im HJ, Kenny PJ. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*. 2012;35:325–34.
25. Heyer MP, Kenny PJ. Corticostriatal microRNAs in addiction. *Brain Res*. 2015;1628:2–16.
26. Smith ACW, Kenny PJ. MicroRNAs regulate synaptic plasticity underlying drug addiction. *Genes Brain Behav*. 2018;17:e12424.
27. Schaefer A, Im HJ, Veno MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, et al. Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *J Exp Med*. 2010;207:1843–51.
28. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293:1146–50.
29. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007;131:1097–108.
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 Dev*. 2007;21:1999–2004.
31. Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper BA, Graveley BR. microRNASeq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs. *RNA*. 2011;17:152943.
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;345:1616–20.
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. *Biol Psychiatry*. 2017;82:806–18.
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;66:896–907.
35. Wang X. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *RNA*. 2009;15:716–23.
36. Lanteri C, Hernandez Valleso 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. *J Neurosci*. 2009;29:987–97.
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*. 2016;41:2192205.
38. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol*. 2018;9:402.
39. Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addictions*. 2001;10:201–17.
40. 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;96:130–44 e6.
41. Varendi K, Kumar A, Harma MA, Andressoo JO. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:4443–56.
42. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 1990;9:245964.
43. Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42:350–62.
44. Hollander JA, Im HJ, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*. 2010;466:197–202.
45. Im HJ, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci*. 2010;13:1120–7.
46. Baste 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. *Mol Psychiatry*. 2018;23:434–43.
47. Nestler EJ, Barrot M, Self DW. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:11042–6.
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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3399–404.
49. Lobo MK, Zaman S, Dames-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. *J Neurosci*. 2013;33:18381–95.
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;135:738–48.
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;401:272–6.
52. Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW. Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci*. 2003;23:2488–93.
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. *Front Behav Neurosci*. 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. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;35:15771.
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. *Biol Psychiatry*. 2009;65:696–701.
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;199:169–82.
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;389:856–60.
58. McGinty JF, Whitfield TW Jr, Berglund WJ. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res*. 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 Rep*. 2019;29:3235–52 e9.
60. Chandra R, Lobo MK. Beyond neuronal activity markers: select immediate early genes in striatal neuron subtypes functionally mediate psychostimulant addiction. *Front Behav Neurosci*. 2017;11:112.
61. Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*. 2003;168:44–56.
62. Farrell MR, Schoch H, Mahler SV. Modeling cocaine relapse in rodents: Behavioral considerations and circuit mechanisms. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;87:33–47.
63. Sanchez-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biol*. 2006;11:2–38.
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*. 2014;39:297488.

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;199:593–603.
66. Rouaud T, Lardeux S, Panayotis N, Paleressompouille D, Cador M, Baunez C. Reducing the desire for cocaine with subthalamic nucleus deep brain stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:1196–2000.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the participation of Guillaume Ubiema for some immunohistochemical studies in vivo. 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. B.F. 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. E.S.M., and L.D.R. performed the cocaine-self-administration experiment. V.K. M.M., and M.C. A 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 experimental design and writing of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20150734352 to J.C.), 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-20171068) 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.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01328-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Benoit Forget or Jocelyne Caboche.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



HAL
open science

Npas4 regulates medium spiny neuron physiology and gates cocaine-induced hyperlocomotion

Thomas Lissek, Andry Andrianarivelo, Estefani Saint-jour, Marie-charlotte Allichon, Hanke Gwendolyn Bauersachs, Merie Nassar, Charlotte Piette, Priit Pruunsild, Yan-wei Tan, Benoit Forget, et al.

► To cite this version:

Thomas Lissek, Andry Andrianarivelo, Estefani Saint-jour, Marie-charlotte Allichon, Hanke Gwendolyn Bauersachs, et al.. Npas4 regulates medium spiny neuron physiology and gates cocaine-induced hyperlocomotion. EMBO Reports, EMBO Press, 2021, 10.15252/embr.202051882 . hal-03432274

HAL Id: hal-03432274






<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03432274>

Submitted on 17 Nov 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.

Npas4 regulates medium spiny neuron physiology and gates cocaine-induced hyperlocomotion

Thomas Lissek^{1,*} , Andry Andrianarivelo^{2,3,4} , Estefani Saint-Jour^{2,3,4}, Marie-Charlotte Allichon^{2,3,4}, Hanke Gwendolyn Bauersachs¹, Merie Nassar⁵, Charlotte Piette⁵, Preet Prunnsild¹ , Yan-Wei Tan¹, Benoit Forget^{2,3,4}, Nicolas Heck^{2,3,4}, Jocelyne Caboche^{2,3,4}, Laurent Venance⁵, Peter Vanhoutte^{2,3,4,**} , Hilmar Bading^{1,***} 

Abstract

We show here that the transcription factor *Npas4* is an important regulator of medium spiny neuron spine density and electrophysiological parameters and that it determines the magnitude of cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Npas4* is induced by synaptic stimuli that cause calcium influx, but not dopaminergic or PKA-stimulating input, in mouse medium spiny neurons and human iPSC-derived forebrain organoids. This induction is independent of ubiquitous kinase pathways such as PKA and MAPK cascades, and instead depends on calcineurin and nuclear calcium signalling. *Npas4* controls a large regulon containing transcripts for synaptic molecules, such as NMDA receptors and VDCC subunits, and determines *in vivo* MSN spine density, firing rate, I/O gain function and paired-pulse facilitation. These functions at the molecular and cellular levels control the locomotor response to drugs of abuse, as *Npas4* knockdown in the nucleus accumbens decreases hyperlocomotion in response to cocaine in male mice while leaving basal locomotor behaviour unchanged.

Keywords addiction; calcium; cocaine; locomotion; *Npas4*

Subject Category Neuroscience

DOI 10.15252/embr.202051882 | Received 12 October 2020 | Revised 11 September 2021 | Accepted 22 September 2021

EMBO Reports (2021) e51882

Introduction

The central question in this study is what molecular components in striatal medium spiny neurons (MSNs) control information processing at the cellular level and the strength of hyperlocomotion upon cocaine administration in mice as a model for drug responsiveness in humans.

Drug addiction is a chronic and relapsing psychiatric disorder characterized by uncontrollable patterns of drug-seeking behaviour, leading to a loss of control over substance intake despite negative consequences. Experimental work has implicated behavioural responsiveness to a single drug dose in naïve rats as a predictor of individual addiction risk (Piazza *et al*, 1989). Deciphering the biological factors that regulate behavioural sensitivity to drugs of abuse is thus critical to better understand addiction susceptibility and will greatly aid in genetic drug abuse risk screening programmes as well as the development of potent prevention and treatment measures.

Striatal medium spiny neurons (MSNs) are crucial neuronal circuit elements for computing behavioural effects in response to drugs and in addiction. In line with their role as central CNS hubs, MSNs receive synaptic inputs from multiple brain regions (e.g. amygdala, prefrontal cortex, hippocampus and VTA) and integrate different neurotransmitter systems (i.e. dopamine and glutamate) to compute reward signals and direct behaviour accordingly (Britt *et al*, 2012; Kravitz *et al*, 2012). Hyperlocomotion upon cocaine treatment in naive animals depends on activity changes in D1-dopamine receptor (D1R)-expressing MSNs (Pierce & Kalivas, 1997; Hikida *et al*, 2010) and striatal D1 and NMDA receptors were shown to be necessary for full expression of the acute locomotion increase after cocaine administration (Pulvirenti *et al*, 1991; McGregor & Roberts, 1993) as well as for cocaine-dependent locomotor sensitization (Brown *et al*, 2011) (Kita *et al*, 1999). The tripartite synapse formed by glutamate and dopamine afferences converging onto the dendritic spines of MSNs is a privileged site of neurotransmitter integration where drug of abuse-evoked synaptic plasticity has been linked to behavioural alterations induced by cocaine (Pascoli *et al*, 2011b, 2014). At the morphological level, acute and repeated exposures to cocaine are able to alter MSN connectivity to glutamate and dopamine afferences (Heck *et al*, 2015; Dos Santos *et al*, 2017, 2018). MSN glutamatergic and dopaminergic inputs and the

1 Interdisciplinary Center for Neurosciences, Department of Neurobiology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

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

3 CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, Paris, France

4 Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, Paris, France

5 Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR7241, INSERM U1050, Université PSL, Paris, France

*Corresponding author. Tel: +49 6221 5416501; E-mail: lissek@nbio.uni-heidelberg.de

**Corresponding author. Tel: +33 144275352; E-mail: peter.vanhoutte@sorbonne-universite.fr

***Corresponding author. Tel: +49 6221 5416500; E-mail: bading@nbio.uni-heidelberg.de

structures associated with them (i.e. dendrites and spines) are hence crucial in mediating the behavioural effects of drugs of abuse and studying the molecular factors that regulate the activity of these entities will lead to a deeper understanding of the addiction process.

Interested in the molecular and cellular determinants of MSN function and their role in hyperlocomotion upon cocaine treatment, we chose to investigate the neuronal transcription factor Npas4 in detail. Npas4 is a basic helix-loop-helix transcription factor that is strongly expressed in the brain and induced by neuronal activity (Hester *et al*, 2007). In neurons, Npas4 was shown to be important for excitatory and inhibitory synaptogenesis and implied as a regulator of overall neuronal network function (Spiegel *et al*, 2014). Most studies so far focused on the role of Npas4 in hippocampal learning (Sun & Lin, 2016), with interesting recent data implicating it broadly in striatal reward-learning and drug-related behaviour (Taniguchi *et al*, 2017). These studies however did not bridge the molecular, cellular and network levels and leave open how Npas4 exerts its effects on behaviour. We therefore set out to analyse the molecular up- and downstream dependencies of Npas4 in MSNs and studied how Npas4 changes MSN function to impact acute and chronic drug-related behaviour.

Results

Npas4 is expressed in the nucleus accumbens and upregulated by repeated cocaine exposure

We analysed Npas4 expression in the striatum in the ventral parts (nucleus accumbens; NAc) and dorsal parts (dorsal Striatum, dStr)

by immunohistochemistry at different time points after five injections of cocaine in the home cage, which mimics a locomotor sensitization protocol, or saline control (Fig 1A). We found sparsely dispersed Npas4-positive neurons (i.e. NeuN-positive cells) at all time points in the saline group (Fig 1B and C), indicating that spontaneous activity or activity associated with the saline injection are enough to induce Npas4 in a small subset of cells. When compared to saline-treated mice, Npas4 expression was strongly upregulated in striatal neurons of the NAc 1 h after the last cocaine injection, but not at 30 min or 24 h. This transient induction of Npas4 was specific to the NAc since no significant difference was observed at any time point between the two groups in dStr (Fig 1C). In contrast, Fos was induced in both the NAc and dStr in the same animals (Fig EV1A and B) 1 h after cocaine administration, suggesting a more restricted induction mechanism of Npas4 that keeps its upregulation limited to the NAc.

Npas4 induction is restricted to distinct synaptic stimuli

To dissect the molecular pathways involved in this more restricted Npas4 induction, we employed dissociated striatal neuron cultures from neonatal mice. These cultures contain mainly DARPP-32-positive MSNs ($68\% \pm 3\%$, mean \pm SEM; Fig 2A and B) and show robust and D1R-specific gene inductions upon treatment with the D1-agonist SKF-38393 (SKF) (Fig 2C). To investigate the main neurotransmitter input systems onto MSNs, we compared two models for synaptic stimulation—membrane depolarization via potassium chloride (HiK, 55 mM) (mimicking Ca^{2+} influx after excitatory stimulation) and D1-receptor stimulation via SKF (10 μM)—for their ability to induce Npas4 transcription. Although both treatments induced the IEGs Arc, Egr1 and Inhba with similar

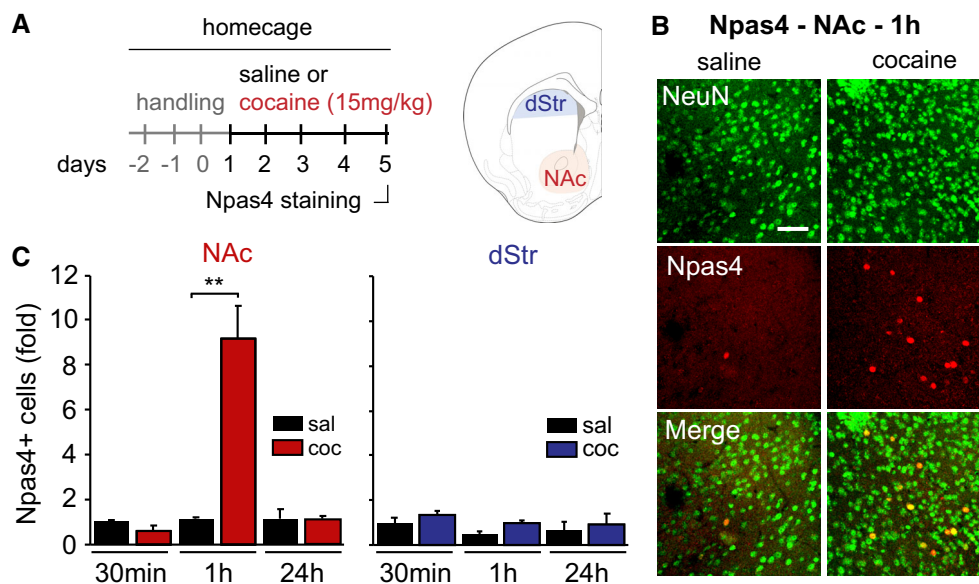


Figure 1. Npas4 is sparsely expressed in the nucleus accumbens of saline-injected control animals and is upregulated by cocaine injection.

A Left: Time course of habituation and treatments with cocaine (15 mg/kg) or saline solutions. Right: striatal subdivisions where Npas4 expression was analysed by immunohistochemistry (NAc: nucleus accumbens; dStr: dorsal striatum).
B Representative confocal images of NeuN (green) and Npas4 (red) immunostaining performed 1 h after the last injection of cocaine or saline (scale bar: 50 μm).
C Quantifications of Npas4-positive cells (fold change normalized to the 30 min saline control group) in the NAc and dStr. Mean \pm SEM; $n = 4$ mice per group. 10 images (5 per hemisphere) per mouse for the NAc and 10 images (5 per hemisphere) for the dStr. ** $P < 0.01$, unpaired Student's t -test.

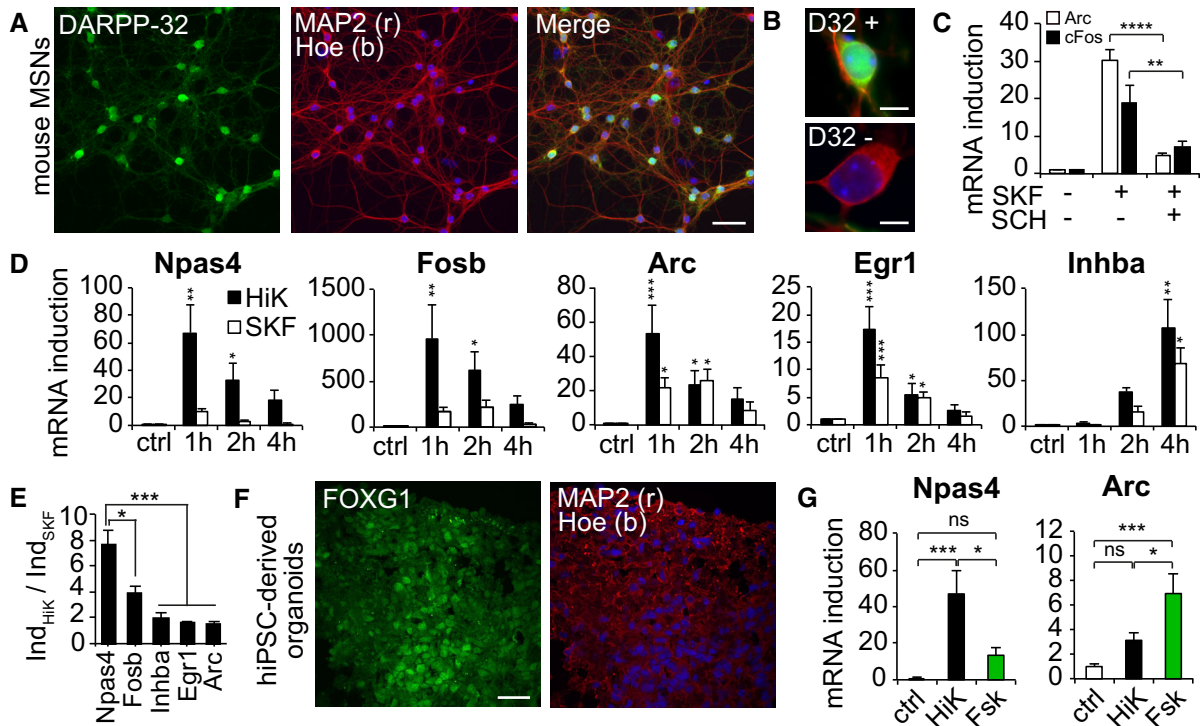


Figure 2. Differential induction of Npas4 in mouse cultured medium spiny neurons and human iPSC-derived organoids through distinct stimuli.

- A DARPP-32 (D32) immunostaining shows that striatal neuron cultures consist mainly of D32-positive medium spiny neurons (MSNs). 40× magnification, scale bar = 50 μm. MAP2 marks neurons, Hoechst (Hoe) stains DNA. *n* = 3 cultures from independent mouse litters.
- B 100× magnification images show intracellular distribution of D32 in D32-positive neurons (D32 +). D32-negative neuron (D32 -) are shown for comparison. Scale bar = 10 μm.
- C MSN cultures at DIV11 were treated for 2 h with either 10 μM of the D1-agonist SKF-38393 (SKF) alone or with SKF and 10 μM of the selective D1-antagonist SCH-23390 (SCH). qPCR was performed to determine the relative mRNA levels of the immediate early genes cFos and Arc. Mean + SEM; one-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* correction; ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; *n* = 3 independent cultures as biological replicates.
- D MSNs were depolarized with potassium chloride (HiK, 55 mM) or treated with the D1-agonist SKF-38393 (10 μM) for 1, 2 or 4 h. Subsequently, qPCR was performed to assess immediate early gene mRNA levels. Mean + SEM; two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test; indicated *P*-values for induction over control for each treatment; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; *n* = 4 independent cultures as biological replicates.
- E To assess differences in mRNA load induced by HiK vs SKF, the values from the experiments in panel (D) were summed up over time for each treatment and the sums for each treatment were divided by each other to yield the ratio $I_{\text{HiK}}/I_{\text{SKF}}$. Values for this ratio were compared through one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test; mean + SEM; **P* < 0.05, ****P* < 0.001; *n* = 4 independent cultures as biological replicates.
- F Immunohistochemistry analysis shows that cells in human iPSC-derived forebrain organoids express the forebrain neuron marker FOXG1 (green) and the neuron differentiation marker MAP2 (red). Hoe = Hoechst. Scale bar = 30 μm.
- G Differential induction of Npas4 through HiK and not forskolin in hiPSC-derived forebrain organoids. Organoids were treated with HiK (55 mM) or the PKA activator forskolin plus TTX (Fsk, 10 μM; TTX, 1 μM) for 1 h before qPCR analysis was performed to assess mRNA levels of Npas4 and Arc. Mean + SEM; *n* = 7 organoids in control condition, *n* = 5 organoids for HiK, *n* = 5 organoids for Fsk/TTX. One-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test, ns = not significant, **P* < 0.05, ****P* < 0.001.

magnitude, only membrane depolarization was able to robustly and significantly induce Npas4 (Fig 2D), with Fosb falling in the middle of these two groups. To correct for differences in temporal dynamics between the two stimuli and estimate total transcript load, we summed up the induction values over all time points for each treatment and divided them by one another ($\text{Ind}_{\text{HiK}}/\text{Ind}_{\text{SKF}}$), which revealed that Npas4 has a significantly higher value than all other IEGs analysed (Fig 2E), reflecting a primacy of membrane depolarization over D1R stimulation to induce Npas4. To assess the relevance of this phenomenon in humans, we analysed by qPCR in human iPSC-derived forebrain organoids whether differential inducibility of Npas4 is conserved in human neurons. Cells in these organoids express markers of differentiated neurons and forebrain neurons, MAP2 and FOXG1, respectively (Fig 2F). In line with our

findings in mouse neurons, Npas4 induction is higher after HiK stimulation than after a PKA-mediated transcriptional response triggered by forskolin/TTX (Fsk, 10 μM; TTX, 1 μM), while Arc is more strongly induced by Fsk/TTX than by HiK (Fig 2G).

Npas4 induction depends on NMDA receptors, voltage-dependent calcium channels, nuclear calcium, CaMKII/IV and calcineurin, but is independent of PKA and MAPK signalling

To dissect the signalling pathways involved in differential Npas4 induction, we stimulated mouse MSNs with HiK and co-applied pharmacological compounds to block ion channels or enzymes. The NMDA receptor blocker APV (100 μM) reduced all tested IEG inductions significantly after HiK (Fig 3A). This NMDA receptor

dependency of HiK-mediated gene inductions has been described previously and is due to the fact that NMDA receptors are activated by ambient glutamate in the culture medium (Macias *et al*, 2001; Pascoli *et al*, 2011a). Blockade of voltage-dependent sodium channels via TTX (1 μ M) had no effect on gene inductions (Fig 3B). Further addition of the voltage-dependent calcium channel blocker verapamil (30 μ M) to TTX reduced Npas4 and Fosb inductions significantly (Fig 3B). These results establish activity-dependent Ca^{2+} channels as key regulators of Npas4 mRNA induction in MSNs. We next analysed the downstream kinases required for Npas4 upregulation. Traditionally, the main focus of synapse-to-nucleus communication in MSNs has been on the MAPK and PKA pathways. In the presence of the ERK1/2 inhibitor UO126 (10 μ M) or the p38 blockers SB203580 (10 μ M) and SB202190 (10 μ M), induction of Arc and Fosb was significantly reduced (Fig 3C and D).

Surprisingly, none of the MAPK-inhibitors had an effect on Npas4 mRNA induction, indicating an independence of Npas4 induction from the MAPK pathway. The PKA inhibitor H-89 (10 μ M) caused a significant blockade of Arc and Fosb mRNA induction largely unaffected (Fig 3E). Interestingly, Npas4 was superinduced under H-89 treatment, which suggests that PKA might be a negative regulator of Npas4 induction while being a positive regulator of Arc induction. Co-incubation with the calcineurin blockers Cyclosporin A (1 μ M) and FK506 (1 μ M) attenuated Npas4 upregulation but had no effect on Arc and Fosb levels (Fig 3F). Blockade of CaMKII/IV activity via KN-93 (1 μ M) resulted in a significant reduction in all assessed gene inductions (Fig 3G). To explore the possibility of crosstalk between Ca^{2+} and D1-related signalling cascades, we co-applied HiK and SKF. Whereas co-stimulation with HiK and SKF lead to a super induction for Fosb, it had no significant effect on Arc

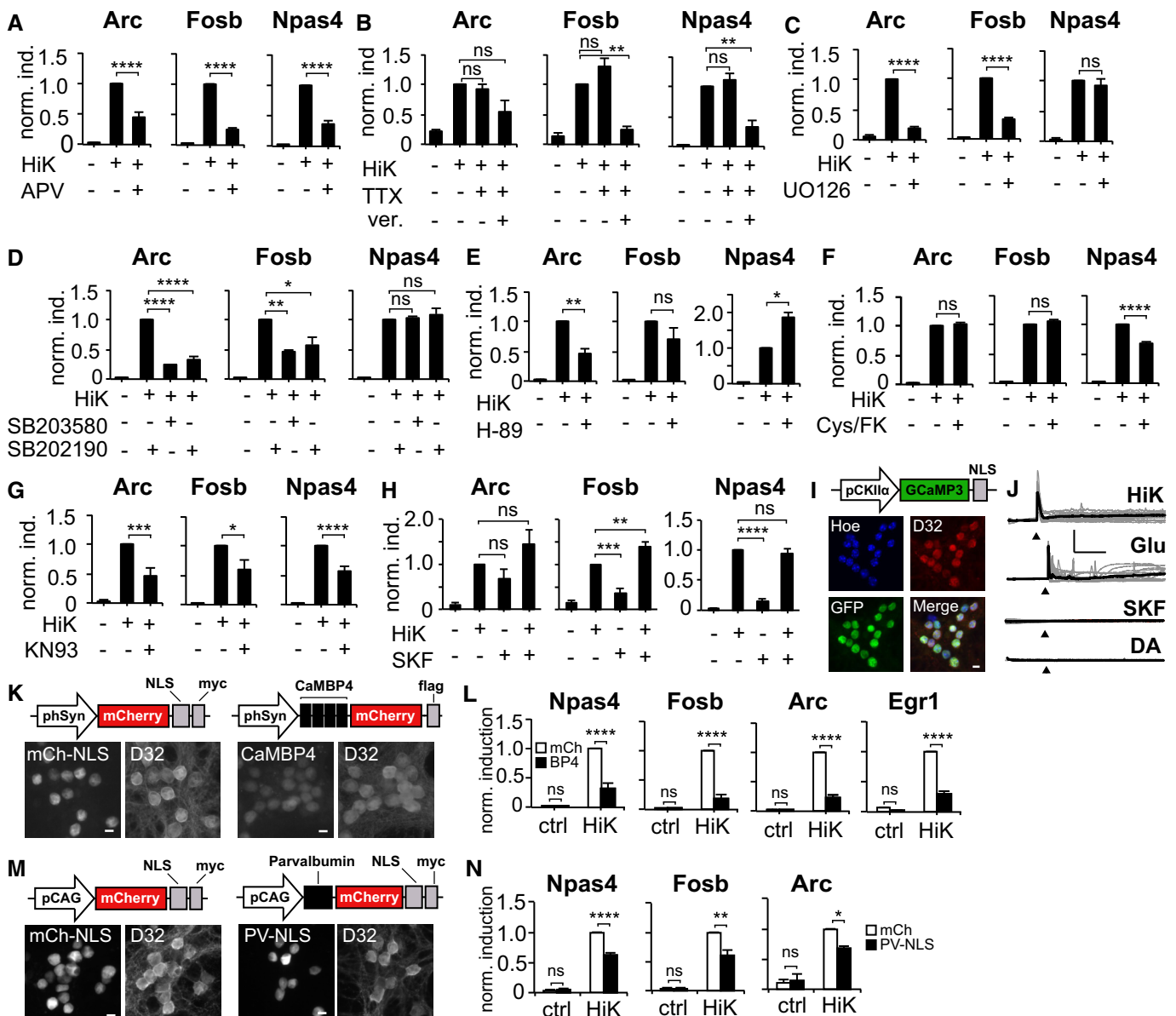


Figure 3.

Figure 3. Npas4 induction depends on NMDA receptors, voltage-dependent calcium channels, CaMKII/IV, calcineurin and nuclear calcium and is independent of PKA and MAPK signalling.

A–G MSN cultures were stimulated with HiK (55 mM) for 1 h in the presence of various pharmacologicals to dissect the synapse-to-nucleus cascades mediating transcription of Npas4, Fosb and Arc. Values were normalized to the induced condition to compare for differences in induction between treatments. Mean + SEM and one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* correction were used in all experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. *n*-number indicated in each panel. (A) Co-incubation with the NMDA receptor blocker APV (100 μM , applied 5 min before) reveals that all IEG inductions through HiK in MSNs depend on NMDA receptor activity. Mean + SEM; *n* = 4 independent cultures as biological replicates. (B) Blockade of voltage-dependent calcium channels through verapamil (30 μM , 5 min before) and TTX (1 μM , 5 min, to prevent verapamil-induced bursting) leads to significant reduction in gene inductions for Npas4 and Fosb. Mean + SEM; *n* = 4 independent cultures as biological replicates. (C) Inhibition of ERK1/2 through UO126 (10 μM , 20 min before) leads to blockade of mRNA induction for Arc and Fosb, but not Npas4. Mean + SEM; *n* = 3 independent cultures as biological replicates. (D) Inhibition of p38alpha and p38beta through SB203580 or SB202190, respectively (both 10 μM and 20 min before) leads to significant reductions in mRNA induction for Arc and Fosb, but not Npas4. Mean + SEM; *n* = 3 independent cultures as biological replicates. (E) Blockade of PKA activity through H-89 (10 μM , 20 min before) leads to reduced induction of Arc, unaffected induction of Fosb and a superinduction of Npas4. Mean + SEM; *n* = 3 independent cultures as biological replicates. (F) Inhibition of calcineurin through co-application of Cyclosporin and FK506 (1 μM each, 20 min before) leads to unaffected induction of mRNAs for Arc and Fosb, but significantly reduced levels of Npas4. Mean + SEM; *n* = 3 independent cultures as biological replicates. (G) Blockade of CaMKII/IV through application of KN-93 (1 μM , 20 min before) leads to significantly reduced mRNA inductions of Arc, Fosb and Npas4. Mean + SEM; *n* = 4 independent cultures as biological replicates.

H Co-application of HiK and SKF reveals synergistic effects on mRNA induction of Fosb but not Arc or Npas4. Mean + SEM; *n* = 6 independent cultures as biological replicates.

I–N Investigating the role of nuclear calcium signalling in mRNA induction of Arc, Fosb and Npas4. (I) Immunohistochemical analysis of MSNs infected with rAAV-pCKIIa-GCaMP3-NLS. Infection on DIV5, fixation on DIV12. Hoe = Hoechst, D32 = anti-Darpp-32, GFP = anti-GFP, 40 \times magnification, scale bar = 10 μm . (J) Nuclear calcium imaging of MSN cultures after application of different stimuli. HiK (55 mM), glutamate (Glu, 1 μM), SKF-38393 (SKF, 10 μM) or dopamine (DA, 20 μM) were applied after ~10 min of baseline imaging (arrowheads). Grey traces indicate individual cells, black traces indicate mean of all imaged cells (~30) for one stimulation run. inset: y-axis: 100% $\Delta F/F$, x-axis: 10 min, *n* = 3 independent cultures. (K) Immunohistochemical analysis of MSNs infected with mCherry-NLS as control or the competitive nuclear Ca^{2+} /CaM antagonist CaMBP4-mCherry. Infection on DIV4, fixation on DIV11. D32 = anti-Darpp-32. scale bar = 10 μm . (L) MSNs expressing rAAV-mCherry-control or CaMBP4 (BP4) were treated with 55mM HiK for 1 h and qPCR analysis was performed for the indicated IEGs. Mean + SEM; two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test, ns = not significant, **** $P < 0.0001$. *n* = 5 independent cultures as biological replicates. (M) Immunohistochemical analysis of MSNs infected with mCherry-NLS as control or the nuclear Ca^{2+} -buffer Parvalbumin-NLS-mCherry. Infection on DIV4, fixation on DIV11. D32 = anti-Darpp-32. (N) MSNs expressing rAAV-mCherry-control or PV-NLS were treated with 55mM HiK for 1 h and qPCR analysis was performed for the indicated IEGs. Mean + SEM; two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. *n* = 3 independent cultures as biological replicates.

or Npas4 (Fig 3H). Together, the above results indicate that at least two sets of IEGs exist in MSNs: (i) classical IEGs (i.e. Arc) that are regulated by well-studied signalling cascades such as the MAPK and PKA pathways and thus induced by both depolarization and D1-receptor activation, and (ii) genes that are selectively induced after membrane depolarization (i.e. Npas4) and independent of MAPK and PKA pathways but dependent on CaN and CaMKII/IV. While CaN and CaMKII/IV are shown to be regulators downstream of Ca^{2+} influx, this experimental set leaves open the question of which synapse-to-nucleus signal regulates Npas4 induction in MSNs. Previous studies in hippocampal neurons have identified Npas4 to be dependent on nuclear calcium signalling (Zhang *et al*, 2009). If Npas4 expression is indeed tightly controlled by nuclear calcium influx in MSNs, HiK and Glu should evoke nuclear calcium transients while SKF and DA should not. We tested this hypothesis by calcium imaging with the nuclear-localized Ca^{2+} indicator GCaMP3-NLS (Fig 3I). Addition of HiK or Glu lead to robust increases in nuclear calcium while addition of SKF or DA proved to be ineffective (Fig 3J). To test for necessity of nuclear calcium signalling for Npas4 induction, we then infected cells with an rAAV encoding for CaMBP4, a nuclear localized peptide antagonist of Ca^{2+} /CaM signalling, and analysed gene inductions after HiK stimulation via qPCR. We found that inductions of all analysed genes including Npas4 were significantly blocked by CaMBP4 (Fig 3K and L), indicating that nuclear calcium is a necessary synapse-to-nucleus signal for IEG induction in MSNs after membrane depolarization. Because expression of CaMBP4 might lead to chronic adaptations that reduce IEG inducibility by non-acute means (i.e. through nuclear HDAC accumulation [Schlumm *et al*, 2013]), we infected cells with an rAAV encoding a nuclear localized version of the protein calcium buffer Parvalbumin (PV-NLS). While no effects on basal expression

were observed, PV-NLS significantly reduced induction of Npas4, Arc and Fosb after HiK stimulation (Fig 3M and N).

Npas4 regulates a large transcript set, including mRNAs for glutamatergic synapse proteins and voltage-gated Ca^{2+} channel subunits

We next asked what the downstream functions of differentially regulated Npas4 are and reasoned that restriction of Npas4 induction to distinct stimuli might tightly control a unique and potent transcriptional response. We performed transcriptome microarray analysis of hippocampal neurons after rAAV-mediated Npas4 over-expression and observed an at least 1.5-fold increase in the levels of 1,091 sequences and an at least 1.5-fold decrease in levels of 1,133 sequences compared to the GFP control (Fig 4A, Dataset EV1). To investigate what biological processes Npas4 regulates, we analysed the Npas4 regulon with the PANTHER classification system (Fig 4B, Datasets EV2 and EV3, see Materials and Methods for details) and gene ontology (GO) analysis for biological processes. Noteworthy, among others, were enrichments for the following biological processes: regulation of synapse assembly, regulation of synapse organization, regulation of synapse structure or activity, learning or memory, regulation of locomotion, behaviour, nervous system development, regulation of dendrite morphogenesis, cognition and regulation of synaptic plasticity. The above findings imply Npas4 to be a potential master regulator of neuronal physiology and behaviour with a large target gene programme, allowing for profound and long-lasting changes in neuronal function and structure. To complete the microarray analysis, we manually analysed the Npas4 regulon for entities that are commonly altered in addiction and reward-related processes and found various relevant genes, such as

those involved in glutamate signalling (i.e. Nptx2, Grin1, Gria2, Gria3, Homer2, Grm5), dopamine signalling (i.e. Darp32, Drd4, Rcs/Arpp-21) and dendrite morphogenesis (i.e. Vegfd/Figf) (Fig 4C)

among many others. Interestingly, Npas4 seems to regulate important synaptic proteins (i.e. Nptx2) and Ca²⁺ channel subunits (i.e. Grin1). To further analyse this phenomenon in MSNs, we

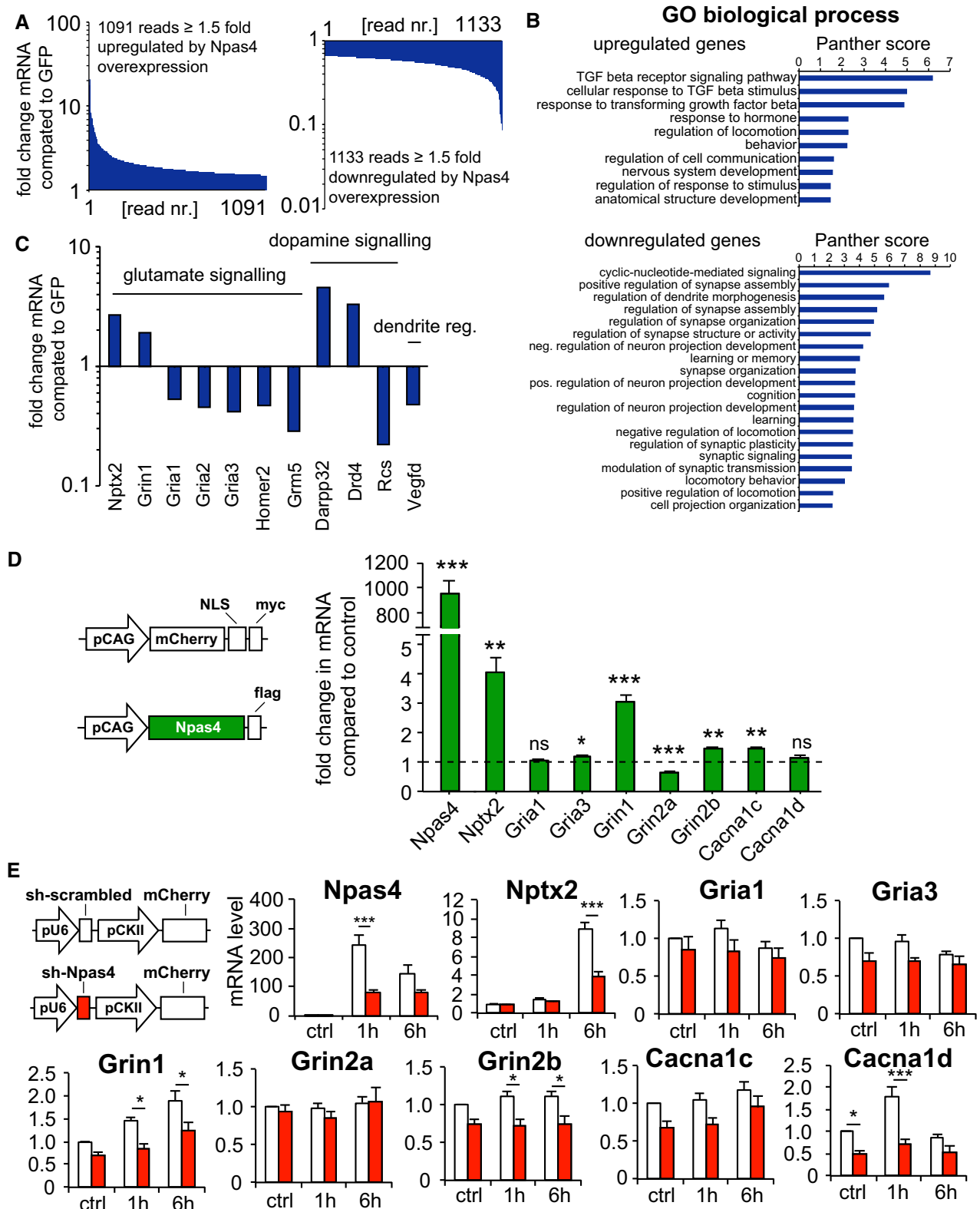


Figure 4.

Figure 4. Npas4 overexpression affects a large mRNA set including transcripts encoding NMDA receptors and subunits for Ca²⁺ channels.

- A–C Hippocampal neurons were infected with rAAVs expressing GFP (control) or Npas4 (Npas4 overexpression) on DIV4. On DIV11, RNA was harvested and subjected to microarray transcript analysis. (A) Overexpression of Npas4 leads to ≥ 1.5 -fold upregulation of the levels of 1,091 sequences and to a ≥ 1.5 -fold downregulation of the levels of 1,133 sequences, indicating that Npas4 regulates a widespread transcriptional response. (B) Gene ontology analysis (GO) for biological processes via the Panther tool for up- and downregulated genes from panel (A). Shown is a selection of relevant processes. Upregulated genes are enriched for cell-signalling processes (i.e. TGF- β signalling, hormone responses), behaviour (i.e. locomotion) and developmental processes (i.e. anatomical structure development). Downregulated genes are enriched for synapse regulation (i.e. regulation of synapse assembly), dendritic organization (i.e. dendrite morphogenesis) and cognitive processes (i.e. learning, cognition, locomotion). (C), selection of genes from the Npas4 regulon with relevance to synaptic transmission and dendrite morphology, both of which are processes implicated in habitual learning.
- D Npas4 overexpression leads to basal upregulation of genes encoding for proteins targeted to glutamatergic synapse function and Ca²⁺ channels in MSNs. MSNs were infected with rAAVs expressing mCherry-NLS control or Npas4 on DIV4 or DIV5 and expression of the indicated genes was analysed by qPCR on DIV11 or DIV12. Shown are mRNA levels normalized to mCherry-control. The dashed line represents normalized control levels. pCAG = CAG promoter, myc = myc-tag, flag = flag-tag. Mean + SEM; unpaired, two-tailed *t*-test for each gene, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. *n* = 5 independent cultures as biological replicates.
- E Npas4 controls activity-dependent upregulation of genes for glutamatergic synapse formation and Ca²⁺ channels. MSNs were infected with rAAVs expressing shRNA-scrambled (control) or shNpas4 (Npas4 knockdown) on DIV5. On DIV 12, cultures were stimulated with HiK (55 mM) for 1 or 6 h and mRNA levels were analysed by qPCR. mRNA level = fold change in mRNA compared to shscrambled unstimulated control. Mean + SEM; two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test, **P* < 0.05, ****P* < 0.001. *n* = 5 independent cultures as biological replicates.

overexpressed Npas4 via rAAV and performed a qPCR analysis for the synaptic protein-encoding transcripts Nptx2, Gria1, Gria3 and transcripts for the calcium channel subunits Grin1, Grin2a, Grin2b, Cacna1c and Cacna1d. We found significant upregulations for Nptx2, Gria3, Grin1, Grin2b and Cacna1c and a highly significant downregulation in Grin2a (Fig 4D). To complement the overexpression experiments and test whether these molecular changes are induced by Npas4 in an acute manner, we performed qPCR analysis after shRNA-mediated knockdown of Npas4 and HiK stimulation. We find that Npas4 knockdown significantly decreases activity-dependent transcript levels of Nptx2, Grin1, Grin2b and Cacna1d (Fig 4E).

Npas4 regulates MSN spine density *in vivo*

In our *in vitro* transcriptome analysis, we found that Npas4 regulates gene sets implicated in synapse formation (Fig 4B, GO terms “regulation of synapse assembly”, “regulation of synapse organization”, “regulation of synapse structure or activity”; mRNA upregulation of Nptx2, Grin1 and Grin2b). To study the role of Npas4 in dendritic spine function, we performed rAAV-shRNA-mediated knockdown of Npas4 *in vivo* and analysed MSN spine density from mice that were subjected to repeated saline or cocaine injections (Fig 5A). To enable

3D analysis of D1R-MSN morphology, we sparsely labelled this cell type by co-injecting a mix of AAV-PPTA-Cre, which drives a D1R-MSN-specific expression of the Cre recombinase, and AAV-flex-tdTomato in a 1:10,000 ratio (Fig 5B). The morphological analysis was performed in the shell part of the NAc 1d after the last injection of cocaine or saline, in td-Tomato-positive (i.e. D1R-positive) MSNs infected with rAVV-sh-Npas4, which triggered a robust knockdown of Npas4 as compared to control (Fig 5C and D). The analysis of dendritic spine density (Fig 5E and F) revealed that Npas4 knockdown decreased D1R-MSN spine density under basal conditions in the saline-treated group and prevented the cocaine-evoked increase in dendritic spine density that was observed in the scrambled shRNA control group. Npas4 knockdown had no effect on spine head diameter in either the saline- or cocaine-treated animals (Fig EV2A). To complement the analysis in D1-MSNs, we performed the same set of experiments in D2R-MSNs. D2R-MSNs were labelled with the same Cre-AAV-mediated approach as for D1R-MSNs, except that cells were infected with AAV-ENK-Cre (Fig 5G) instead of AAV-PPTA-Cre. There were no significant differences in spine density in any treatment group in D2R-MSNs (Fig 5H) and no differences in spine head diameter (Fig EV2B), indicating that Npas4-mediated regulation of spine density is restricted to D1-MSNs.

Figure 5. Npas4 regulates dendritic spine density in D1R-MSNs under basal conditions and after repeated cocaine exposure.

- A Time course of AAV injections, habituation and treatments to assess the impact of Npas4 knockdown on MSN neuronal morphology under basal conditions and after repeated cocaine injections.
- B Representative images of AAV-shscr-GFP- and AAV-shNpas4-GFP-infected cells together with the sparse labelling of D1R-MSNs achieved through a co-injection of AAV-Flex-tdTomato and AAV-PPTA-Cre (to label D1 MSNs) or AAV-ENK-Cre (to label D2 MSNs) in a 1/10,000 ratio. Scale bar = 100 μ m.
- C Representative confocal images of staining for Npas4 expression (red) in the NAc of mice infected with AAV shscr-GFP or AAV-shNpas4-GFP 1 h after cocaine treatment. Scale bar = 20 μ m. Note the presence of Npas4-positive neurons infected with the AAV shscr-GFP (arrowheads) and not in cells infected with the AAV-shNpas4.
- D Quantifications of GFP-positive and Npas4-positive cells 1 h post cocaine treatment. Data were normalized so that the number of GFP- and Npas4-positive cells was set to 100%. 20 fields of view were analysed from *n* = 3 mice in the case of AAV-shscr-GFP and 30 fields of view from *n* = 3 mice for AAV-shNpas4-GFP. Mean + SEM; unpaired Student's *t*-test; **P* < 0.05, *n* = 3 mice per group.
- E Confocal images of tdTomato-labelled D1-MSNs expressing shscr-GFP or shNpas4-GFP (left panels; scale bar: 20 μ m). 3D volume-renderings of MSN dendrites from the NAc shell (right panels; scale bar: 2 μ m).
- F Quantification of spine density in D1-MSNs, defined as the number of spines normalized to 10 μ m of dendrite for saline control and after cocaine injection. Mean + SEM; two-way ANOVA, Bonferroni *post-hoc* test, **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. *n* = 40 neurons from 4 mice in each experimental group.
- G Confocal images of tdTomato-labelled D2-MSNs expressing shscr-GFP or shNpas4-GFP (left panels; scale bar: 20 μ m). 3D volume-renderings of MSN dendrites from the NAc shell (right panels; scale bar: 2 μ m).
- H Quantification of spine density in D2-MSNs, defined as the number of spines normalized to 10 μ m of dendrite for saline control and after cocaine injection. Mean + SEM; two-way ANOVA, Bonferroni *post-hoc* test, all non-significant. *n* = 40 neurons from 4 mice in each experimental group.

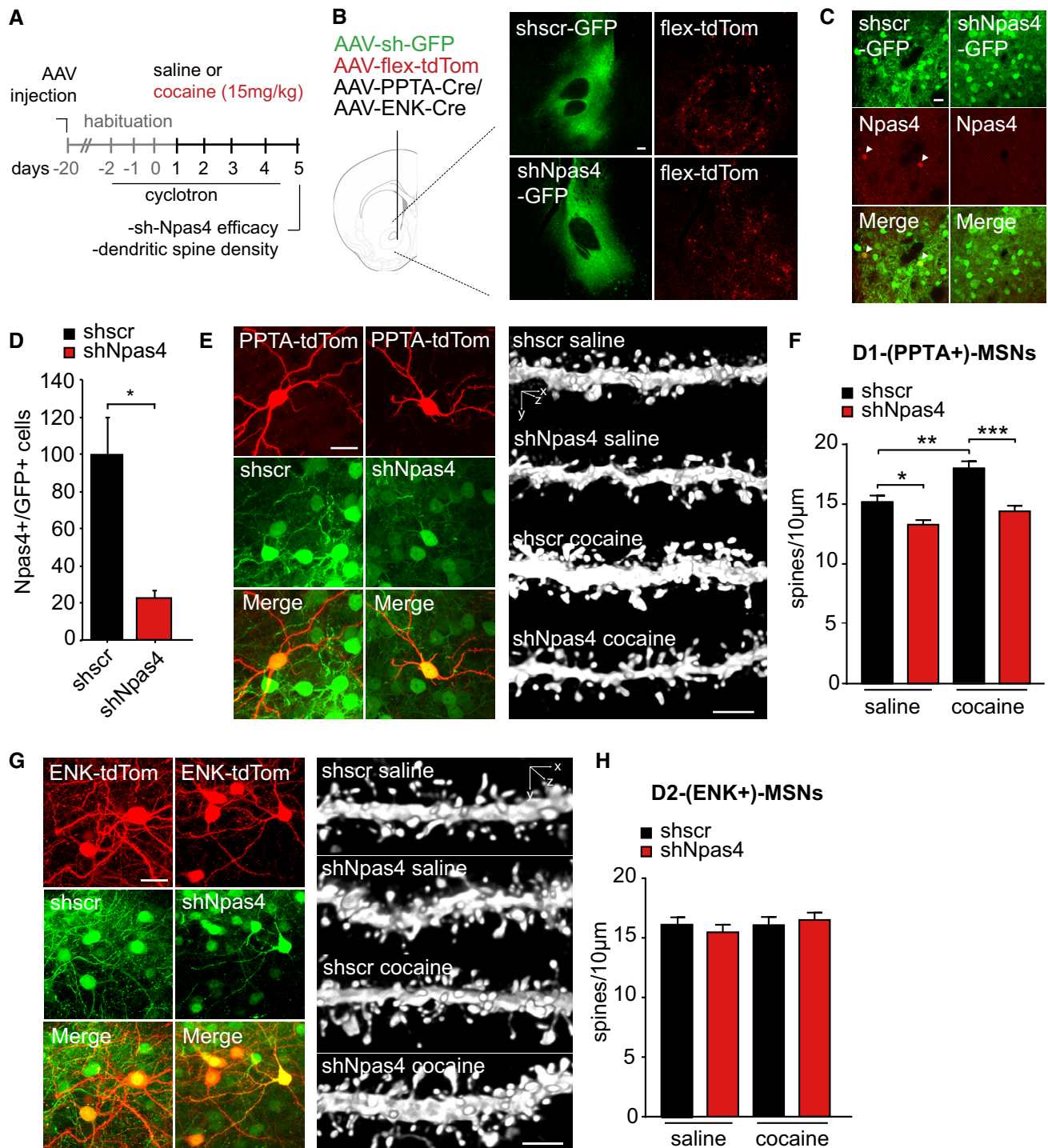


Figure 5.

Npas4 controls MSN electrophysiological properties

To evaluate the impact of Npas4 on key synaptic and membrane properties in MSNs, we conducted an electrophysiological analysis of intrinsic cellular parameters and corticostriatal synaptic transmission in *ex vivo* slice preparations from adult mice injected with rAAV-shNpas4 (Fig 6). We have differentiated D1-positive and D1-

negative MSNs through the D₁-tdTomato rAAV labelling approach used in the dendritic spine analysis and analysed these two neuron populations separately and pooled to study overall effects on MSN physiology. We examined 15 active and passive membrane properties (Table EV1) and found an increased rheobase (Fig 6A) and firing rate (Fig 6B) and a decreased input/output gain function (Fig 6C) in the Npas4-knockdown mice compared to control. The

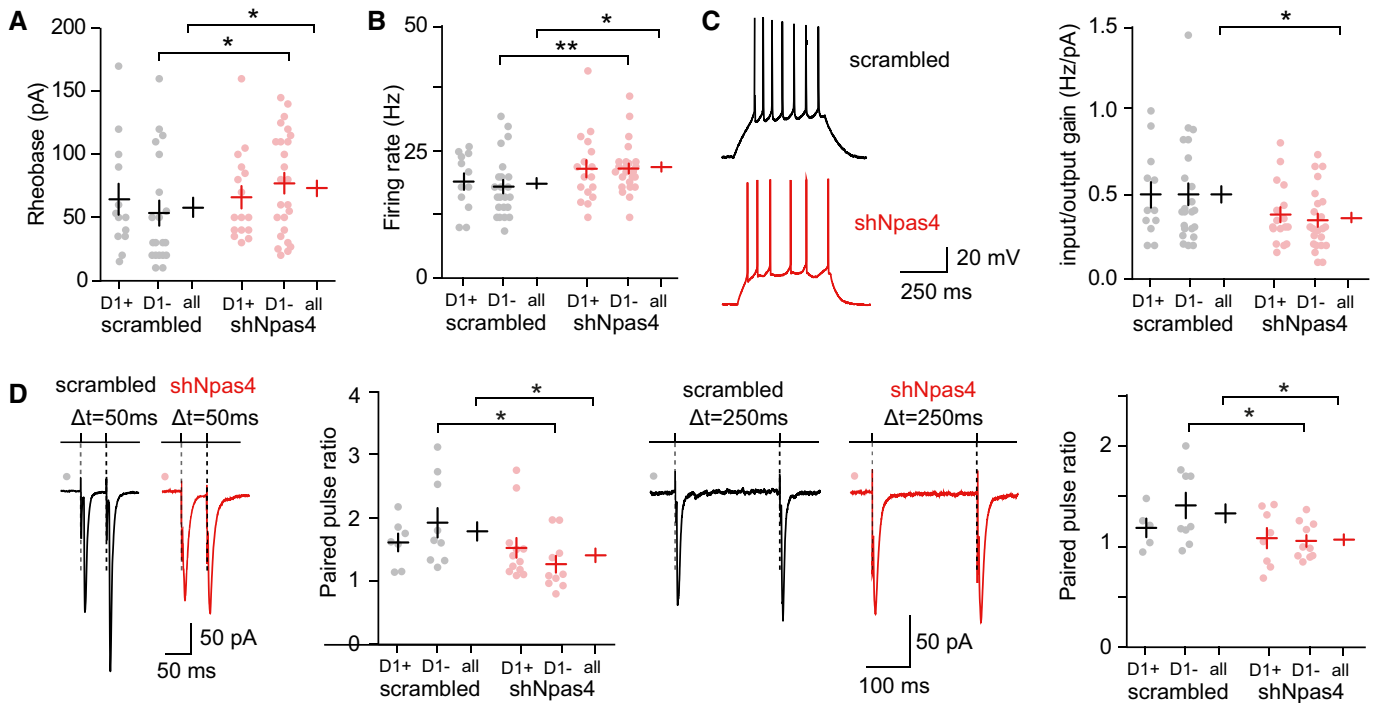


Figure 6. Npas4 regulates MSN membrane excitability and corticostriatal transmission.

A–D Scatter plot of passive and active membrane properties of MSNs in *ex vivo* slice preparations from shRNA-AAV-infected mice, plotted for MSNs as D1-positive (D1+), D1-negative (D1-) and those two populations pooled (all). (A) rheobase; mean \pm SEM. (B) Firing rate estimated at twice the value of the rheobase; mean \pm SEM. (C) input/output gain values recorded in shscr- or shNpas4-injected mice, mean \pm SEM. The increased rheobase and lower input-output gain indicate a lower excitability for MSNs in the Npas4-knockdown group. (D) facilitation at corticostriatal synapses examined in MSNs with paired-pulse stimulation at 20 and 4 Hz. Representative current traces and scatter plots of paired-pulse experiments illustrate a potent facilitation in MSNs in mice injected with scr-shRNA and a significant decrease of the facilitation in mice injected with shNpas4, with a stronger effect in D1-negative MSNs. Mean \pm SEM.

Data information: For *n*-numbers, please see Table EV1. Mann–Whitney-Test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

rheobase and firing rate increases were primarily present in D1-negative MSNs and pooled cells, whereas the I/O gain decrease had similar effect sizes in D1-positive and D1-negative MSNs, although only the pooled cell group was statistically significant in this experimental set. Together, these findings indicate a lower MSN excitability in the AAV-shNpas4-injected mice. We observed no difference for membrane resting potential, input resistance or other AP features (Table EV1). We next recorded EPSCs evoked by paired-pulse stimulations at 20 and 4 Hz to assess the probability of release (Fig 6D). Paired-pulse ratio (PPR) analysis revealed that in control mice, the corticostriatal short-term plasticity was facilitated for 20 and 4 Hz paired-pulse stimulations (Fig 6D and Table EV1). In the shNpas4 injected mice, facilitation was still observed but was significantly decreased at both 20 and 4 Hz stimulations (Fig 6D). The observed effects were due to significant changes in D1-negative MSNs, whereas D1-positive MSNs did not show changes in short-term plasticity. This decreased facilitation indicates an increase in the probability of glutamate release from pyramidal cells.

Npas4 regulates hyperlocomotion in response to the first cocaine injection and throughout the course of cocaine-induced sensitization

In addition to its roles in MSN spine density and electrophysiological parameters, our transcriptome analysis highlighted Npas4 as a

regulator of genes that belong to the ontology group “regulation of locomotion” (Fig 4B). This led us to hypothesize that Npas4, through its observed effects on MSN function (spine density changes and electrophysiological parameters), might play a central role in regulating the locomotor response to cocaine. To test this hypothesis, we used shRNA-mediated knockdown of Npas4 in the nucleus accumbens with the same AAV-co-injection D1-labelling protocol as in Fig 5 (i.e. AAV-shscrambled or AAV-shNpas4 plus AAV-Flex-tdTomato and AAV-PPTA-Cre) and measured its impact on the locomotion of mice treated repeatedly with saline or cocaine (Fig 7A). In the habituation phase and in the chronic saline condition, Npas4 knockdown did not alter basal locomotion (Fig 7B). However, in line with our hypothesis of Npas4 as a determining factor of cocaine-induced hyperlocomotion, we observed a significant attenuation of the locomotor response by 20–40% from day 1 to 2 and on day 4 in the Npas4 knockdown animals (Fig 7B).

Discussion

Npas4 has a differential regulation pattern

The first central finding of our study is the differential regulation pattern of Npas4 in MSNs. Npas4 is sparsely expressed under

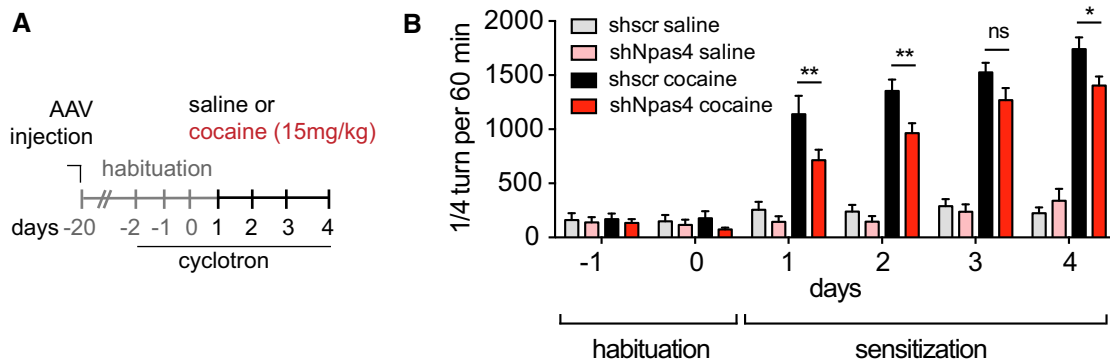


Figure 7. Npas4 gates cocaine-induced hyperlocomotion.

A Time course of AAV injections, habituation and treatments to assess the impact of Npas4 knockdown on cocaine-induced hyperlocomotion.
 B Cocaine-induced hyperlocomotion is attenuated by Npas4 knockdown while locomotor behaviour after saline injection is unaffected on all days. Mean + SEM; two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns = not significant. $n = 12$ – 16 animals per condition.

control conditions (saline injections) and upregulated by cocaine *in vivo*. Our *in vitro* analysis indicated that it is preferentially induced by membrane depolarization (HiK) as compared to the D1-agonist SKF-38393, despite the last sharply inducing other IEGs, such as Arc. Npas4 induction is hence tightly coupled to membrane depolarization, which might enable the cell to discriminate different circuit inputs—and by extension probably even environmental signals—at the genome level and to drive downstream adaptations accordingly. Because we observed reduced dendritic spine density and altered electrophysiological parameters in the Npas4 knock-down group already before the first cocaine injection, and because the reaction to this first cocaine injection was attenuated, we infer that either baseline, non-cocaine-context related glutamatergic input onto MSNs in the home cage sustains Npas4 expression levels and mediates its subsequent cellular and behavioural effects or that saline injections and the novel context during habituation induce Npas4. Extending the differentiation at the synaptic level, Npas4 induction depends on different synapse-to-nucleus cascades than other IEGs tested in this study. Although all IEGs analysed here rely on NMDA receptor and VDCC signalling after membrane depolarization, only Fosb and Arc depend on PKA and MAPK signalling. Npas4 induction is independent of these cascades and in turn is partly regulated by calcineurin. The independence of Npas4 from PKA and MAPKs is highly interesting because these pathways are a crucial focus in addiction research and major targets for therapeutic concepts (Lee & Messing, 2008; Sun *et al*, 2016). Since these strategies would not interfere with Npas4 induction, our findings indicate that additional targets in the prevention and treatment of drug-related behaviour should be investigated, such as upstream regulators of Npas4 (i.e. calcineurin and nuclear calcium signalling) and Npas4 itself. We found that the ability of stimuli to upregulate Npas4 correlates with their ability to induce nuclear calcium transients (i.e. glutamate application and potassium chloride depolarization are able to induce nuclear calcium, but dopamine and SKF-38393 are not) and that induction of Npas4 is blocked by nuclear calcium antagonists. Further studies should investigate whether nuclear calcium signalling is relevant to drug-related behaviour. Our study reveals the signalling cascade of NMDARs/VDCCs-nuclear

Ca^{2+} -CaN/CaMK to be an essential regulator of Npas4 induction in MSNs. This pathway tightly controls Npas4 levels and subsequent neuronal remodelling and behaviour.

Npas4 is a master regulator of neuronal transcription, regulating genes for synaptic proteins and calcium channels

Our gene ontology analysis of transcripts with altered levels upon Npas4 overexpression showed that Npas4 affects many cellular mechanisms, with a distinct focus on neuronal physiology (i.e. regulation of synapse assembly, regulation of learning and memory, regulation of neuron projection development). One caveat with our approach is that hippocampal neurons were used for this initial transcriptome analysis and that some genes in the overall transcriptome might differ in MSNs. qPCR analysis after overexpression and knockdown in MSNs shows that Npas4 regulates transcript levels of NMDA receptor subunits (Grin1, Grin2a and Grin2b), voltage-dependent calcium channel subunits (Cacna1c and Cacna1d) and the synaptic scaffolding protein Nptx2, most of these in an activity-dependent manner. At the transcriptional level, Npas4 is thus implicated in control over the magnitude of membrane ion signalling and synaptic transmission. Many of the synaptic genes we analysed are adjusted in the same direction in the development of addiction as they are in our study after Npas4 overexpression: upregulation of Nptx2 (Pacchioni *et al*, 2009), upregulation of Grin1 and Grin2b (Zhang *et al*, 2006; Schumann & Yaka, 2009), upregulation of Cacna1c (Renthal *et al*, 2009) and Cacna1d (Bernardi *et al*, 2014), suggesting that Npas4 might mediate at least some of these changes.

It is noteworthy that Npas4 regulates transcription of the genes for NMDAR subunits Grin1, Grin2a and Grin2b in MSNs, as NAC NMDA receptor activity has been shown to be required for expression of hyperlocomotion upon exposure to cocaine, heroin and intra-NAC dopamine infusions (Pulvirenti *et al*, 1991). This gives our results further relevance and possibly explains the phenotype of reduced cocaine-induced hyperlocomotion. Due to its potent transcriptional response, we hypothesize that the distinctive regulation pattern of Npas4 in MSNs has evolved to restrict its function to very

defined or powerful circuits inputs, possibly relating especially meaningful environmental signals to Npas4 output.

Npas4 regulates spine density and MSN electrophysiology *in vivo*

Building on our finding that Npas4 regulates genes involved in synaptic structure and function, we focused our analysis of MSN network behaviour on dendritic spines (structure) and electrophysiological parameters (function). Our findings that Npas4 regulates dendritic spine density under basal conditions and contributes to cocaine-induced increased spine density in D1-MSNs, imply that it controls certain stimulus-independent and -dependent synaptic inputs onto MSNs. MSN spine density alterations are a prime example of drug-induced cellular changes (Dobi *et al*, 2011). We previously showed cocaine-induced increase of spine density in MSNs is associated with the formation new glutamatergic synapses impinging onto MSNs, especially D1R-MSNs (Heck *et al*, 2015; Dos Santos *et al*, 2017). Our study reveals Npas4 as a key molecular regulator of this synaptogenesis process.

To understand how Npas4 can already affect behaviour on the first day of cocaine administration, we analysed MSN electrophysiological parameters in naive animals in D1-positive, D1-negative and pooled MSNs. Npas4 controls MSN membrane excitability (as inferred from an increased rheobase and a decreased input/output gain function in the Npas4-knockdown animals) and firing rate. The rheobase and firing rate effect was only present in D1-negative MSNs, while the decrease in I/O gain function was seen in both D1-positive and D1-negative MSNs with however only the pooled cell group showing statistically significant differences. Npas4 also negatively regulates cortico-striatal transmission, as seen by a decreased paired-pulse facilitation in the Npas4-knockdown animals, with a more pronounced effect in D1-negative MSNs. In this electrophysiological dataset some of the effects seem to be dominant in D1-negative MSNs (especially rheobase and PPF), while others (I/O gain) occur in both D1-positive and D1-negative MSNs with similar magnitude. None of the effects are significant in D1-positive MSNs, which might either indicate an absence of a biological effect or it might be due to lower sample sizes in this dataset. The observation that some effects are stronger in D1-negative MSNs stands in an interesting contrast to our findings on dendritic spines, where the Npas4-knockdown effect was restricted to D1-positive MSNs. It could be that Npas4 regulates certain cellular parameters in different ways in different MSN subtypes and that adaptations in D1-negative MSNs are either synergistic or homeostatic (e.g. D1-negative MSNs change their activity in response to synaptic alterations in D1-positive MSNs to maintain circuit balance). The reduction in neuronal excitability after Npas4 knockdown together with an increased firing rate could enhance the coincidence detection properties of MSNs. The fact that Npas4 levels positively correlate with excitability in MSNs (which are GABAergic) complements a previous study which found that Npas4 regulates excitatory input onto GABAergic neurons (SST neurons in that case) (Spiegel *et al*, 2014). Decreasing Npas4 levels, as performed in our study, is hypothesized to decrease spontaneous depolarization (because of lower excitability) and increase cortical control over MSN activity and thus restrain hyperlocomotion upon cocaine exposure, possibly explaining the phenotype of reduced hyperlocomotion in the Npas4-knockdown group

in our study. Extrapolating to human phenotypes, sensitivity to drug effects and propensity to drug use might be an intrinsic fault in brain circuit programming where heightened Npas4 function leads to increased excitability and decreased cortical control of MSNs and an increase in drug-related behaviour.

Npas4 regulates hyperlocomotion in response to cocaine and is a potential treatment target in human addiction

We found that although locomotor activity is unaffected in the Npas4-knockdown group after saline injections, animals with NAC Npas4-knockdown display attenuated hyperlocomotion in response to cocaine at the first injection. This phenomenon persists throughout the sensitization process so that animals in the knockdown group consistently show decreased cocaine hyperlocomotion. These results imply Npas4 as an important and specific determining factor of drug-induced hyperlocomotion that does not alter basal locomotor behaviour.

As Npas4 determines an animal's drug-dependent hyperlocomotion, Npas4 levels or the transcriptional output of its targets could potentially be used as markers in molecular screening concepts for addiction in humans. We hypothesize that manipulating Npas4 levels either directly (e.g. through CRISPR-Cas9-associated genome editing or direct Npas4-targeting vectors) or indirectly (e.g. through boosting/reducing nuclear calcium signalling) could be explored as a therapeutic strategy. What is especially intriguing about Npas4 as a treatment target is that changing Npas4 levels leaves basal locomotor behaviour unchanged, as shown in our study. This potential benefit of a more selective and context-dependent Npas4 action mechanism is also implied by a recent study, which showed that striatal Npas4 knockdown selectively decreased the rewarding properties of cocaine, but not of sucrose, while leaving aversion-learning intact (Taniguchi *et al*, 2017). Thus, Npas4 could perhaps be used as a highly specific and potent target of drug-specific therapeutic interventions. Since Npas4 levels are altered by environmental enrichment (Bloodgood *et al*, 2013), it is also feasible that behavioural therapeutic and preventative measures, such as environmental change and rehabilitation efforts, could be leveraged to alter Npas4 levels, change MSN structure and function as well as diminish propensity to drug use.

Npas4 exerts its effects before the first cocaine injection

An interesting point in our results is that Npas4 influences MSN physiology already before cocaine is administered for the first time and it influences the reaction to the first cocaine injection. Npas4 knockdown decreased spine density, I/O gain and paired-pulse ratios as well as increased rheobase and firing rates in nucleus accumbens MSNs before the animals were ever exposed to cocaine. This implies that basal, non-drug-related neuronal activity already determines Npas4 function. Npas4 levels, possibly sustained by spontaneous depolarization, may determine the input properties of MSNs and hence perform a gating function that controls certain behavioural responses, such as hyperlocomotion, to drugs of abuse in the future. This is reminiscent of the functions of nuclear calcium-VEGFD signalling as recently discovered by our lab, wherein basal nuclear calcium and its downstream target VEGFD, independent of strong specific stimuli, determine dendritic

architecture and electrophysiological behaviour in hippocampal neurons *in vivo* and render neurons permissive for the formation of new memories (Hemstedt *et al.*, 2017). Most studies on the functions of activity-induced genes such as Npas4 or cFos relate the activity-dependent increase in transcript levels to a specific, strong and short stimulus (i.e. electroshocks in fear memory paradigms, drug administration in addiction studies). It is then hypothesized that these IEGs, through their cellular effects within the next hours, consolidate the memory of this specific context in long-term changes in neuronal physiology. Yet, it might be that ongoing basal neural activity, not related to a particular context, is equally important for IEGs such as Npas4 to exert their function and shape behaviour. In line with this argument are observations that increased mental stimulation from an enriched environment can be protective against context-specific maladaptation such as addiction and anxiety (Solinas *et al.*, 2008). Our study uncovers a new dimension to Npas4 function, where in addition to its reported roles in encoding context-specific memories, it controls essential aspects of neuronal physiology such as spine density and electrophysiological parameters independent of strong environmental signals. These changes, in turn, have profound influences on how an animal will react to future environmental stimuli.

Conclusions and future directions

Our results establish Npas4 as a critical regulator of medium spiny neuron function and structure. This impact on striatal network activity translates to an essential gating function on locomotor activity after cocaine administration, while leaving basal locomotor behaviour unchanged. Our findings reveal that these potent effects of Npas4 are under the control of a signalling cascade in MSNs that does not involve molecular targets that have been of interest in drug-related behaviour in the past (i.e. MAPK and PKA pathways as upstream targets, and Fosb and Arc as transcriptional targets). The two central Npas4 properties of an induction that is independent of ubiquitous signalling cascades and a selective effect on cocaine-dependent hyperlocomotion suggest that it should be explored as a novel target in therapies for human drug-related behaviours. What makes our findings especially interesting in this regard is the fact that the differential nature of Npas4 induction is conserved in human iPSC-derived forebrain organoids, thereby opening the possibility that the above cascade might be targeted in the clinical treatment of addiction in humans.

Materials and Methods

Mouse neuron cultures

Striatal and hippocampal neuron cultures were prepared from neonatal C57BL/6N mice and cultured as previously described (Bading & Greenberg, 1991), with the following modifications. Dishes and coverslips were coated with Poly-L-Ornithine (100 mg/ml) for striatal neurons and with Poly-D-Lysine (2 mg/ml) and Laminin (10 µg/ml) for hippocampal neurons. 48 h prior to final experiments, the medium was changed from NBA to transfection medium. Cultures were maintained for 11–12 days, depending on the experiment (see Results section).

Cell culture stimulation and pharmacological substances

For membrane depolarization (HiK), 0.41 volumes of an isosmotic solution were added to the medium as previously described (Hardingham *et al.*, 1997) so that the final K⁺ concentration was raised to 55 mM. For pathway stimulations we used glutamate (1 µM, Tocris), the D1-agonist SKF-38393 (10 µM, Tocris), dopamine (20 µM, BD Biosciences) and forskolin (10 µM, Sigma). Receptors, channels and pathways were blocked with SCH-23390 (10 µM, Tocris), TTX (Na⁺ channels, 1 µM, Biotrend), verapamil (L-type Ca²⁺ channels, 30 µM, HelloBio), D/L-APV (NMDA receptors, 100 µM, Biotrend), UO126 (ERK1/2, 10 µM, Axxora), SB203580 (p38alpha, 10 µM, Calbiochem), SB202190 (p38beta, 10 µM, Tocris), Cyclosporin A (calcineurin, 1 µM, Fluka), FK506 (calcineurin, 1 µM, Axxora), H-89 (PKA, 10 µM, Sigma).

Forebrain organoids

Organoids with a forebrain phenotype were generated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) as previously described (Pasca *et al.*, 2015) with modifications. A human D1 iPSC line was obtained from Dr. Jochen Utikal (DKFZ, Germany). It was generated from healthy human fibroblasts with an inducible polycistronic lentiviral reprogramming vector encoding for KLF4, MYC, POU5F1 and SOX2 (Horschitz *et al.*, 2015). Approximately 10⁴ hiPSCs were aggregated and transferred into low attachment plates. For neuronal induction, dual SMAD inhibition (Chambers *et al.*, 2009) was performed by addition of recombinant Noggin (100 ng/ml, R&D Systems), Dorsomorphin (500 nM, Tocris) and SB 431542 (10 µM, Tocris) to the culture medium for the first 7 days. On day 2, FGF2 (10 ng/ml, Peprotech) was added. From day 7 to 21, free-floating organoids were maintained in neural medium (Neurobasal, B27 without Vitamin A, GlutaMax; all Thermo Fisher) supplemented with FGF2 (10 ng/ml) and EGF (10 ng/ml). On day 22, FGF2 and EGF were replaced by BDNF (10 ng/ml, Peprotech) and NT-3 (10 ng/ml, Peprotech) to support differentiation. From day 35 onwards, organoids were kept in neural medium without growth factors. Wnt and Sonic hedgehog pathway inhibitors (IWP-2, 2 µM, Sigma and Cyclopamine, 1 µM, Merck) were included in the culture media from day 0 to day 35 to ensure forebrain fate adoption.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy MiniKit (Qiagen). 0.5–1 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using random primers and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). For all qPCR experiments except those in forebrain organoids in Fig 2F and G, the TaqMan platform (Applied Biosystems) was used. For qPCR experiments in forebrain organoids, a custom SYBR green (Applied Biosystems) assay was used. Relative quantification for TaqMan analysis was performed with the $\Delta\Delta C_t$ method using TaqMan probes, qPCR Master Mix (Life Technologies) and an ABI7300 thermal cycler (Thermo Fisher). Gusb was used as the endogenous reference gene and all samples were run as duplicates. The following TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific) were used: gusb (Mm00446953_m1), npas4 (Mm00463644_m1), fosb (Mm00500401_m1), arc (Mm00479619_g1), egr1 (Mm00656724_m1), inhba (Mm00434338_m1), cfos (Mm00487425_m1), grin1 (Mm00433790_m1).

grin2a (Mm00433802_m1), grin2b (Mm00433820_m1), nptx2 (Mm00479438_m1), cacna1c (Mm01188822_m1), cacna1d (Mm01209919_m1), gr1a1 (Mm00433753_m1), gr1a3 (Mm00497506_m1). The cycling conditions were as follows: (1×) 2 min at 50°C, (1×) 10 min at 95°C, (55×) 15 s at 95°C and 1 min at 60°C, (1×) until sample collection at 4°C. For SYBR green assays, TBP was used as an endogenous reference gene. The following primers were used: Npas4 (Sense: GTGAGGCTACAGGCCAAGAC

Antisense: AGGGCAGCATGGTCGGAGTG)

Arc (Sense: AAGTCGCACACGCAGCAGAGCA, Antisense: AGGC GGGCGTGAATCACTGGA), TBP (Sense: GCCTGTGCTCACCCAC-CAACAATTT, Antisense: GGTACATGAGAGCCATTACGTC). PCR conditions were as follows: Denaturing: 10 min at 95°C, Cycling (30×): 10 s at 95°C, 10 s at 60°C, 15 s at 72°C.

type="main">Ca²⁺-imaging protocol

Ca²⁺-imaging was performed as previously described (Mauceri *et al*, 2015), with modifications. Neurons were kept in SGG minimal medium at all times during imaging (“salt-glucose-glycine”, 140.1 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 30 mM glucose, 1 mM glycine, 0.5 mM sodium pyruvate). For experiments with GCaMP3-NLS, coverslips with infected neurons were taken out of the incubator, equilibrated in SGG for 10 min and positioned under the microscope in 1 ml SGG to commence imaging. Stimulations were performed by washing out the baseline SGG solution and washing in a solution with SGG and the pharmacological of interest.

type="main">Ca²⁺-imaging analysis

For GCaMP3-NLS imaging, fluorescence traces were plotted as $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$, with F representing the background-subtracted fluorescence intensity at the given time point and F_0 representing the average fluorescence intensity from a baseline time interval at the beginning of the trial.

Recombinant adeno-associated viruses and stereotaxic injections

AAVs with serotype 1/2 were prepared by heparin column purification as previously described (Zhang *et al*, 2007). Neuronal cultures were infected with the constructs indicated in the results section at DIV5. For *in vivo* studies, D1R-MSN and D2R-MSN were labelled by expressing Cre recombinase under the promoter of PPTA (prepro-tachykinin) and ENK (preproenkephalin), respectively. Serotype 9 AAV-PPTA-Cre and AAV-ENK-Cre were generated by Dr. A. Bemelmans (CEA, Molecular Imaging Center (MIRcen); CNRS/UMR9199). The co-injection with the AAVrh9-pCAG-flex-tdTomato-WRPE (AddGene) allowed the Cre-dependent expression of tdTomato under the CMV/actin hybrid promoter (CAG). For morphological analysis of single dendrites, AAV shNpas4-GFP or AAV shscr-GFP were co-injected with a mix of either PPTA-Cre or ENK-Cre and flex-tdTomato in a 1/10,000 ratio, which allows the sparse labelling of either D1R-MSNs or D2-MSNs (Dos Santos *et al*, 2017). For electrophysiological recordings, AAVs expressing shNpas4-GFP or shscr-GFP were co-injected with a mix of either PPTA-Cre or ENK-Cre and flex-tdTomato in a ratio of 1/1,000 to densely label either D1R-MSNs or D2-MSNs. Mice were injected at 7 weeks of age at the

following stereotaxic coordinates: +1.7 mm rostral to the bregma, 1.2 mm lateral to midline and 4.6 mm ventral to the skull surface. The rate of injection was 0.15 μ l/min with a total volume of 1 μ l per striatum. Experiments were carried out after an incubation period of 3 weeks.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, neurons on glass coverslips were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose for 10 min, permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 10 min and blocked in 10% normalized goat serum for 1 h. Subsequently, samples were incubated with primary antibody in solution (PBS, 1% NGS and 0.1% Triton X-100) overnight and washed five times with PBS. Antibodies were used as follows: Darpp-32 (1:1,000, rabbit, Cell Signaling, mAb 2306), Map-2 (1:1,000, mouse, Millipore, MAB3418), GFP (1:1,000, Molecular Probes, A11120). Next, cells were incubated with the same solution but secondary antibodies instead and washed five times in PBS followed by staining with Hoechst (1:3,000). Coverslips were then mounted on glass microscope slides with Mowiol.

Microarray experiments and transcriptome analysis

Hippocampal neurons were infected with rAAV-Npas4-flag of rAAV-GFP-myc for overexpression at DIV5 and harvested at DIV11. For microarray transcriptome analysis we used Illumina MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChips®. RNA samples were processed by the Genomics and Proteomics Core Facility at the DKFZ, Heidelberg. Three biological replicates were performed per condition. RNA quality was assessed using the Nanodrop ND-1000 (Agilent 2100 Bioanalyzer). A total of 4 μ g of the RNA was used for each microarray replicate. Raw microarray data was analysed (DKFZ, Germany) using Chipster (Kallio *et al*, 2011) with R and Bioconductor packages. Statistical tests are *t*-tests over all beads (e.g. for one probeID over all beads of all samples of a group) in original scale. Benjamini-Hochberg correction is applied over all *P*-values of the differential expression analysis. A false discovery rate (FDR) of 5% was utilized as a cut-off for determination of significance. The official gene symbols for the genes enriched in the up- or downregulated groups (1.5-fold cut-off in either direction) were fed into the PANTHER online tool (<http://www.pantherdb.org/>; analysis type: PANTHER overrepresentation test, release: 20170413; GO Ontology database released 2017-05-25) (Mi *et al*, 2013). Analysis settings were for biological process and statistical overrepresentation.

Animals and treatments

Six-week-old male C57BL/6 mice were purchased from Janvier (Le Genest, St. Isle, France) and maintained in a 12 h light/dark cycle in stable conditions of temperature (21 \pm 1°C) and humidity (60%) with *ad libidum* access to food and water. Animals were habituated to the animal facility for 1 week prior to the experiments. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals [86/609/EEC]). The experiments were approved by the local ethics committee “Comité d’Ethique en Experimentation Animale Charles Darwin

C2EA-05". Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in a 0.9% NaCl (w/v) aqueous solution (saline) and administered intraperitoneally at 15 mg/kg in a volume of 10 ml/kg.

Cocaine administration, tissue preparation and immunohistochemistry

After 3 days of daily handling and habituation to an injection of saline solution, mice received a daily injection of saline or cocaine (15 mg/kg) for 5 days in their home cage. At the indicated time after the last saline or cocaine injection (see legends in Figs 1, 5, and 7), mice were rapidly anaesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg; Sanofi-Aventis, Paris, France) and perfused transcardially with a fixative solution containing 4% paraformaldehyde (PFA) (w/v) in 0.1 M Na₂HPO₄/Na₂HPO₄, pH 7.5 at 4°C delivered with a peristaltic pump at 20 ml/min for 5 min. The brain was removed from the skull, post-fixed overnight in 4% PFA, and stored at 4°C. Sections of 30 µm thickness were cut in the frontal plane with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) and kept at -20°C in a solution containing 30% ethylene glycol (v/v), 30% glycerol (v/v) and 0.1 M phosphate buffer. Sections were then processed for immunohistochemistry as follows. Free-floating sections were rinsed three times for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 25 mM Tris-HCl and 0.5 M NaCl, pH 7.5) followed by a blocking and permeabilization step of 1 h at RT in 5% normal goat serum and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in TBS. After three rinses in TBS, the sections were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-Npas4 antibody (gift from Dr. Micheal E. Greenberg, Harvard) diluted at 1:500 and a mouse anti-NeuN antibody (Merck-Millipore) diluted at 1:1,000 or a rabbit anti-Fos antibody (Santa Cruz; sc-166940) diluted 1:500 in blocking buffer described above. Sections were rinsed three times for 10 min in TBS and incubated for 90 min at RT in TBS with a goat anti-rabbit Cy3-conjugated secondary antibody (1:500) and/or a goat anti-mouse Alexa 488 secondary antibody (1:500) from Invitrogen. After three rinses in TBS, sections were incubated for 5 min with Hoechst (Invitrogen) to counterstain the nuclei. Sections were rinsed three times for 10 min in TBS and three times for 10 min in Tris Buffer (0.25 M Tris) before mounting in Vectashield (Vector Laboratories). Quantifications of Npas4- and Fos-positive cells are represented as fold increase normalized to the saline group. The fold increase represents the ratio of the number of Npas4-positive cells in the cocaine-treated group over the number of Npas4-positive cells in the saline group. Quantifications were performed from $n = 4$ mice per group. One slice per mouse was used, which corresponds to 0.98 mm from the Bregma since it offers the ability to analyse the NAc core and shell subdivisions and the dorsal striatum from a single brain slice. For each mouse, 10 images were acquired for the NAc (five images per hemisphere) and 10 images for the dorsal striatum (five per hemisphere). Statistical analyses were performed using the number of mice as the n .

Spine density analysis

Image stacks were taken using a confocal laser scanning microscope (SP5, Leica) equipped with a 1.4 NA objective. The pinhole aperture was set to 1 Airy unit, pixel size to 60 nm and z-step to 210 nm. The excitation wavelength was 488 nm for GFP and 561 nm for

tdTomato, with emission ranges of 500–550 and 570–650 nm, respectively. 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. Segments of secondary dendrites of at least 40 microns in length were analysed.

Statistical analysis of spine imaging and locomotor data

Data are displayed as mean \pm SEM, and statistical analysis was performed with GraphPad Prism software (University of Southampton, Southampton, UK). Where appropriate, unpaired Student's *t*-test or two-way ANOVA (repeated-measure in the case of locomotor sensitization) followed by the *post-hoc* Bonferroni comparisons were performed.

Brain slice preparation and patch-clamp recordings

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the local animal welfare committee (Center for Interdisciplinary Research in Biology Ethics Committee) and the EU (directive 2010/63/EU). Every precaution was taken to minimize stress and the number of animals used in each series of experiments. Animals were housed in standard 12-h light/dark cycles, and food and water were available *ad libitum*. For brain slices preparation, oblique parasagittal (10°) brain slices containing the prefrontal cortex and the corresponding corticostriatal projection field in the nucleus accumbens were prepared from mice (P60–P80) using a vibrating blade microtome (VT1200S, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Brains were sliced in a 5% CO₂/95% O₂-bubbled, ice-cold cutting solution containing in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 pyruvic acid, and then transferred into the same solution at 34°C for 1 h and then moved to room temperature. For patch-clamp recordings, borosilicate glass pipettes of 4–6 MΩ resistance contained for whole-cell recordings (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na, 0.3 EGTA (adjusted to pH 7.35 with KOH). The composition of the extracellular solution was (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 µM pyruvic acid bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. Signals were amplified using EPC10-2 amplifiers (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). All recordings were performed at 34°C using a temperature control system (Bath-controller V, Luigs&Neumann, Ratingen, Germany) and slices were continuously superfused at 2–3 ml/min with the extracellular solution. Slices were visualized on an Olympus BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) using a 4×/0.13 objective for the placement of the stimulating electrode and a 40×/0.80 water-immersion objective for localizing cells for whole-cell recordings. The series resistance was not compensated. Recordings were sampled at 10 kHz, using the Patchmaster v2x32 program (HEKA Elektronik). Paired-pulses protocols. Electrical stimulations were performed with a bipolar electrode (Phymep, Paris, France) placed in the infralimbic cortex (layer V). Electrical stimulations were monophasic at constant current (ISO-Flex

stimulator, AMPI, Jerusalem, Israel). Currents were adjusted to evoke 50–200 pA EPSCs. 20 successive EPSCs were individually measured and then averaged. Variation of input and series resistances above 20% led to the rejection of the experiment.

Electrophysiological data analysis

Off-line analysis was performed with Fitmaster (Heka Elektronik) and Matlab R2016a (Mathworks). Passive and active membrane properties were obtained from 10 pA depolarizing current steps of 500 ms duration from -70 mV holding membrane potential. Input resistance and membrane time constant were measured from voltage traces obtained at -50 pA hyperpolarizing current step. Membrane time constant was estimated from a double exponential fit to the negative deflection of membrane voltage. Sag ratio was calculated for steps in which the voltage deflection reached values between -110 and -90 mV, as the ratio of the maximal negative potential, from 0 to 150 ms, divided by the mean steady state voltage deflection. AP half width duration was measured from the half-height of the AP rising phase. Rise and decay times were calculated from 10 to 90% of the AP waveform. Firing rate was calculated at 2-fold rheobase current step. The input/output gain function was measured as the slope of the linear fit of I - V curve from the rheobase. Statistical analysis was performed with Prism 5.02 software (San Diego, CA, USA). All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed in non-parametric Mann–Whitney, one-sample t -tests and Kruskal–Wallis test using the indicated significance threshold (P).

Locomotor sensitization

Locomotor activity was measured in a circular corridor (i.e. cyclotron) containing four infrared beams placed at every 90° (Imme-tronic, Pessac, France). Locomotor activity was expressed as a cumulative count of crossings between quarters of the cyclotron during 60 min. The locomotor sensitization protocol consisted in four daily sessions during which mice are placed in the activity boxes for 30 min prior and 60 min after an injection of saline or cocaine solution. To assess the efficacy of shNpas4, mice received a fifth injection of a saline or cocaine solution and were perfused (see Tissue preparation section) 1 h after the injection of saline or cocaine to perform Npas4 immunohistological staining and dendritic spine analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in Excel (Microsoft) or Prism (GraphPad). ANOVA P -values and F -stats can be found in Table EV2.

Data availability

The Npas4 overexpression gene expression microarray raw data from Fig 4 is available at Array Express with accession E-MTAB-10706 (link: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-10706/>).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

TL is supported by a scholarship from the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB636). CP is supported by Ecole Normale Supérieure. LV and MN are supported by ANR, Inserm and Collège de France. PV and JC are supported by the CNRS (Centre national de la recherche scientifique), the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médical), Sorbonne Université. PV is supported by the ANR (Agence Nationale pour la Recherche; grants ANR-15-CE16-0017 & ANR-18-CE37-0003). JC and PV were supported by Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20150734352 to JC), and Labex Biopsy Investissements d'Avenir, ANR-11-IDEX-0004-02. AA is the recipient of a PhD fellowship from the French ministry of Research. ESJ is supported by the FRM (fourth year PhD fellowship). GB, PP and HB are supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Deutsch-Israelische Projektkooperation (BA 1007/7-1), DFG/Agence Nationale de la Recherche (ANR) Project GLAD (BA 1007/11-1), European Research Council (ERC) Advanced Grant (233024), the Sonderforschungsbereich (SFB) 1134 of the DFG, and a PhD Stipend of the Excellence Cluster CellNetworks at Heidelberg University to GB. HB is a member of the Excellence Cluster CellNetworks at Heidelberg University. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Author contributions

TL and HB conceived the project. TL, PV, PP, LV and HB designed experiments. TL performed and analysed *in vitro* MSN experiments and designed and produced AAV-constructs for *in vivo* experiments. HGB and PP performed and analysed forebrain organoid experiments. Y-WT performed Npas4-overexpression experiments for microarray analysis. ES-J, AA, M-CA, NH, JC and BF performed immunohistochemistry, morphological analyses, stereotaxic AAV injections and behavioural studies. MN and CP performed the electrophysiological experiments. MN and CP and LV analysed the electrophysiology experimental data. LV designed the electrophysiology experiments. TL, PV, LV, PP and HB wrote the paper with input from all authors.

Conflict of interest

The authors declare that no conflict of interest is present.

References

- Bading H, Greenberg ME (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253: 912–914
- Bernardi RE, Uhrig S, Spanagel R, Hansson AC (2014) Transcriptional regulation of L-type calcium channel subtypes Cav1.2 and Cav1.3 by nicotine and their potential role in nicotine sensitization. *Nicotine Tob Res* 16: 774–785
- Bloodgood BL, Sharma N, Browne HA, Trepman AZ, Greenberg ME (2013) The activity-dependent transcription factor NPAS4 regulates domain-specific inhibition. *Nature* 503: 121–125
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76: 790–803
- Brown TE, Lee BR, Mu P, Ferguson D, Dietz D, Ohnishi YN, Lin Y, Suska A, Ishikawa M, Huang YH et al (2011) A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. *J Neurosci* 31: 8163–8174
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27: 275–280
- Dobi A, Seabold GK, Christensen CH, Bock R, Alvarez VA (2011) Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J Neurosci* 31: 1895–1904

- Dos Santos M, Sallery M, Forget B, Garcia Perez MA, 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. *Biol Psychiatry* 82: 806–818
- Dos Santos M, Cahill EN, Bo GD, Vanhoutte P, Caboche J, Giros B, Heck N (2018) Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. *Brain Struct Funct* 223: 913–923
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385: 260–265
- Heck N, Dos Santos M, Amairi B, Sallery M, Besnard A, Herzog E, Boudier T, Vanhoutte P, Caboche J (2015) A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment *in vivo*. *Brain Struct Funct* 220: 2953–2966
- Hemstedt TJ, Bengtson CP, Ramirez O, Oliveira AMM, Bading H (2017) Reciprocal interaction of dendrite geometry and nuclear calcium-VEGFD signaling gates memory consolidation and extinction. *J Neurosci* 37: 6946–6955
- Hester I, McKee S, Pelletier P, Thompson C, Storbeck C, Mears A, Schulz JB, Hakim AA, Sabourin LA (2007) Transient expression of Nxf, a bHLH-PAS transactivator induced by neuronal preconditioning, confers neuroprotection in cultured cells. *Brain Res* 1135: 1–11
- 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
- Horschitz S, Matthäus F, Groß A, Rosner J, Galach M, Greffrath W, Treede RD, Utikal J, Schloss P, Meyer-Lindenberg A (2015) Impact of preconditioning with retinoic acid during early development on morphological and functional characteristics of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Stem Cell Res (Amst)* 15: 30–41
- Kallio MA, Tuimala JT, Hupponen T, Klemela P, Gentile M, Scheinin I, Koski M, Kaki J, Korpelainen EI (2011) Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC Genom* 12: 507
- Kita K, Shiratani T, Takenouchi K, Fukuzako H, Takigawa M (1999) Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists on cocaine-induced self-stimulation and locomotor activity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 1–7
- Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15: 816–818
- Lee AM, Messing RO (2008) Protein kinases and addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141: 22–57
- Macias W, Carlson R, Rajadhyaksha A, Barczak A, Konradi C (2001) Potassium chloride depolarization mediates CREB phosphorylation in striatal neurons in an NMDA receptor-dependent manner. *Brain Res* 890: 222–232
- Mauceri D, Hagenston AM, Schramm K, Weiss U, Bading H (2015) Nuclear calcium buffering capacity shapes neuronal architecture. *J Biol Chem* 290: 23039–23049
- McGregor A, Roberts DC (1993) Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. *Brain Res* 624: 245–252
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2013) Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 8: 1551–1566
- Pacchioni AM, Vallone J, Worley PF, Kalivas PW (2009) Neuronal pentraxins modulate cocaine-induced neuroadaptations. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 183–192
- Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, Kim CH, Park J-Y, O'Rourke NA, Nguyen KD et al (2015) Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* 12: 671–678
- Pascoli V, Besnard A, Herve D, Pages C, Heck N, Girault JA, Caboche J, Vanhoutte P (2011a) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 69: 218–227
- Pascoli V, Turiault M, Luscher C (2011b) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481: 71–75
- Pascoli V, Terrier J, Espallergues J, Valjent E, O'Connor EC, Luscher C (2014) Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509: 459–464
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245: 1511–1513
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 192–216
- Pulvirenti L, Swerdlow NR, Koob GF (1991) Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroin or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 841–845
- Renthal W, Kumar A, Xiao G, Wilkinson M, Covington HE, Maze I, Sikder D, Robison AJ, LaPlant Q, Dietz DM et al (2009) Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* 62: 335–348
- Schlumm F, Mauceri D, Freitag HE, Bading H (2013) Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class IIa histone deacetylases following synaptic activity. *J Biol Chem* 288: 8074–8084
- 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
- Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M (2008) Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17145–17150
- Spiegel I, Mardinly AR, Gabel HW, Bazinet JE, Couch CH, Tzeng CP, Harmin DA, Greenberg ME (2014) Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs. *Cell* 157: 1216–1229
- Sun WL, Quizon PM, Zhu J (2016) Molecular mechanism: ERK signaling, drug addiction, and behavioral effects. *Prog Mol Biol Transl Sci* 137: 1–40
- Sun X, Lin Y (2016) Npas4: linking neuronal activity to memory. *Trends Neurosci* 39: 264–275
- Taniguchi M, Carreira MB, Cooper YA, Bobadilla A-C, Heinsbroek JA, Koike N, Larson EB, Balmuth EA, Hughes BW, Penrod RD et al (2017) HDAC5 and its target gene, Npas4, function in the nucleus accumbens to regulate cocaine-conditioned behaviors. *Neuron* 96: 130–144.e136
- Zhang S-J, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Bading H (2007) Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53: 549–562
- Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, Katz JL, Xu M (2006) c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* 26: 13287–13296
- Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DA, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H (2009) Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet* 5: e1000604



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse

Marie-Charlotte Allichon^{1,2,3}, Vanesa Ortiz^{4,5}, Paula Pousinha^{4,5}, Andry Andrianarivelo^{1,2,3†}, Anna Petitbon⁶, Nicolas Heck^{1,2,3}, Pierre Trifilieff⁶, Jacques Barik^{4,5} and Peter Vanhoutte^{1,2,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Emmanuel Valjent,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

Reviewed by:

Rosario Moratalla,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain
John Q. Wang,
University of Missouri–Kansas City,
United States

*Correspondence:

Peter Vanhoutte
peter.vanhoutte@
sorbonne-universite.fr

† Present address:

Andry Andrianarivelo,
CNRS UMR 8003, Université de
Paris, Paris, France

Received: 21 October 2021

Accepted: 26 November 2021

Published: 14 December 2021

Citation:

Allichon M-C, Ortiz V, Pousinha P, Andrianarivelo A, Petitbon A, Heck N, Trifilieff P, Barik J and Vanhoutte P (2021) Cell-Type-Specific Adaptions in Striatal Medium-Sized Spiny Neurons and Their Roles in Behavioral Responses to Drugs of Abuse. *Front. Synaptic Neurosci.* 13:799274. doi: 10.3389/fnsyn.2021.799274

¹ CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, Paris, France, ² INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, Paris, France, ³ Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, Paris, France, ⁴ Université Côte d'Azur, Nice, France, ⁵ Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7275, Valbonne, France, ⁶ Université Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, Bordeaux, France

Drug addiction is defined as a compulsive pattern of drug-seeking- and taking- behavior, with recurrent episodes of abstinence and relapse, and a loss of control despite negative consequences. Addictive drugs promote reinforcement by increasing dopamine in the mesocorticolimbic system, which alters excitatory glutamate transmission within the reward circuitry, thereby hijacking reward processing. Within the reward circuitry, the striatum is a key target structure of drugs of abuse since it is at the crossroad of converging glutamate inputs from limbic, thalamic and cortical regions, encoding components of drug-associated stimuli and environment, and dopamine that mediates reward prediction error and incentive values. These signals are integrated by medium-sized spiny neurons (MSN), which receive glutamate and dopamine axons converging onto their dendritic spines. MSN primarily form two mostly distinct populations based on the expression of either DA-D1 (D1R) or DA-D2 (D2R) receptors. While a classical view is that the two MSN populations act in parallel, playing antagonistic functional roles, the picture seems much more complex. Herein, we review recent studies, based on the use of cell-type-specific manipulations, demonstrating that dopamine differentially modulates dendritic spine density and synapse formation, as well as glutamate transmission, at specific inputs projecting onto D1R-MSN and D2R-MSN to shape persistent pathological behavioral in response to drugs of abuse. We also discuss the identification of distinct molecular events underlying the detrimental interplay between dopamine and glutamate signaling in D1R-MSN and D2R-MSN and highlight the relevance of such cell-type-specific molecular studies for the development of innovative strategies with potential therapeutic value for addiction. Because drug addiction is highly prevalent in patients with other psychiatric disorders when compared to the

general population, we last discuss the hypothesis that shared cellular and molecular adaptations within common circuits could explain the co-occurrence of addiction and depression. We will therefore conclude this review by examining how the nucleus accumbens (NAc) could constitute a key interface between addiction and depression.

Keywords: striatum, addiction, psychiatric disorders, synaptic plasticity, signaling, receptor tracking

INTRODUCTION

Drug addiction is defined as a compulsive pattern of drug-seeking/taking behavior despite damaging consequences, as well as a high rate of relapse after an abstinence period. Over the past years, research on preclinical models of addiction established that pathological behavior induced by addictive substances originate from long-lasting alterations of synaptic transmission (Lüscher and Janak, 2021). Drug-evoked changes in synaptic efficacy occur at specific synapses within discrete neuronal populations of the reward circuit and impact both the trafficking and functions of multiple neurotransmitter receptors, as well as downstream signaling pathways and gene expression programs (Nestler and Lüscher, 2019; Salery et al., 2020). This cell-type- and synapse-specific impact of drugs of abuse on synaptic and nuclear events shapes an enduring remodeling of the reward circuitry, which has been proposed to contribute to the transition from casual drug intake to addiction (Nestler, 2014; Lüscher and Janak, 2021).

A hallmark of drugs of abuse is to artificially increase dopamine concentration in the mesocorticolimbic system (Di Chiara and Imperato, 1988), which persistently modulates excitatory glutamate transmission within the reward circuit (Lüscher and Malenka, 2011), thereby hijacking natural reward processing (Keiflin and Janak, 2015). Studies on preclinical models of addiction, as well as Positron Emission Tomography (PET) imaging in humans, strongly support that behavioral alterations resulting from protracted drug exposure involve dopamine-evoked neuronal plasticity mechanisms taking place within the striatum, especially its ventral part, the nucleus accumbens (NAc) (Volkow and Morales, 2015; Salery et al., 2020). The NAc is indeed considered as a key target structure of addictive substances because it receives a dense glutamatergic innervation originating from limbic, thalamic and cortical regions, which encodes components of drug-associated stimuli and environment, along with dopamine projections from the ventral tegmental area (VTA) that mediates reward prediction error and incentive values (Hyman and Malenka, 2001).

The integration of converging glutamate and dopamine inputs by the striatum is critical for its central role in action selection execution, cognition, as well as reward-dependent learning and memory (Hyman and Malenka, 2001; Wickens et al., 2007). Signal integration is mostly achieved by the foremost neuronal population of the striatum that is composed of GABAergic medium-sized spiny neurons (MSN) receiving glutamate axon terminals and dopamine afferents converging onto their dendritic spines (Moss and Bolam, 2008; Doig et al., 2010). MSN primarily form two segregated populations based on the expression of either DA-D1 (D1R) or DA-D2 (D2R) receptors, which are G protein-coupled receptors 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). These two MSN subtypes display distinct projections within the cortico-basal ganglia network with the D1R-MSN and D2R-MSN forming the direct and the indirect pathway, respectively. The classical view is that the activation of direct pathway MSN promotes movement initiation, motivation and reinforcement learning, whereas the activation of the indirect pathway leads to opposite outcomes. Upon dopamine increase, the stimulation of D1R facilitates the activation of D1R-MSN, which promotes reinforcement whereas the stimulation of D2R inhibits D2R-MSN, thereby dampening their “anti-reward” functions (Gerfen and Surmeier, 2011).

Based on this model, it has been proposed that the surge of dopamine evoked in the NAc by drugs of abuse sets a high rewarding value of the drug and drug-associated cues as a consequence of concomitant stimulation of D1R and D2R, resulting in an imbalance between the activities of direct and indirect pathway neurons (Lobo and Nestler, 2011). However, recent evidence challenges a dichotomic model stipulating that the direct and indirect pathways play strictly opposite roles in motivated behavior, reward processing and addiction. In fact, about 5–15% of NAc MSN express both dopamine receptor (DAR) subtypes depending on NAc subregions (Bertran-Gonzalez et al., 2008) and roughly half of NAc D1R-MSN has been shown to project in the ventral pallidum (VP), which is the canonical output structure of indirect pathway MSN (Kupchik et al., 2015; Baimel et al., 2019; Pardo-Garcia et al., 2019). Furthermore, reciprocal lateral inhibitions between the two MSN subtypes has been described, locally in the striatum, and argue in favor of a synergistic, rather than dichotomic, role of direct and indirect pathway MSN in motivated behavior (Burke et al., 2017). Accordingly, it has been shown that NAc D1R-MSN and D2R-MSN are concomitantly activated when rats are trained to press a lever to obtain a food reward (Natsubori et al., 2017). These few examples highlight the need to precisely characterize drug of abuse-evoked adaptations taking place in the two MSN populations and define their roles in controlling behavioral adaptations.

Current cell-type-specific approaches provided new insights into the cellular, molecular and morphological changes in identified neuronal populations, notably owing to the development of reporter mouse lines expressing fluorescent proteins or Cre-recombinase under the control of cell-specific promoters, *drd1a* and *drd2/Adora2a* for D1R-MSN and D2R-MSN, respectively (Gong et al., 2003, 2007; Lemberger et al., 2007; Shuen et al., 2008; Durieux et al., 2009; Valjent et al., 2009), combined with cell-type-specific manipulation of neuronal activity. Since most of the work done on cell-type-specific

impacts of drugs is based on the use of psychostimulant, this review will be focused on studies using this class of addictive substances. We will review how the differential impact of drugs on MSN subtypes at the level of synaptic plasticity, receptor trafficking, protein-protein interactions and intracellular signaling, shapes persistent pathological behavior to psychostimulants. As a perspective, we will also discuss studies showing that multiple drug-evoked adaptations in NAc MSN strikingly parallel the ones observed in preclinical models of other psychiatric disorders, which could sustain the high comorbidity between addictions and other psychiatric disorders.

INPUT-SPECIFIC AND DRUG-EVOKED SYNAPTIC PLASTICITY CHANGES ONTO MSN SUBPOPULATIONS

The transition from recreational to compulsive drug use has been proposed to involve a transition from ventromedial to dorsolateral striatal sub-regions (Belin et al., 2009; Everitt and Robbins, 2016). Therefore, long-lasting cellular and molecular alterations in the NAc and dorsomedial striatum (DMS) are believed to constitute a main step toward the development of addiction and most studies aiming at identifying the neuronal mechanisms of addiction have focused on these brain sub-regions. As detailed elsewhere (Salery et al., 2020), even if some subtleties exist depending on the type of neuronal manipulation (ablation, chemogenetic, and optogenetic manipulations), the tasks used (sensitization, conditioned-place preference, and self-administration) and the behavioral phases studied (acute responses, sensitization, withdrawal, extinction, and reinstatement), studies using cell-specific approaches to selectively manipulate the activity of MSN subpopulations broadly support the classical model of basal ganglia (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Kravitz et al., 2010), with D1R-MSN and D2R-MSN from the NAc and DMS playing antagonistic roles in psychostimulant-induced behavioral alterations. Briefly, ablation (Durieux et al., 2012), reversible blockade of synaptic transmission (Hikida et al., 2010), optogenetic inhibition (Ferguson et al., 2011; Chandra et al., 2013; Calipari et al., 2016) or chemogenetic silencing (Ferguson et al., 2011; Yager et al., 2019) of D1R-MSN tends to dampen behavioral adaptations to psychostimulants, while their optogenetic (Lobo et al., 2010) or chemogenetic (Heinsbroek et al., 2017) activation enhances these behavioral responses. In the case of D2R-MSN, their ablation (Durieux et al., 2009) or chemogenetic inhibition (Ferguson et al., 2011; Bock et al., 2013; Heinsbroek et al., 2017) tends to enhance psychostimulant-evoked adaptations, while their activation by chemogenetic (Farrell et al., 2013) or optogenetic (Lobo et al., 2010; Bock et al., 2013; Song et al., 2014) has opposite effects.

Few studies started to explore the output targets of MSN subpopulations involved in such psychostimulant-induced adaptations. For instance, selective inhibition of D1R-MSN-to-VP projections is sufficient to reduce reinstatement of cocaine seeking (Pardo-Garcia et al., 2019), while stimulation

of putative D1R-MSN-to-lateral hypothalamus projections enhances drug seeking (Larson et al., 2015). In the same vein, depotentiation of D1R-MSN-to-VP projections after repeated cocaine exposure abolishes locomotor sensitization (Creed et al., 2016).

The aforementioned findings support the dichotomic view of D1R-MSN and D2-MSN playing antagonistic roles in drug-induced adaptations. Intriguingly, this goes against recent findings suggesting that the two MSN subtypes rather seem to act in a concerted fashion to control reward-related behavioral responses (Cui et al., 2013; Tecuapetla et al., 2016; Vicente et al., 2016; Sheng et al., 2019). In fact, optogenetic-mediated self-stimulation was described for both D1R-MSN and D2R-MSN of the NAc (Cole et al., 2018) and dorsolateral striatum (DLS) (Vicente et al., 2016). Comparably, inhibition of either MSN subpopulations in the NAc similarly increases unproductive reward seeking (Lafferty et al., 2020). In similar vein, transient optogenetic manipulations of both D1R-MSN and D2R-MSN in the NAc support a pro-motivational role for both cell types (Soares-Cunha et al., 2016, 2018; Natsubori et al., 2017; Tsutsui-Kimura et al., 2017). However, chemogenetic inhibition of NAc or DMS D2R-MSN rather potentiate performance in a motivational task (Carvalho Poyraz et al., 2016; Gallo et al., 2018). Such discrepancies between chemogenetic and optogenetic may stem from differences in duration and/or timing of D2R-MSN manipulations, but also from differential effects on feedback modulation by DA transmission (Olivetti et al., 2020; Soares-Cunha et al., 2020). Of note, activity and recruitment of MSN subpopulations in discrete phases of reward-seeking also seem to differ between sub-regions of the NAc (Tsutsui-Kimura et al., 2017). Altogether, these data regarding non-drug reward suggest a complex interplay between both MSN subpopulations for the control of reward processing rather than purely antagonistic actions, and call for caution regarding the interpretation of the results obtained through manipulations of MSN activity on drug-related behaviors since they could reflect perturbations of reward processing *per se*, rather than specific alterations of drug-induced behavioral adaptations. They also raise the intriguing idea that psychostimulant exposure may induce enduring alterations that bias MSN microcircuits toward a more dichotomic dynamic. This is in accordance with the observation that repeated cocaine exposure strengthens afferences from the basolateral amygdala onto D1R-MSN, but not D2R-MSN (MacAskill et al., 2014) and progressively enhances and dampens the activity of D1R-MSN and D2-MSN, respectively (van Zessen et al., 2021).

In this context, the work from the Luscher's group was pioneer in establishing causal links between drug-induced synaptic adaptations onto D1R-MSN and specific behavioral alterations. They first showed that cocaine-induced locomotor sensitization is associated with a potentiation of cortical excitatory inputs onto NAc D1R-MSN, but not D2R-MSN, which optogenetic-mediated depotentiation reverses cocaine-induced sensitization (Pascoli et al., 2012). It has been proposed that the decrease in G protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK)-dependent signaling in the prelimbic cortex induced by repeated cocaine exposure (Hearing et al., 2013) may participate to cocaine-evoked increase of glutamate transmission onto D1R-MSN.

Genetic ablation of GIRK channel activity in cortical pyramidal neurons has indeed been shown to selectively enhance AMPA receptor-dependent glutamate transmission onto NAc D1R-MSN and increase the motor effects of cocaine (Marron Fernandez de Velasco et al., 2017). Using cocaine self-administration, the Lüscher's group further demonstrated that drug withdrawal induces a potentiation of cortical and hippocampal projections onto NAc D1R-MSNs. Strikingly, optogenetic manipulations of such projections during the withdrawal period was sufficient to reverse specific facets of cocaine self-stimulation, i.e., vigor and seeking when hippocampal and cortical inputs were manipulated, respectively (Pascoli et al., 2014b). More recently, they also established that compulsive self-stimulation of dopaminergic transmission – as a model of drug addiction – relies on the potentiation of excitatory projections from the orbitofrontal cortex onto D1R-MSNs of the dorsal striatum (Pascoli et al., 2018). This elegant set of studies highlights that discrete pathway-specific synaptic alterations mediate specific components of psychostimulant addiction and place D1R-MSN as the main subpopulation involved in such processes. However, increases in glutamate transmission onto D2R-MSN have also been reported after long access to a high dose of cocaine in the self-administration (Terrier et al., 2016) and in mice that have been trained for cocaine-administration but refrained from cocaine seeking when placed in an extinguished context (Roberts-Wolfe et al., 2018). However, further studies need to be conducted to unravel the contribution of changes in glutamate transmission onto D2R-MSN in drug-induced behavioral adaptations. This is a key issue since lateral inhibition of D2R-MSN onto D1R-MSN in the NAc has been suggested to play a main role in cocaine-induced locomotor sensitization (Dobbs et al., 2016; Burke et al., 2017), and recent work showed that cocaine-induced CPP is accompanied by a strengthening of the coupling between hippocampal place cells and D2R-MSN (Sjulson et al., 2018). Nonetheless, it is now timely to further explore molecular mechanisms underlying drug-evoked changes of synaptic efficacy at specific inputs projecting onto MSN subpopulations because it may contribute to the identification of relevant molecular targets for the treatment of addiction (Südhof, 2017).

CELL-TYPE-SPECIFIC SIGNALING TRIGGERED BY DRUGS OF ABUSE AND THEIR ROLE IN BEHAVIORAL ADAPTATIONS

The above described studies demonstrate that dopamine-mediated synaptic plasticity at specific glutamate input onto MSN shapes distinct components of behavioral adaptations to psychostimulants. Therefore, identifying the molecular basis underlying the imbalance between dopamine and glutamate transmission triggered by drugs appears as a major challenge, which may contribute to the development of innovative therapeutic strategies.

Because D1R and D2R are respectively coupled to $G_{s/olf}$ and $G_{i/o}$ subtypes, the increase of dopamine concentration

induced by drugs in the NAc activates the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and downstream protein kinase A (PKA) pathway in D1R-MSN, while repressing it in D2R-MSN. When dopamine concentration rises, multiple PKA targets, including glutamate receptors, are therefore regulated in opposite ways in both MSN populations, which leads to a facilitation of glutamate-dependent activation of D1R-MSN and to its inhibition in D2R-MSN (Gerfen and Surmeier, 2011; Gardoni and Bellone, 2015; van Huijstee and Mansvelder, 2015). Accordingly, *in vivo* deep brain live calcium (Ca^{2+}) imaging performed in the dorsal striatum of anesthetized *drd1a-eGFP* or *drd2-eGFP* mice showed that an acute cocaine injection produces a fast increase of intracellular Ca^{2+} in D1R-MSN, while a progressive decrease is observed in D2R-MSN (Luo et al., 2011). The modulation of both MSN's activity by cocaine was shown to rely on the stimulation of DAR, therefore reflecting a DAR-dependent opposite modulation of neuronal activity of both MSN subtypes by cocaine. This was further confirmed by fiber photometry Ca^{2+} imaging in the NAc of freely moving mice where a single injection increases and decreases the frequency of Ca^{2+} transients in D1R-MSN and D2R-MSN, respectively. Of note, mice that have been conditioned in a cocaine-induced CCP paradigm displayed, on the test day, a transient Ca^{2+} rise in NAc D1R-MSN before entering the drug-paired compartment, while Ca^{2+} decreases in D2R-MSN when the animal stays in this compartment (Calipari et al., 2016). Altogether, these studies show that both cocaine and cocaine-associated cues modulate neuronal activity, and therefore Ca^{2+} signaling, in D1R-MSN and D2R-MSN in an opposite manner. This raised question as to the molecular mechanisms by which the stimulation of DAR controls glutamate-dependent excitation of MSN and Ca^{2+} signals in MSN in response to drugs.

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) are Ca^{2+} -permeable ionotropic glutamate receptors that have long been recognized as essential for synaptic plasticity, as well as learning and memory (Paoletti et al., 2013). They are expressed by all MSNs and D1R stimulation has been shown to potentiate NMDAR functions (Flores-Hernández et al., 2002; Wittmann et al., 2005). The cell-type-specific role of NMDAR in psychostimulant adaptive behavior was first assessed by Heusner and Palmiter (2005) who generated a mouse line expressing in D1R-expressing cells a mutated version of the obligatory GluN1 subunit of NMDAR with reduced Ca^{2+} permeability. This manipulation prevented cocaine-induced locomotor sensitization and CPP (Heusner and Palmiter, 2005), therefore showing that NMDAR expressed in D1R-expressing neuron contribute to the development of the sensitizing and rewarding effects of cocaine. By contrast, the selective deletion of GluN1 in adenosine A2 receptor (A2AR)-expressing MSN (mostly overlapping with D2R-MSN) preserved amphetamine-mediated CPP (Lambot et al., 2016).

In support of an essential role of NAc NMDAR in drug-adaptive behavior, it has been shown that the inhibition of amphetamine-induced CPP and locomotor sensitization observed in mice bearing a deletion of GluN1 in all D1R-expressing neuron could be rescued by viral-mediated restoration

of GluN1 expression in NAc D1R-MSN, or GluN1 deletion from all MSN (Beutler et al., 2011). Regarding the rewarding effects of cocaine, the deletion of GluN1 in D1R-, but not in A2AR-expressing cells, does not impact the development and extinction of cocaine-induced CPP but blunts cocaine-induced CPP reinstatement (Joffe et al., 2017). As observed for the sensitizing effects of cocaine (Beutler et al., 2011), the deletion of GluN1 in both D1R- and A2AR-expressing cells rescues the inhibition of CPP reinstatement of mice bearing a selective knock-out of GluN1 in D1R-expressing cells (Joffe et al., 2017). A balanced NMDAR signaling in D1R- and D2R-expressing cells seems therefore permissive for drug-adaptive behavior.

Altogether these studies support a functional role of the crosstalk between DAR- and NMDAR-dependent signaling in the NAc in long-lasting responses to psychostimulants. To dissect the molecular mechanisms underlying this crosstalk, we developed an *in vitro* model recapitulating main features of signaling events triggered *in vivo* in the striatum in response to acute cocaine exposure. Using cultured striatal neurons stimulated with a D1R agonist or a low dose of glutamate used separately or in combination (Pascoli et al., 2011; Cahill et al., 2014a), we showed that the stimulation of D1R triggers a cAMP-independent potentiation of NMDAR containing the GluN2B subunit. Upon D1R stimulation, the β/γ subunit of $G_{s/olf}$ activates the tyrosine kinase Fyn, which in turn phosphorylates Tyr¹⁴⁷²-GluN2B subunits of NMDAR (Pascoli et al., 2011). This phosphorylation event favors surface expression of NMDAR at synaptic sites (Hallett, 2006) and facilitates NMDAR-dependent Ca^{2+} signals (Pascoli et al., 2011). This crosstalk between D1R and NMDAR has a functional role since the inhibition of Fyn, or pharmacological blockade of GluN2B, blunts the development of cocaine-induced locomotor sensitization and CPP (Pascoli et al., 2011). Downstream from the receptors, the D1R-mediated potentiation of GluN2B-containing NMDAR triggers a Ca^{2+} -dependent activation of the extracellular signal-regulated (ERK) pathways in the striatum in response to acute cocaine exposure (Pascoli et al., 2011), therefore explaining why cocaine-evoked ERK activation in the striatum requires the coincident stimulation of D1R and NMDAR (Valjent et al., 2000; Pascoli et al., 2011, 2014a; Cahill et al., 2014a,b). The ERK pathway is activated selectively in D1R-MSN (Bertran-Gonzalez et al., 2008) by virtually all drugs of abuse (Valjent et al., 2004) and its pharmacological blockade alters the long-term potentiation at cortical inputs onto D1R-MSN (Pascoli et al., 2012). ERK activation in the striatum also controls morphological changes of D1R-MSN induced by cocaine (Ren et al., 2010; Kim et al., 2011; Dos Santos et al., 2017), as well as the development of the sensitizing and rewarding effects of this drug (Valjent et al., 2000, 2006b) and the reconsolidation of drug-paired contextual cues memories (Miller and Marshall, 2005; Valjent et al., 2006a). The key role of the ERK pathway in persistent drug-adaptive behavior relies on the fact that, once activated in dendrites, ERK translocates to the nucleus (Trifilieff et al., 2009), where it launches epigenetic and transcriptional regulations in D1R-MSN that have been exhaustively reviewed elsewhere (Cahill et al., 2014b;

Pascoli et al., 2014a; Salery et al., 2020). Downstream from D1R and NMDAR, the activity of the Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homologous protein 1 (WAVE1), which controls actin polymerization, is also modulated by cocaine exposure. Cell-type-specific manipulation of WAVE1 expression revealed that the selective role of WAVE1 signaling in D1R-, but not in D2R-expressing neurons, in both the development of cocaine-induced CPP and the maintenance of locomotor sensitization, as well as in cocaine-evoked feedback regulation of glutamate transmission onto D1R-MSN (Ceglia et al., 2017).

The canonical cAMP/PKA pathway recruited downstream from D1R stimulation also participates to the potentiation of NMDAR through the direct targeting of NMDAR subunits (Flores-Hernández et al., 2002; Cepeda and Levine, 2006). This pathway also indirectly modulates the amplitude of striatal ERK activation and shapes behavioral responses to psychostimulants in a cell-type-specific manner through the targeting of the cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32). Once phosphorylated by PKA on Thr³⁴, activated DARPP32 inhibits the protein phosphatase 1 (PP1), which reinforces the phosphorylation of MEK and ERK (Valjent et al., 2005). Cell-type-specific analysis of DARPP32 activity revealed that a PKA-dependent activation of DARPP32 occurs in D1R-MSN in response to cocaine, whereas its cyclin-dependent kinase 5 (cdk-5)-mediated inhibition is detected in D2R-MSN (Bateup et al., 2008), which is consistent with the selective activation of ERK in D1R-MSN. At the behavioral level, deletion of DARPP32 in D1R-MSN or D2R-MSN respectively blunts and increases responses to cocaine (Bateup et al., 2010). The fact that DARPP32 constitutive inactivation in all MSN (Valjent et al., 2005) reduces responses to psychostimulants, suggests that activation of cAMP/PKA/DARPP32 pathways in D1R-MSN predominates over DARPP32 signaling in D2R-MSN to drive drug-adaptive behavior. Activation of the cAMP/PKA/DARPP32 also leads to a PP1-mediated inhibition of the striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) targeting ERK, therefore reinforcing ERK activation downstream from D1R. STEP is also involved in the crosstalk between D1R- and NMDAR-signaling since STEP promotes NMDAR endocytosis, through the dephosphorylation of GluN2B subunits and therefore modulates the duration of NMDAR-mediated ERK activation (Paul et al., 2003). However, the cell-type-specific function of STEP in D1R-MSN and D2R-MSN in drugs of abuse-induced behavioral adaptations has not been addressed.

The integration of dopamine and glutamate receptor-dependent signaling therefore controls a complex intracellular signaling network, more precisely characterized in D1R-MSN than in D2R-MSN, which drives electrophysiological, morphological and behavioral long-term effects of psychostimulants. As a consequence, the targeting of dopamine and glutamate receptors has been envisioned to alleviate addiction symptoms in human. However, this approach is associated with a loss of efficacy over time and the appearance of deleterious side effects (Cahill et al., 2014b), likely due to the implication of dopamine and glutamate receptors in multiple

physiological functions. This observation supports that there is need for the identification of new strategies to inhibit the dialogue between dopamine and NMDA receptors.

ROLES OF DOPAMINE RECEPTOR HETEROMERIZATION IN DRUGS OF ABUSE-EVOKED BEHAVIORAL RESPONSES

As discussed above, preclinical models of drug exposure established that distinct phases of drug-adaptive behaviors are driven by dopamine-evoked modulation of synaptic transmission at specific glutamate inputs onto MSN subpopulations (Pascoli et al., 2012, 2014b, 2018; MacAskill et al., 2014; Creed et al., 2016). This calls for a better understanding of the precise molecular events underlying the detrimental interplay between dopamine and glutamate signaling triggered by drugs of abuse. In this context, growing evidence supports that receptor heteromerization, which corresponds to direct physical interaction between receptors of distinct subtypes, is a potent mechanism by which receptors can reciprocally fine-tune their functions. The rising interest for these receptor heteromers mostly stems from their functional properties that are distinct from the individual component receptors. Their ability to dynamically modulate binding affinity of component receptors and downstream signaling pathways positions receptor heteromers as targets to consider for the development of more selective pharmacological treatment for multiple neurological and psychiatric disorders (Fiorentini et al., 2003; Cristina et al., 2006; Wang et al., 2012; Borroto-Escuela et al., 2017). Dopamine receptors have been shown to form oligomers with multiple partner receptors (Andrianarivelo et al., 2019). This chapter will be focused on studies that have provided evidence for a functional role of endogenous heteromers formed between dopamine and glutamate receptors in the striatum on drug-adaptive behavior.

Heteromers formed between DAR and NMDAR have been the subject of intense investigations and are considered as key players for the integration of converging dopamine and glutamate signals (Andrianarivelo et al., 2019). Seminal studies from Fang Liu's group established the existence of direct physical interactions between C-terminal ends of D1R and GluN1 subunits of NMDAR in rat hippocampal tissues (Lee et al., 2002). These heteromers were later detected in the striatum *in vivo* (Cahill et al., 2014a), including at synapses (Fiorentini et al., 2003). The stimulation of NMDAR has been shown to increase the presence of D1R in dendritic spines of MSN through a mechanism involving D1R-GluN1 interaction (Scott et al., 2006), therefore suggesting that D1R-NMDAR complexes are formed within, or at close proximity, of synapses. Functionally, D1R-NMDAR heteromerization is required for the potentiation of NMDA-mediated post-synaptic currents by a D1R agonist, as well as for electrically evoked long-term potentiation of cortical inputs onto D1R-MSN (Cahill et al., 2014a). These latter results therefore position D1R-NMDAR heteromers as molecular bridges linking changes in dopamine transmission

to the modulation of glutamate synapses impinging onto D1R-MSN. By contrast, the direct binding of D2R to GluN2B subunits of NMDAR has been shown to mediate the inhibition of NMDAR by dopamine in D2R-MSN (Liu et al., 2006). These observations raise questions about the potential involvement of those two heteromers subtypes in the activation of D1R-MSN and inhibition of D2R-MSN triggered by drug-evoked increase in dopamine. To address this issue, the impact of repeated exposures to psychostimulant on DAR-NMDAR interactions has been studied in both MSN subtypes. We observed that cocaine-induced locomotor sensitization is associated with an increased heteromerization of both D1R-NMDAR and D2R-NMDAR in the NAc (Andrianarivelo et al., 2021). However, the dynamics of these receptor interactions differs since cocaine-evoked D1R-NMDAR heteromerization appears as a transient phenomenon, whereas D2R-NMDAR heteromerization in the NAc core subdivision outlasts a one-week abstinence period. Owing to a temporally controlled disruption of D1R-NMDAR heteromerization in the NAc, it was shown that D1R-NMDAR interactions are required for cocaine-induced ERK activation and for the potentiation of glutamate transmission onto D1R-MSN induced by repeated cocaine exposures. At the behavioral level, inhibiting D1R-NMDAR selectively blocks the development of cocaine-induced locomotor sensitization and CPP but preserves the maintenance of these behaviors. By contrast, inhibiting D2R-NMDAR complexes alters the maintenance of cocaine's sensitizing effects as well as the reinstatement of cocaine-induced CPP (Andrianarivelo et al., 2021), therefore showing that DAR-NMDAR heteromerization in both MSN subtypes shapes distinct components of psychostimulant-adaptive behaviors. Notably, the implication of these heteromers depends on the nature of the reward since disrupting either heteromer subtype in the NAc preserves food reward processing (Andrianarivelo et al., 2021). The involvement of D2R-NMDAR heteromerization in controlling the maintenance of the sensitizing and rewarding effects of cocaine without impacting on natural reward processing points those heteromers as targets of potential therapeutic value. This assumption is reinforced by the fact that such heteromers are also detected in human post-mortem caudate putamen samples from subjects with psychostimulant use disorder and matched controls (Andrianarivelo et al., 2021). Notably, we found a sharp decrease of D2R protein contents in samples from individuals with psychostimulant use disorder, which could partly explain the diminished bioavailability of D2R described in psychostimulant-dependent subjects by PET-imaging (Volkow et al., 1999; Koob and Volkow, 2016; Trifilieff et al., 2017). However, despite this decreased D2R expression, the remaining pool of D2R forming D2R-NMDAR heteromers was threefold higher in subjects with psychostimulant misuse when compared to matched controls (Andrianarivelo et al., 2021), therefore reinforcing that targeting D2R-NMDAR heteromers may be a strategy to pursue in order to alleviate addiction symptoms in human.

In addition to NMDAR, D1R has been shown to form heteromers with D3R both *in vitro* in heterologous systems and *in vivo* in the NAc (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008), which holds potential interests in preclinical models of addiction. The D3R is enriched in the shell subdivision of the

NAC and is predominantly expressed in D1R-MSN (Sokoloff et al., 1990; Schwartz et al., 1998). Pharmacological activation of D3R potentiates the rewarding effects of cocaine (Caine and Koob, 1995), whereas D3R blockade has the opposite effects (Xi et al., 2005). Accordingly, mice bearing a deletion of D3R display an enhanced acute locomotor response to cocaine, an increased sensitivity to the rewarding effects of amphetamine (Xu et al., 1997), as well as an enhancement of both cocaine-self administration and motivation for cocaine-taking/seeking behavior (Song et al., 2012), therefore supporting that alterations of D3R signaling represent a vulnerability factor toward psychostimulant addiction. D1R-D3R interaction has been shown to increase upon stimulation of both receptors with dopamine and to reciprocally modulate component receptor functions (Fiorentini et al., 2008). Allosteric interactions within this heterodimer are associated with a positive cross-talk between both receptors that drives a downstream beta-arrestin 1-biased signaling triggering ERK activation and promoting locomotor responses (Marcellino et al., 2008; Guitart et al., 2014, 2019). Even though D3R expression and D1R-D3R heteromers have been shown to increase in preclinical models of L-DOPA induced dyskinesia and to promote dyskinesia (Farré et al., 2015; Solis et al., 2017), further work is needed to characterize the potential implication of D1R-D3R heteromers in drug-evoked long-term adaptations.

DRUG-EVOKED MORPHOLOGICAL CHANGES IN MEDIUM-SIZED SPINY NEURONS SUBTYPES AND REGULATION OF SYNAPTOGENESIS

Psychostimulant-evoked connectivity changes of dopaminergic neurons may contribute to the long-lasting effects of psychostimulants. In fact, acute and repeated cocaine injections, as well as cocaine self-administration, trigger an increase of MSN dendritic spine density (Golden and Russo, 2012; Marie et al., 2012; Dos Santos et al., 2017), which has been correlated to an increase in synapse density, as detected by electron microscopy after repeated cocaine exposure (Alcantara et al., 2011). The enhancement of spine density is cell-type-specific as it is confined to D1R-MSN (Dobi et al., 2011; Kim et al., 2011). Multiple strategies, including knock-out, pharmacological dissections, and virally mediated knock-down have been used to identify the molecular bases of this structural plasticity (Russo et al., 2010; Golden and Russo, 2012). The picture that has emerged is the one of pluralism, with multiple molecular pathways appearing as essential for cocaine-induced increased spine density. Extracellular signals, including BDNF or glutamate and dopamine acting in synergy, activate signaling pathways such as Akt (Cahill et al., 2016) or ERK (Ren et al., 2010), which impact on neuronal morphology by modulating actin dynamics through monomeric G proteins such as Rac1 (Dietz et al., 2012). By targeting transcription factors, these same signaling pathways also regulate transcriptional levels of others kinases, such as CDK5 (Kumar et al., 2005) or CaMKII (Robison et al., 2013),

which are themselves controlling structural plasticity (Norrholm et al., 2003). Redundancy between components of this complex signaling network is exemplified by the observation that selective inhibition of the transcription factors Elk1 (Besnard et al., 2011) or CREB (Brown et al., 2011), which are activated downstream from the ERK pathway, fully blocks cocaine-evoked increase in MSN dendritic spine density. Extracellular matrix proteins and cell-cell adhesion also play an essential role in cocaine-induced increase in spine density, notably through integrins (Chen et al., 2008; Wiggins et al., 2009; Kerrisk and Koleske, 2013), SynCAM1 (Giza et al., 2013), or thrombospondin (Wang et al., 2021).

Those studies have been conducted on fixed cerebral tissues, although spine formation involves distinct steps with spine growth, eventually followed by spine maintenance. A time-lapse study allowed to distinguish between these two steps and unraveled distinct underlying molecular mechanisms that are both dependent ERK activation. Spine formation was followed in D1R-MSN by two-photon microscopy in adult striatal slices after co-stimulation with glutamate and a D1R agonist, a co-stimulation paradigm recapitulating the main molecular events triggered by cocaine *in vivo* (Pascoli et al., 2011). This approach established that ERK activation, but neither transcription nor translation, was essential for spine growth. By contrast, the ERK-mediated activation of the cytoplasmic kinase MNK-1, as well as translation, but not transcription, was required for spine maintenance during the hour following spine growth. Hence, spine growth relies on ERK acting on cytoplasmic targets, while early spine maintenance could rely on an ERK-mediated activation of local translation since MNK-1 is known to target the translation initiation factor eIF4E (Bramham et al., 2016). However, long-term spine maintenance involves transcriptional regulation since the blockade of ERK-dependent activation of the transcription factor Elk-1 inhibits spine density increase (Besnard et al., 2011). These findings therefore support a three-step model by which the rapid activation of ERK induced by cocaine initially instructs spine growth, likely through the targeting of cytoplasmic substrates. In a second step, ERK activates local translation through MNK-1 for early spine stabilization and ERK activation finally drives gene expression, notably *via* the targeting of Elk-1, which is required for long-term spine maintenance.

An open question is whether the increased spine density observed after repeated injections is solely due to the first injection, or whether each injection would induce new spines. A single cocaine administration leads to a rapid and long-lasting increase in spine density, which is detectable as early as 1-h post-cocaine exposure and lasts as long as 1 month after cocaine administration (Dos Santos et al., 2017). The fact that the increase in MSN spine density is not higher after chronic regimen compared to single injection may indicate that the enhancement of spine density after chronic cocaine is not the simple sum of repeated waves of spine growth. Accordingly, *in vivo* time-lapse imaging in the prefrontal cortex revealed that each cocaine injection induces spine formation, with some spines being eliminated and others being maintained, drawing a progressive increase in density reaching an overall stable increased density after five cocaine injections (Muñoz-Cuevas et al., 2013). Along those lines, a meta-analysis of articles in which

spine density was measured after various regimens of cocaine administration (Anderson and Self, 2017) reported that, while all studies observed increased spine density after repeated cocaine injections, the only studies reporting long-lasting increase in spine density used protracted regimens of cocaine exposure. This observation supports that, while a single cocaine injection induces spine density increase, not all spines are stabilized and repeated injections induce repeated spine growth phases leading to more persistent increase in spine density. Although comparing the percentages of dendritic spine increase between studies is difficult, it also appears that the amplitude of this increase is not lower after a single injection as compared to chronic regimens, therefore suggesting that the repetition of cocaine administration does not scale up spine density but would allow the persistence over time of newly formed spines. Structural plasticity thus seems a progressive process through repetition of cocaine administration leading to a stabilized increased spine number on D1R-MSN dendrites.

Another important question is how psychostimulant-evoked changes in spine density relate to functional plasticity? An important parameter to consider for this question is also the size of the spine, more specifically the volume of the spine head, since it correlates with synaptic transmission efficacy (Holler et al., 2021). In the case of a single cocaine administration, the increased spine head volume (Dos Santos et al., 2017) correlates with increased synaptic events in activated c-Fos-positive MSN (Koya et al., 2012) and long-term potentiation (Pascoli et al., 2012). However, the picture is far less clear for other regimens of cocaine administration. Chronic cocaine injection induces a reduction of AMPA/NMDA currents ratio (Kourrich et al., 2007) as a consequence of decreased AMPA currents at single synapse (Khibnik et al., 2016), which seems in contradiction with an increased spine density. Following withdrawal from cocaine, the AMPA/NMDA currents ratio is then increased (Kourrich et al., 2007), while spine density remains stable. One possible explanation for this discrepancy is that chronic cocaine induces silent synapses, which have been shown to become active after withdrawal. Hence, while a first cocaine injection would create more dendritic spines and potentiate glutamatergic transmission, repeated injection would induce new spines hosting silent synapses that would become active upon deprivation (Boudreau et al., 2007; Graziane et al., 2016). Along those lines, some studies reported that chronic cocaine increases the percentage of spines with small size, which is compatible with an increase of AMPAR-lacking silent synapses (LaPlant et al., 2010; Dietz et al., 2012; Cahill et al., 2016; Wang et al., 2021), whereas an enhancement of dendritic spine heads has been reported after a protracted withdrawal from cocaine (Graziane et al., 2016). By contrast, other studies reported either no changes (Dumitriu et al., 2012; Heck et al., 2015) or an increase (Dobi et al., 2011) in spine size 1 or 2 days after the last cocaine injection. Nevertheless, a prevailing hypothesis is that an increase in density of small spines followed by an increase in density of larger spines may correspond to cocaine-evoked initial generation of silent synapses followed by their unsilencing during prolonged withdrawal (Wright et al., 2020).

The above-described studies focus on the impact of psychostimulant on dendritic spine density, size and shape. A key question is how such changes in dendritic spines relate to drug-induced alterations in striatal connectivity? Spines are protrusions hosting glutamatergic post-synapse, an increased spine density implies a change in synaptic integration without bringing information on the origin of the afferents. Both D1R-MSN and D2R-MSN share similar morphology and have the same spine density in the dorsal striatum (Suárez et al., 2014; Suarez et al., 2016; Gagnon et al., 2017) as well as in the NAc (MacAskill et al., 2014). The first dendritic segment is devoid of spines, usually ending with a branching point. Spine density is then constant throughout the dendrite, only the very distal part showing a higher density. Glutamate afferents impinging onto MSN's spines in the dorsal striatum originate from neocortex, thalamus, with very few afferents from the amygdala; while in the NAc glutamate inputs come from neocortex, thalamus, basolateral amygdala, and ventral hippocampus (Sesack and Grace, 2010). Projection neurons from the thalamus express the vesicular Glutamate Transporter of type 2 (VGLUT2), while the other afferents express VGLUT1. In the dorsal striatum, the proportion of spines connected with neocortical VGLUT1 boutons or with thalamic VGLUT2 boutons is similar and this applies to glutamate inputs onto both D1R-MSN and D2-MSN (Doig et al., 2010). However, while all VGLUT1 boutons contact spines, 70% of VGLUT2 boutons contact spines and 30% of VGLUT2 boutons make synapse on the dendritic shaft (Doig et al., 2010). Analysis of dendrites in a knock-in mouse allowing the visualization of all VGLUT1 boutons revealed that 50% of spines are in contact with VGLUT1 boutons in both the core (Heck et al., 2015) and the shell (Dos Santos et al., 2017) subdivisions. Furthermore, spines in contact with VGLUT1 and VGLUT2 boutons are uniformly distributed along the dendrite (Dos Santos et al., 2017). This was confirmed by viral labeling of afferents from prefrontal cortex, amygdala, and thalamus, which has revealed that those afferents do not contact spines in a clustered manner (Xia et al., 2020). Upon acute and chronic cocaine administration, the enhancement of spine density is associated with an increase in spines contacting VGLUT1- and VGLUT2-expressing pre-synaptic boutons in the NAc (Heck et al., 2015; Dos Santos et al., 2017). Interestingly, the percentage of spines in contact with VGLUT1 boutons remains constant, meaning that the ratio of spines in contact with VGLUT1 and VGLUT2 afferents is not modified upon exposure to cocaine. Since afferents from prefrontal cortex, amygdala, and ventral hippocampus all express VGLUT1, further studies are needed to depict the respective contribution of those structures to connectivity change on to MSN subpopulations. However, the viral-mediated labeling of amygdalar afferents, coupled to manipulations of their activity through optogenetic, revealed that inhibition of those afferents blunted cocaine-evoked spine density increase, which, however, does not exclude a similar necessity for other afferents (MacAskill et al., 2014).

Dopaminergic afferents also undergo structural plasticity upon cocaine administration. The majority of dopaminergic boutons do not contact MSN dendrites (Descarries et al., 1996), but their density is such that they are never located further than

1micron from a glutamate synapse (Moss and Bolam, 2008). However, 20% of MSN spines have a dopaminergic bouton apposed to their neck (Moss and Bolam, 2008; Dos Santos et al., 2018). Cocaine-induced locomotor sensitization has been shown to correlate with an increase in dopaminergic boutons in the NAc shell subdivision, with a strong increase in the percentage of spines displaying dopaminergic boutons apposed to the neck of MSN dendritic spines (Dos Santos et al., 2018). This remodeling of dopaminergic connectivity may have an important role in modulating plasticity at glutamate synapse since the release of DA within a short-time window has been shown to unlock the head spine size increase induced by glutamate (Yagishita et al., 2014). One long-standing question remains as whether spines bearing dopaminergic boutons apposed to their neck have distinct integrative properties, and whether those spines are preferentially connected with specific glutamate afferents. Recent studies highlighted that glutamate synapses onto MSN originating from distinct brain regions display distinctive properties (Deroche et al., 2020) and are differentially modulated by dopamine (Christoffel et al., 2021). However, further work is needed to determine if these functional differences recorded by electrophysiology have a morphological counterpart.

The mode of formation of striatal synapses may also have relevant implications for rules of connectivity. While an increased density in MSN dendritic spine contacting VGLUT1 boutons and dopaminergic boutons has been reported in response to repeated cocaine administration, no change in the density of VGLUT1 boutons was detected. This implies that newly formed spines contact already existing boutons, which had been proposed as a possible mode of synaptogenesis in the adult brain (Holtmaat and Svoboda, 2009). Glutamatergic boutons making synapses with two spines has been reported in the striatum by electron microscopy (Doig et al., 2010), and the occurrence of two spines in contact with a single bouton is increased after cocaine exposure (Heck et al., 2015; Dos Santos et al., 2017). In addition, time-lapse analysis of synaptogenesis in adult striatum slice showed that new spines contact VGLUT1 boutons present before initiation of spine growth (Dos Santos et al., 2017). The formation of synapses on preexisting boutons could have important implications for the integrative properties of the striatal network. The case of two spines from the same dendrite connected to a common presynapse implies temporal summation of synaptic inputs arising from the same glutamatergic neuron. In the case of a common presynapse for two dendritic spines from two distinct MSN, the newly formed spine would imply an increase in the number of neurons making inputs to a MSN, rather than an increase in the number of inputs arising from the same glutamatergic neuron. Indeed, in the striatum, boutons along the glutamatergic axon are separated by 10 micrometers on average and exhibit rather linear geometry (Kincaid et al., 1998; Zheng and Wilson, 2002), it is therefore unlikely that a glutamatergic axon builds several connections with one MSN dendrite. Dendritic spines have been widely studied in the context of drugs of abuse, bringing insights in their morphological changes, rules of formation and the associated molecular mechanisms. It should however be noted that a putative causal link between dendritic spine changes and

drug-induced behavior remains an open question as long as the methods by which spine changes are blocked interfere with other cellular functions.

STRESS-INDUCED ADAPTATIONS AND THEIR COMMONALITIES WITH DRUG-INDUCED REMODELING: TOWARD THE IDENTIFICATION OF SHARED MOLECULAR SUBSTRATES

This review provided so far compelling evidence for cell-type-specific adaptations in striatal MSN, their role in the neurobiological impact of psychostimulants on the brain, and how they contribute to substance use disorder (SUD). Although SUD are complex multifactorial psychiatric conditions, stressful experiences constitute a primary factor that can potentiate responses to most licit and illicit abused substances and therefore favor the appearance of addictive behaviors (Sinha, 2001). Importantly, stress has been widely acknowledged to increase drug-craving states, which are a deterrent to quit drug use, and risks of relapse when one individual is experiencing negative life experiences or when exposed to stress-associated cues (George and Koob, 2017; Wemm and Sinha, 2019).

Epidemiological and clinical data indicate that people suffering from SUD often experience, at least, a second psychiatric condition, distinct from drug abuse, such as mood disorders. When two pathologies occur, simultaneously or sequentially, in the same person, they are described as comorbid. In addition to time correlation, comorbidity also implies interactions between the illnesses that affect the course and prognosis of both. A major finding in psychopathology research is that comorbidity is the rule rather than the exception. Comorbid SUD and psychiatric disorders are indeed commonly encountered in our modern society. However, they often lack adequate treatment and are mostly associated with poor prognosis. Therefore, comorbidity has emerged as a major clinical, public, and research issue (Dani and Harris, 2005). The high prevalence of co-occurrence of two psychiatric conditions is likely to reflect common, or at least partially overlapping, neuronal substrates as well as genetic and environmental factors. As for SUD, the likelihood of developing mood disorders is also largely influenced by one's ability to cope with stressful challenges (Riboni and Belzung, 2017). Hence, stress stands as a core component for virtually all psychiatric conditions and therefore a close examination of the impact of stress on the brain is essential to understand the potential underpinning mechanisms contributing to SUD and comorbid psychiatric diseases. The hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis is the pivot for the stress response. Over activation of the HPA axis can rapidly switch processes from adaptive to maladaptive, and hence, the stress response can favor numbers of mental conditions and impede their remission; for example, exposure to trauma and stress increases the risks of depressive episodes and facilitates their recurrence. Interaction with modulatory systems is key to apprehend how stress impairs coping with the external

world. The noradrenergic system has been historically the primary focus of stress network. However, a core component of mental disorders implicates alterations of reward processes that are now consistently associated with stress reaction (Marinelli and McCutcheon, 2014; Vaessen et al., 2015; Pignatelli et al., 2017). Indeed, stress-induced alterations of the reward circuitry have been reported in both humans and rodents (Russo and Nestler, 2013). In rodents, a causal link has been established between the dysregulation of VTA DA neurons activity and the appearance of depressive-like symptoms including social withdrawal and anhedonia (Barik et al., 2013; Chaudhury et al., 2013). Increased release of dopamine with the NAc has been observed following acute social defeat, repeated forced swim test or exposure to threatening social cues following chronic social defeat (CSD; Tidey and Miczek, 1996; Lemos et al., 2012; Barik et al., 2013). Notably, this modulation of dopamine release relied on the release of corticotropin releasing hormones, and its action at both CRF type 1 and 2 receptors, as well as glucocorticoids, the ultimate actor of the HPA axis, *via* activation of glucocorticoid receptors.

Several models of stress with various degrees of duration and intensity have been developed in order to mimic symptoms reminiscent of human mood disorders including depression (Gray et al., 2015). Although these models cannot fully replicate the complexity of the human condition, they allow to study key aspects of the pathology and to understand the underlying mechanisms. Amongst these models, the CSD model, which induces depressive-like symptoms in mice susceptible to stress, allows the possibility of studying resiliency to stress as a subgroup of mice submitted to CSD do not develop any sign of the pathology (Golden et al., 2011).

As largely evidenced in the sections related to drugs of abuse, dopamine has a key role in filtering excitatory inputs to the NAc. Similarly, stress has been shown to dysregulate excitatory inputs to the NAc in a projection-specific manner. Indeed, an enhancement of thalamic-NAc and ventral hippocampal-NAc synaptic transmission was observed in mice susceptible to CSD (Bagot et al., 2015; Christoffel et al., 2015; Muir et al., 2020). Conversely, the stimulation of mPFC and amygdala inputs promoted resilience to stress (Bagot et al., 2015). When examining the impact of CSD on AMPA/NMDA ratio, increases were observed only at thalamic-NAc, but not PFC-NAc, synapses (Christoffel et al., 2015). Although, clearly revealing a complex impact of stress at a circuit level, these studies did not address whether these changes in synaptic transmission occurred in specific MSNs subpopulations.

Examining stress-induced cell-type-specific adaptations in the NAc, chronic restraint stress was shown to decrease AMPA/NMDA ratio in D1R-expressing neurons, while D2R-expressing neurons remained unaffected (Lim et al., 2012). The authors have used electrical stimulation to measure AMPA/NMDA ratio therefore it remains to be determined if these adaptations occur at selective inputs onto the NAc. These changes in synaptic efficacy were driven by α -melanocyte-stimulating hormone *via* its action on the melanocortin type 4 receptor (Lim et al., 2012). Targeting this signaling pathway *via* Sh-RNA was sufficient to reverse stress-induced anhedonia

(Lim et al., 2012). Within this line of research, CSD stress was shown to decreased excitatory synaptic inputs to D1R-MSN and increased in D2R-MSN in susceptible mice (Francis et al., 2015). Furthermore, this defeat protocol triggered changes in the intrinsic properties and *in vivo* activity of D1R-MSN; indeed, increased excitability of D1R-MSN was reported following CSD. Activation of D1R-MSN *via* optogenetic stimulation reversed social aversion, while their pharmacogenetic silencing conferred stress susceptibility (Francis et al., 2015). In contrast, manipulating D2R-MSN's activity, either enhancing or decreasing, failed to alter behavioral responses to CSD (Francis et al., 2015). These differences in D1R-MSN vs D2R-MSN responsiveness were also reported using exposure to mild repeated foot shocks (Pignatelli et al., 2021). Increased AMPA/NMDA ratio were observed in D1R-MSNs and reflected an increase in AMPAR currents without alterations in NMDAR-mediated responses in stressed mice when compared to control group. These stress-induced potentiation at D1R-MSNs synapses occurred at inputs originating from the ventral hippocampus and were associated to the appearance of anhedonia and passive coping (Pignatelli et al., 2021). Strikingly, these changes in synaptic plasticity were absent in D2R-MSNs (Pignatelli et al., 2021). Regardless of the nature of the stressor, which varied from physical to psychological, D1R- and D2R-MSN are differently affected by stressful experiences. To date, D1R-MSN appear cardinal in the appearance of symptoms reminiscent of psychiatric conditions such as depression and traumatic memories.

Scarce studies examined the impact of stress on inhibitory synapses within the NAc. Recently, a decreased expression of neuroligin-2 was reported in post-mortem tissue analyses from the NAc of depressed patients (Heshmati et al., 2018). These findings were of importance since, in contrast to other members of the neuroligin family of cell adhesion molecules, neuroligin-2 expression is restricted to inhibitory synapses (Ali et al., 2020). Mirroring the clinical data, CSD triggered a down regulation of neuroligin-2 expression (Heshmati et al., 2018). This decrease was restricted to D1R-MSN as CSD failed to alter its level within D2R-MSN. Further evidence for an impact of stress on NAc inhibitory synapses arose from the study of Heshmati et al. (2020) who demonstrated a decrease in vesicular GABA transporter and gephyrin in postmortem NAc tissues from both depressed patients and socially defeated mice, without determining whether one MSN cell-type was preferentially affected (Heshmati et al., 2020). However, the expression of at least three key molecular components of inhibitory synapses were shown to be modulated by stress and therefore constitute a strong impetus to further investigate how stressful life experiences can alter the balance between excitation and inhibition with the NAc.

Alterations in MSN cellular architecture has been associated with dopamine-dependent neuronal adaptations (Alberquilla et al., 2020), especially in the context of drug administration (see previous section). This structural plasticity contributes to a stable rewiring of synaptic connections impinging on the flow of information within delineated brain networks. Using shRNA analysis, susceptible mice were shown to present reduced dendritic length and branch points in D1R-, but not

D2R-expressing neurons (Francis et al., 2017; Fox et al., 2020). Yet, the spine density remained unaffected in D1R-MSNs, while it appeared enhanced in D2R-MSNs (Francis et al., 2017; Fox et al., 2020). These changes were specific to the NAc as morphology of D1R-MSNs remained unaltered in the dorsal striatum (Fox et al., 2020). Importantly, when probing for both cell-type- and spine-type-specific comparisons, no changes in synaptic strength were reported in either D1R-MSN or D2R-MSN subpopulations of susceptible mice contrasting with the impact of cocaine (Khibnik et al., 2016). Changes in synaptic strength only occurred in resilient mice, which exhibit an increase of mushroom-shaped spines in D1R-MSN and a decrease in D2R-MSN. A better understanding of the mechanism underpinning these functional adaptations in resilient mice may help design new treatments to ease depressive symptoms.

The differential impact of stress on D1R-MSN and D2R-MSN are also found at the molecular and epigenetic levels. Indeed, alterations in gene expression programs underpin enduring physiological and behavioral adaptations that contribute to the appearance of depression symptomatology. Recently, a whole-genome sequencing of patients with recurrent major deficit disorders identified a significant increase of the signal for the *SIRT1* locus, which encodes a histone deacetylase (CONVERGE consortium, 2015). Increases in *SIRT1* is observed following CSD highlighting the translational importance of the findings. Its selective deletion or over-expression in D1R-MSN produced increased and decreased stress coping, respectively, while modulating its expression in D2R-MSN had no consequence on stress outcome (Kim et al., 2016). Of interest, in light of the impact of cocaine on signaling cascades is the modulation by stressful stimuli of the PKA signaling cascade and recruitment of key proteins such as *DFosB* and *CDK5*. Along those lines, Plattner et al. (2015) found that the D1-MSN-specific knock-out of *CDK5* engendered increased cAMP levels and PKA activity, as well as the appearance of resilience to chronic social stress and increased stress coping in response to acute stressors (Plattner et al., 2015). Δ FosB expression has long been known to be sensitive to chronic stress exposure (Hope et al., 1994), but it is only recently that a more detailed cell-specific analyses of its expression have been revealed. Increased expression of Δ FosB was observed in D1R-MSN of resilient mice (Lobo et al., 2013) and its overexpression in this MSN subtype promotes resiliency (Vialou et al., 2010). In contrast, in D2R-MSN, increased Δ FosB levels were observed in susceptible animals following CSD (Lobo et al., 2013). This balance between resilience and susceptibility relies, at least in part, on the epigenetic regulation of the *fosB* gene with distinct contribution of acetylation and methylation in D1R-MSN and D12R-MSN (Hamilton et al., 2018).

Overall, this review highlights the complexities of adaptations induced by natural and addictive rewards triggered within

the NAc emphasizing the differential contribution of D1R-MSN and D2 MSNs. We described how stress also highjacks the reward system to induce adaptations at specific inputs to the NAc and also in a cell-type-specific manner. Although, much work is needed to build a comprehensive landscape of the enduring changes occurring following these stimuli, the development of viral tools in order to probe for cell- and projection-specific adaptations has already allowed to decipher some of the key sequences of events that underlie pathological states based on the deregulation of the reward system. Facing the high prevalence of comorbidities between SUD and other psychiatric disorders, with about 50% of patients suffering from one condition also developing the other, it has been proposed that brain dysfunctions underlying SUD and other mood disorders, such as depression, may share partly common pathophysiological mechanisms. Future work should therefore focus on the identification of common molecular events that are essential for SUD and other psychiatric conditions. This is in line with the recent push toward transdiagnostic approach of psychiatric disorders and recommendations, notably from the NIDA, stressing that therapeutic developments should focus on both SUD and comorbid mood disorders, rather than treating each disease independently, which holds poor efficacy (Ross and Peselow, 2012; Kelly and Daley, 2013).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

The work from PT, JB, and PV's Labs has been supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); the Institut National de la Santé et de la 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; ANR-18-CE37-0003-02; ANR-10-IDEX-03-02, and ANR-16-CE16-0022); the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; DEQ20180339159 and DPA20140629798); Institut de Recherche en Santé Publique (IReSP) Aviesan APP-addiction 2019 (20II146-00); NARSAD Young Investigator Grants from the Brain and Behavior Foundation; the BioPsy labex excellence cluster; and the labex BRAIN.

REFERENCES

Alberquilla, S., Gonzalez-Granillo, A., Martín, E. D., and Moratalla, R. (2020). Dopamine regulates spine density in striatal projection neurons in a concentration-dependent manner. *Neurobiol. Dis.* 134:104666.

Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.

Alcantara, A. A., Lim, H. Y., Floyd, C. E., Garces, J., Mendenhall, J. M., Lyons, C. L., et al. (2011). Cocaine- and morphine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Synapse* 65, 309–320. doi: 10.1002/syn.20849

- Ali, H., Marth, L., and Krueger-Burg, D. (2020). Neuroligin-2 as a central organizer of inhibitory synapses in health and disease. *Sci. Sig.* 13:eabd8379. doi: 10.1126/scisignal.abd8379
- Anderson, E. M., and Self, D. W. (2017). It's only a matter of time: longevity of cocaine-induced changes in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 13, 117–123. doi: 10.1016/j.cobeha.2016.11.013
- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Pousinha, P., Fernandez, S. P., Petitbon, A., De Smedt-Peyrusse, V., et al. (2021). Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Sci. Adv.* 7:eabg5970. doi: 10.1126/sciadv.abg5970
- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P., and Vanhoutte, P. (2019). Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology* 152, 42–50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.003
- Bagot, R. C., Parise, E. M., Peña, C. J., Zhang, H.-X., Maze, I., Chaudhury, D., et al. (2015). Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nat. Commun.* 6:7062. doi: 10.1038/ncomms8062
- Baimel, C., McGarry, L. M., and Carter, A. G. (2019). The projection targets of medium spiny neurons govern cocaine-evoked synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Cell Rep.* 28, 2256–2263.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.074
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S. P., Lanteri, C., Godeheu, G., et al. (2013). Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science* 339, 332–335. doi: 10.1126/science.1226767
- Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D. J., et al. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14845–14850. doi: 10.1073/pnas.1009874107
- Bateup, H. S., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., et al. (2008). Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat. Neurosci.* 11, 932–939. doi: 10.1038/nn.2153
- Belin, D., Jonkman, S., Dickinson, A., Robbins, T. W., and Everitt, B. J. (2009). Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behav. Brain Res.* 199, 89–102. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.027
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamala, M., Herve, D., Valjent, E., et al. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* 28, 5671–5685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008
- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pages, C., Heck, N., et al. (2011). Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J. Neurosci.* 31, 14296–14307. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2890-11.2011
- Beutler, L. R., Wanat, M. J., Quintana, A., Sanz, E., Bamford, N. S., Zweifel, L. S., et al. (2011). Balanced NMDA receptor activity in dopamine D1 receptor (D1R)- and D2R-expressing medium spiny neurons is required for amphetamine sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4206–4211. doi: 10.1073/pnas.1101424108
- Bock, R., Shin, J. H., Kaplan, A. R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P. F., et al. (2013). Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat. Neurosci.* 16, 632–638. doi: 10.1038/nn.3369
- Borroto-Escuela, D. O., Carlsson, J., Ambrogini, P., Narváez, M., Wydra, K., Tarakanov, A. O., et al. (2017). Understanding the role of GPCR heteroreceptor complexes in modulating the brain networks in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11:37. doi: 10.3389/fncel.2017.00037
- Boudreau, A. C., Reimers, J. M., Milovanovic, M., and Wolf, M. E. (2007). Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Neurosci.* 27, 10621–10635. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2163-07.2007
- Bramham, C. R., Jensen, K. B., and Proud, C. G. (2016). Tuning specific translation in cancer metastasis and synaptic memory: control at the MNK-eIF4E axis. *Trends Biochem. Sci.* 41, 847–858. doi: 10.1016/j.tibs.2016.07.008
- Brown, T. E., Lee, B. R., Mu, P., Ferguson, D., Dietz, D., Ohnishi, Y. N., et al. (2011). A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. *J. Neurosci.* 31, 8163–8174. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0016-11.2011
- Burke, D. A., Rotstein, H. G., and Alvarez, V. A. (2017). Striatal local circuitry: a new framework for lateral inhibition. *Neuron* 96, 267–284. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.019
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., et al. (2014a). D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol. Psychiatry* 19, 1295–1304. doi: 10.1038/mp.2014.73
- Cahill, E., Salery, M., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2014b). Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front. Pharmacol.* 4:172. doi: 10.3389/fphar.2013.00172
- Cahill, M. E., Bagot, R. C., Gancarz, A. M., Walker, D. M., Sun, H., Wang, Z.-J., et al. (2016). Bidirectional synaptic structural plasticity after chronic cocaine administration occurs through Rap1 small GTPase signaling. *Neuron* 89, 566–582. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.031
- Caine, S. B., and Koob, G. F. (1995). Pretreatment with the dopamine agonist 7-OH-DPAT shifts the cocaine self-administration dose-effect function to the left under different schedules in the rat. *Behav. Pharmacol.* 6, 333–347.
- Calipari, E. S., Bagot, R. C., Purushothaman, I., Davidson, T. J., Yorgason, J. T., Peña, C. J., et al. (2016). In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2726–2731. doi: 10.1073/pnas.1521238113
- Carvalho Poyraz, F., Holzner, E., Bailey, M. R., Meszaros, J., Kenney, L., Kheirbek, M. A., et al. (2016). Decreasing striatopallidal pathway function enhances motivation by energizing the initiation of goal-directed action. *J. Neurosci.* 36, 5988–6001. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0444-16.2016
- Ceglia, I., Lee, K.-W., Cahill, M. E., Graves, S. M., Dietz, D., Surmeier, D. J., et al. (2017). WAVE1 in neurons expressing the D1 dopamine receptor regulates cellular and behavioral actions of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 1395–1400. doi: 10.1073/pnas.1621185114
- Cepeda, C., and Levine, M. S. (2006). Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci. Signal.* 2006:pe20. doi: 10.1126/stke.3332006pe20
- Chandra, R., Lenz, J. D., Gancarz, A. M., Chaudhury, D., Schroeder, G. L., Han, M.-H., et al. (2013). Optogenetic inhibition of D1R-containing nucleus accumbens neurons alters cocaine-mediated regulation of Tiam1. *Front. Mol. Neurosci.* 6:13. doi: 10.3389/fnmol.2013.00013
- Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., et al. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493, 532–536. doi: 10.1038/nature11713
- Chen, Q., Xiong, X., Lee, T. H., Liu, Y., Wetsel, W. C., and Zhang, X. (2008). Neural plasticity and addiction: integrin-linked kinase and cocaine behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 107, 679–689. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05619.x
- Christoffel, D. J., Golden, S. A., Walsh, J. J., Guise, K. G., Heshmati, M., Friedman, A. K., et al. (2015). Excitatory transmission at thalamo-striatal synapses mediates susceptibility to social stress. *Nat. Neurosci.* 18, 962–964. doi: 10.1038/nn.4034
- Christoffel, D. J., Walsh, J. J., Hoerbel, P., Heifets, B. D., Llorach, P., Lopez, R. C., et al. (2021). Selective filtering of excitatory inputs to nucleus accumbens by dopamine and serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118:e2106648118. doi: 10.1073/pnas.2106648118
- Cole, S. L., Robinson, M. J. F., and Berridge, K. C. (2018). Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *PLoS One* 13:e0207694. doi: 10.1371/journal.pone.0207694
- CONVERGE consortium (2015). Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature* 523, 588–591. doi: 10.1038/nature14659
- Corvol, J. C., Studler, J. M., Schonn, J. S., Girault, J. A., and Hervé, D. (2001). G α olf is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76, 1585–1588. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00201.x
- Creed, M., Ntamati, N. R., Chandra, R., Lobo, M. K., and Lüscher, C. (2016). Convergence of reinforcing and anhedonic cocaine effects in the ventral pallidum. *Neuron* 92, 214–226. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.001
- Cristina, M., Chiara, F., Chiara, B., and Ginetta, C. (2006). The NMDA/D1 receptor complex as a new target in drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* 6, 801–808.
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., et al. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. doi: 10.1038/nature11846

- Dani, J. A., and Harris, R. A. (2005). Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat. Neurosci.* 8, 1465–1470. doi: 10.1038/n1580
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285. doi: 10.1016/0166-2236(90)90110-V
- Deroche, M. A., Lassalle, O., Castell, L., Valjent, E., and Manzoni, O. J. (2020). Cell-type- and endocannabinoid-specific synapse connectivity in the adult nucleus accumbens core. *J. Neurosci.* 40, 1028–1041. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1100-19.2019
- Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S., Bosler, O., and 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.
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). 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, 5274–5278. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274
- Dietz, D. M., Sun, H., Lobo, M. K., Cahill, M. E., Chadwick, B., Gao, V., et al. (2012). Rac1 is essential in cocaine-induced structural plasticity of nucleus accumbens neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 891–896. doi: 10.1038/nn.3094
- Dobbs, L. K., Kaplan, A. R., Lemos, J. C., Matsui, A., Rubinstein, M., and Alvarez, V. A. (2016). Dopamine regulation of lateral inhibition between striatal neurons gates the stimulant actions of cocaine. *Neuron* 90, 1100–1113. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.031
- Dobi, A., Seabold, G. K., Christensen, C. H., Bock, R., and Alvarez, V. A. (2011). Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J. Neurosci.* 31, 1895–1904. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5375-10.2011
- Doig, N. M., Moss, J., and 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010
- Dos Santos, M., Cahill, E. N., Bo, G. D., Vanhoutte, P., Caboche, J., Giros, B., et al. (2018). Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. *Brain Struct. Funct.* 223, 913–923. doi: 10.1007/s00429-017-1532-x
- Dos Santos, M., Salery, M., Forget, B., Garcia Perez, M. A., Betuing, S., Boudier, T., et al. (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. *Biol. Psychiatry* 82, 806–818. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.03.014
- Dumitriu, D., LaPlant, Q., Grossman, Y. S., Dias, C., Janssen, W. G., Russo, S. J., et al. (2012). Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 32, 6957–6966. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5718-11.2012
- Durieux, P. F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., et al. (2009). D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat. Neurosci.* 12, 393–395. doi: 10.1038/nn.2286
- Durieux, P. F., Schiffmann, S. N., and de Kerchove d'Exaerde, A. (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions: dorsal striatum D1R- and D2R-neuron motor functions. *EMBO J.* 31, 640–653. doi: 10.1038/emboj.2011.400
- Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (2016). Drug addiction: updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annu. Rev. Psychol.* 67, 23–50. doi: 10.1146/annurev-psych-122414-033457
- Farré, D., Muñoz, A., Moreno, E., Reyes-Resina, I., Canet-Pons, J., Dopeso-Reyes, I. G., et al. (2015). Stronger dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia. *Mol. Neurobiol.* 52, 1408–1420. doi: 10.1007/s12035-014-8936-x
- Farrell, M. S., Pei, Y., Wan, Y., Yadav, P. N., Daigle, T. L., Urban, D. J., et al. (2013). A *Gas* DREADD mouse for selective modulation of cAMP production in striatopallidal neurons. *Neuropsychopharmacology* 38, 854–862. doi: 10.1038/npp.2012.251
- Felder, C. C., Williams, H. L., and Axelrod, J. (1991). A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein Gi that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6477–6480. doi: 10.1073/pnas.88.15.6477
- Ferguson, S. M., Eskenazi, D., Ishikawa, M., Wanat, M. J., Phillips, P. E. M., Dong, Y., et al. (2011). Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat. Neurosci.* 14, 22–24. doi: 10.1038/nn.2703
- Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., and Missale, C. (2008). Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* 74, 59–69. doi: 10.1124/mol.107.043885
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., and Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D 1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N -methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 20196–20202. doi: 10.1074/jbc.M213140200
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., et al. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J. Neurophysiol.* 88, 3010–3020. doi: 10.1152/jn.00361.2002
- Fox, M. E., Chandra, R., Menken, M. S., Larkin, E. J., Nam, H., Engeln, M., et al. (2020). Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior. *Mol. Psychiatry* 25, 1022–1034. doi: 10.1038/s41380-018-0211-5
- Francis, T. C., Chandra, R., Friend, D. M., Finkel, E., Dayrit, G., Miranda, J., et al. (2015). Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biol. Psychiatry* 77, 212–222. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.021
- Francis, T. C., Chandra, R., Gaynor, A., Konkalmatt, P., Metzbower, S. R., Evans, B., et al. (2017). Molecular basis of dendritic atrophy and activity in stress susceptibility. *Mol. Psychiatry* 22, 1512–1519. doi: 10.1038/mp.2017.178
- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M. G., Borjes, C., Beaulieu, J. M., De Koninck, Y., et al. (2017). Striatal neurons expressing D1 and D2 receptors are morphologically distinct and differentially affected by dopamine denervation in mice. *Sci. Rep.* 7:41432. doi: 10.1038/srep41432
- Gallo, E. F., Meszaros, J., Sherman, J. D., Chohan, M. O., Teboul, E., Choi, C. S., et al. (2018). Accumbens dopamine D2 receptors increase motivation by decreasing inhibitory transmission to the ventral pallidum. *Nat. Commun.* 9:1086. doi: 10.1038/s41467-018-03272-2
- Gardoni, F., and Bellone, C. (2015). Modulation of the glutamatergic transmission by dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9:25. doi: 10.3389/fncel.2015.00025
- George, O., and Koob, G. F. (2017). Individual differences in the neuropsychopathology of addiction. *Dialogues Clin. Neurosci.* 19, 217–229.
- Gerfen, C. R., and Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Ann. Rev. Neurosci.* 34, 441–466. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641
- Giza, J. I., Jung, Y., Jeffrey, R. A., Neugebauer, N. M., Picciotto, M. R., and Biedler, T. (2013). The synaptic adhesion molecule SynCAM 1 contributes to cocaine effects on synapse structure and psychostimulant behavior. *Neuropsychopharmacol* 38, 628–638. doi: 10.1038/npp.2012.226
- Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., and Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* 6, 1183–1191. doi: 10.1038/nprot.2011.361
- Golden, S. A., and Russo, S. J. (2012). Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2:a011957. doi: 10.1101/cshperspect.a011957
- Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C. R., Cummins, A., Hatten, M. E., Heintz, N., et al. (2007). Targeting cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* 27, 9817–9823. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2707-07.2007
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M. L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U. B., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917–925. doi: 10.1038/nature02033
- Gray, J. M., Chaouloff, F., and Hill, M. N. (2015). To stress or not to stress: a question of models. *Curr. Protoc. Neurosci.* 70, 8.33.1–8.33.22. doi: 10.1002/0471142301.ns0833s70
- Graziane, N. M., Sun, S., Wright, W. J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y. H., et al. (2016). Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat. Neurosci.* 19, 915–925. doi: 10.1038/nn.4313
- Guitart, X., Moreno, E., Rea, W., Sánchez-Soto, M., Cai, N.-S., Quiroz, C., et al. (2019). Biased G protein-independent signaling of dopamine D1-D3 receptor

- heteromers in the nucleus accumbens. *Mol. Neurobiol.* 56, 6756–6769. doi: 10.1007/s12035-019-1564-8
- Guitart, X., Navarro, G., Moreno, E., Yano, H., Cai, N.-S., Sanchez-Soto, M., et al. (2014). Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. *Mol. Pharmacol.* 86, 417–429. doi: 10.1124/mol.114.093096
- Hallett, P. J. (2006). Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J. Neurosci.* 26, 4690–4700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0792-06.2006
- Hamilton, P. J., Burek, D. J., Lombroso, S. L., Neve, R. L., Robison, A. J., Nestler, E. J., et al. (2018). Cell-type-specific epigenetic editing at the *fosb* gene controls susceptibility to social defeat stress. *Neuropsychopharmacology* 43, 272–284. doi: 10.1038/npp.2017.88
- Hearing, M., Kotecki, L., Marron Fernandez de Velasco, E., Fajardo-Serrano, A., Chung, H. J., Luján, R., et al. (2013). Repeated cocaine weakens GABAB-girk signaling in layer 5/6 pyramidal neurons in the prelimbic cortex. *Neuron* 80, 159–170. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.019
- Heck, N., Dos Santos, M., Amairi, B., Salery, M., Besnard, A., Herzog, E., et al. (2015). A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. *Brain Struct. Funct.* 220, 2953–2966. doi: 10.1007/s00429-014-0837-2
- Heinsbroek, J. A., Neuhofer, D. N., Griffin, W. C., Siegel, G. S., Bobadilla, A.-C., Kupchik, Y. M., et al. (2017). Loss of plasticity in the D2-accumbens pallidal pathway promotes cocaine seeking. *J. Neurosci.* 37, 757–767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2659-16.2016
- Heshmati, M., Aleyasin, H., Menard, C., Christoffel, D. J., Flanigan, M. E., Pfau, M. L., et al. (2018). Cell-type-specific role for nucleus accumbens neurotrophin-2 in depression and stress susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 1111–1116. doi: 10.1073/pnas.1719014115
- Heshmati, M., Christoffel, D. J., LeClair, K., Cathomas, F., Golden, S. A., Aleyasin, H., et al. (2020). Depression and social defeat stress are associated with inhibitory synaptic changes in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 40, 6228–6233. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2568-19.2020
- Heusner, C. L., and Palmiter, R. D. (2005). Expression of mutant NMDA receptors in dopamine D₁ receptor-expressing cells prevents cocaine sensitization and decreases cocaine preference. *J. Neurosci.* 25, 6651–6657. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1474-05.2005
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., and Nakanishi, S. (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66, 896–907. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.011
- Holler, S., Köstinger, G., Martin, K. A. C., Schuhknecht, G. F. P., and Stratford, K. J. (2021). Structure and function of a neocortical synapse. *Nature* 591, 111–116. doi: 10.1038/s41586-020-03134-2
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647–658. doi: 10.1038/nrn2699
- Hope, B. T., Nye, H. E., Kelz, M. B., Self, D. W., Iadarola, M. J., Nakabeppu, Y., et al. (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. doi: 10.1016/0896-6273(94)90061-2
- Hyman, S. E., and Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 695–703. doi: 10.1038/35094560
- Joffe, M. E., Vitter, S. R., and Grueter, B. A. (2017). GluN1 deletions in D1- and A2A-expressing cell types reveal distinct modes of behavioral regulation. *Neuropharmacology* 112, 172–180. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.026
- Keiflin, R., and Janak, P. H. (2015). Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron* 88, 247–263. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.037
- Kelly, T. M., and Daley, D. C. (2013). Integrated treatment of substance use and psychiatric disorders. *Soc. Work Public Health* 28, 388–406. doi: 10.1080/19371918.2013.774673
- Kerrisk, M. E., and Koleske, A. J. (2013). Arg kinase signaling in dendrite and synapse stabilization pathways: memory, cocaine sensitivity, and stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2496–2500. doi: 10.1016/j.biocel.2013.07.018
- Khibnik, L. A., Beaumont, M., Doyle, M., Heshmati, M., Slesinger, P. A., Nestler, E. J., et al. (2016). Stress and cocaine trigger divergent and cell type-specific regulation of synaptic transmission at single spines in nucleus accumbens. *Biol. Psychiatry* 79, 898–905. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.05.022
- Kim, H.-D., Hesterman, J., Call, T., Magazu, S., Keeley, E., Armenta, K., et al. (2016). SIRT1 mediates depression-like behaviors in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 36, 8441–8452. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0212-16.2016
- Kim, J., Park, B.-H., Lee, J. H., Park, S. K., and Kim, J.-H. (2011). Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. *Biol. Psychiatry* 69, 1026–1034. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.01.013
- Kincaid, A. E., Zheng, T., and Wilson, C. J. (1998). Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J. Neurosci.* 18, 4722–4731. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-12-04722.1998
- Koob, G. F., and Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 760–773. doi: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8
- Kourrich, S., Rothwell, P. E., Klug, J. R., and Thomas, M. J. (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 27, 7921–7928. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1859-07.2007
- Koya, E., Cruz, F. C., Ator, R., Golden, S. A., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., et al. (2012). Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. *Nat. Neurosci.* 15, 1556–1562. doi: 10.1038/nn.3232
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., et al. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626. doi: 10.1038/nature09159
- Kumar, A., Choi, K.-H., Renthall, W., Tsankova, N. M., Theobald, D. E. H., Truong, H.-T., et al. (2005). Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48, 303–314. doi: 10.1016/j.neuron.2005.09.023
- Kupchik, Y. M., Brown, R. M., Heinsbroek, J. A., Lobo, M. K., Schwartz, D. J., and Kalivas, P. W. (2015). Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nat. Neurosci.* 18, 1230–1232. doi: 10.1038/nn.4068
- Lafferty, C. K., Yang, A. K., Mendoza, J. A., and Britt, J. P. (2020). Nucleus accumbens cell type- and input-specific suppression of unproductive reward seeking. *Cell Rep.* 30, 3729–3742.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.095
- Lambot, L., Chaves Rodriguez, E., Houtteman, D., Li, Y., Schiffmann, S. N., Gall, D., et al. (2016). Striatopallidal neuron NMDA receptors control synaptic connectivity, locomotor, and goal-directed behaviors. *J. Neurosci.* 36, 4976–4992. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2717-15.2016
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B. L., et al. (2010). Dnm3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 13, 1137–1143. doi: 10.1038/nn.2619
- Larson, E. B., Wissman, A. M., Loriaux, A. L., Kourrich, S., and Self, D. W. (2015). Optogenetic stimulation of accumbens shell or shell projections to lateral hypothalamus produce differential effects on the motivation for cocaine. *J. Neurosci.* 35, 3537–3543. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1524-14.2015
- Lee, F. J. S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., et al. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111, 219–230. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00962-5
- Lemberger, T., Parlato, R., Dassel, D., Westphal, M., Casanova, E., Turiault, M., et al. (2007). Expression of Cre recombinase in dopaminergic neurons. *BMC Neurosci.* 8:4. doi: 10.1186/1471-2202-8-4
- Lemos, J. C., Wanat, M. J., Smith, J. S., Reyes, B. A. S., Hollon, N. G., Van Bockstaele, E. J., et al. (2012). Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive. *Nature* 490, 402–406. doi: 10.1038/nature11436
- Lim, B. K., Huang, K. W., Grueter, B. A., Rothwell, P. E., and Malenka, R. C. (2012). Anhedonia requires MC4R-mediated synaptic adaptations in nucleus accumbens. *Nature* 487, 183–189. doi: 10.1038/nature11160
- Liu, X.-Y., Chu, X.-P., Mao, L.-M., Wang, M., Lan, H.-X., Li, M.-H., et al. (2006). Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* 52, 897–909. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.011
- Lobo, M. K., Covington, H. E., Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H., Dames-Werno, D., et al. (2010). Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330, 385–390. doi: 10.1126/science.1188472

- Lobo, M. K., and 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. doi: 10.3389/fnana.2011.00041
- Lobo, M. K., Zaman, S., Domez-Werno, D. M., Koo, J. W., Bagot, R. C., DiNieri, J. A., et al. (2013). FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *J. Neurosci.* 33, 18381–18395. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013
- Luo, Z., Volkow, N. D., Heintz, N., Pan, Y., and 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2369-11.2011
- Lüscher, C., and Janak, P. H. (2021). Consolidating the circuit model for addiction. *Annu. Rev. Neurosci.* 44, 173–195. doi: 10.1146/annurev-neuro-092920-123905
- Lüscher, C., and Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.017
- MacAskill, A. F., Cassel, J. M., and Carter, A. G. (2014). Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 17, 1198–1207. doi: 10.1038/nn.3783
- Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., et al. (2008). Identification of dopamine D1–D3 receptor heteromers: indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* 283, 26016–26025. doi: 10.1074/jbc.M710349200
- Marie, N., Canestrelli, C., and Noble, F. (2012). Transfer of neuroplasticity from nucleus accumbens core to shell is required for cocaine reward. *PLoS One* 7:e30241. doi: 10.1371/journal.pone.0030241
- Marinelli, M., and McCutcheon, J. E. (2014). Heterogeneity of dopamine neuron activity across traits and states. *Neuroscience* 282, 176–197. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.034
- Marron Fernandez de Velasco, E., Carlblom, N., Xia, Z., and Wickman, K. (2017). Suppression of inhibitory G protein signaling in forebrain pyramidal neurons triggers plasticity of glutamatergic neurotransmission in the nucleus accumbens core. *Neuropharmacology* 117, 33–40. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.021
- Miller, C. A., and Marshall, J. F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47, 873–884. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.006
- Moss, J., and Bolam, J. P. (2008). A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28, 11221–11230. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2780-08.2008
- Muir, J., Tse, Y. C., Iyer, E. S., Biris, J., Cvetkovska, V., Lopez, J., et al. (2020). Ventral hippocampal afferents to nucleus accumbens encode both latent vulnerability and stress-induced susceptibility. *Biol. Psychiatry* 88, 843–854. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.05.021
- Muñoz-Cuevas, F. J., Athilingam, J., Piscopo, D., and Wilbrecht, L. (2013). Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.* 16, 1367–1369. doi: 10.1038/nn.3498
- Natsubori, A., Tsutsui-Kimura, I., Nishida, H., Bouchekioua, Y., Sekiya, H., Uchigashima, M., et al. (2017). Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food-incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity. *J. Neurosci.* 37, 2723–2733. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017
- Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 76, 259–268. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.004
- Nestler, E. J., and Lüscher, C. (2019). The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron* 102, 48–59. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.016
- Norrholm, S. D., Bibb, J. A., Nestler, E. J., Ouimet, C. C., Taylor, J. R., and Greengard, P. (2003). Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience* 116, 19–22. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00560-2
- Olivetti, P. R., Balsam, P. D., Simpson, E. H., and Kellendonk, C. (2020). Emerging roles of striatal dopamine D2 receptors in motivated behaviour: implications for psychiatric disorders. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 126, 47–55. doi: 10.1111/bcpt.13271
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. doi: 10.1038/nrn3504
- Pardo-García, T. R., García-Keller, C., Penalzoza, T., Richie, C. T., Pickel, J., Hope, B. T., et al. (2019). Ventral pallidum is the primary target for accumbens D1 projections driving cocaine seeking. *J. Neurosci.* 39, 2041–2051. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2822-18.2018
- Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.-A., et al. (2011). Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* 69, 218–227. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.08.031
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014a). Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biol. Psychiatry* 76, 917–926. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.04.005
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'Connor, E. C., and Lüscher, C. (2014b). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509, 459–464. doi: 10.1038/nature13257
- Pascoli, V., Hiver, A., Van Zessen, R., Loureiro, M., Achargui, R., Harada, M., et al. (2018). Stochastic synaptic plasticity underlying compulsion in a model of addiction. *Nature* 564, 366–371. doi: 10.1038/s41586-018-0789-4
- Pascoli, V., Turiault, M., and Lüscher, C. (2012). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71–75. doi: 10.1038/nature10709
- Paul, S., Nairn, A. C., Wang, P., and Lombroso, P. J. (2003). NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nat. Neurosci.* 6, 34–42. doi: 10.1038/nn989
- Pignatelli, M., Tejada, H. A., Barker, D. J., Bontempi, L., Wu, J., Lopez, A., et al. (2021). Cooperative synaptic and intrinsic plasticity in a dysynaptic limbic circuit drive stress-induced anhedonia and passive coping in mice. *Mol. Psychiatry* 26, 1860–1879. doi: 10.1038/s41380-020-0686-8
- Pignatelli, M., Umanah, G. K. E., Ribeiro, S. P., Chen, R., Karuppagounder, S. S., Yau, H.-J., et al. (2017). Synaptic plasticity onto dopamine neurons shapes fear learning. *Neuron* 93, 425–440. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.030
- Plattner, F., Hayashi, K., Hernández, A., Benavides, D. R., Tassin, T. C., Tan, C., et al. (2015). The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors. *Nat. Neurosci.* 18, 1094–1100. doi: 10.1038/nn.4066
- Ren, Z., Sun, W. L., Jiao, H., Zhang, D., Kong, H., Wang, X., et al. (2010). Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* 168, 48–60. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.034
- Riboni, F. V., and Belzung, C. (2017). Stress and psychiatric disorders: from categorical to dimensional approaches. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 14, 72–77. doi: 10.1016/j.cobeha.2016.12.011
- Roberts-Wolfe, D., Bobadilla, A.-C., Heinsbroek, J. A., Neuhofer, D., and Kalivas, P. W. (2018). Drug refraining and seeking potentiate synapses on distinct populations of accumbens medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 38, 7100–7107. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0791-18.2018
- Robison, A. J., Vialou, V., Mazei-Robison, M., Feng, J., Kourrich, S., Collins, M., et al. (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. *J. Neurosci.* 33, 4295–4307. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5192-12.2013
- Ross, S., and Peselow, E. (2012). Co-occurring psychotic and addictive disorders: neurobiology and diagnosis. *Clin. Neuropharmacol.* 35, 235–243. doi: 10.1097/WNF.0b013e318261e193
- Russo, S. J., Dietz, D. M., Dumitriu, D., Morrison, J. H., Malenka, R. C., and Nestler, E. J. (2010). The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci.* 33, 267–276. doi: 10.1016/j.tins.2010.02.002
- Russo, S. J., and Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609–625. doi: 10.1038/nrn3381
- Salery, M., Trifilieff, P., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2020). From signaling molecules to circuits and behaviors: cell-type-specific adaptations to psychostimulant exposure in the striatum. *Biol. Psychiatry* 87, 944–953. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.11.001

- Schwartz, J.-C., Diaz, J., Bordet, R., Griffon, N., Perachon, S., Pilon, C., et al. (1998). Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 236–242. doi: 10.1016/S0165-0173(97)00046-5
- Scott, L., Zelenin, S., Malmersjö, S., Kowalewski, J. M., Markus, E. Z., Nairn, A. C., 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. doi: 10.1073/pnas.0505557103
- Sesack, S. R., and Grace, A. A. (2010). Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27–47. doi: 10.1038/npp.2009.93
- Sheng, M., Lu, D., Shen, Z., and Poo, M. (2019). Emergence of stable striatal D1R and D2R neuronal ensembles with distinct firing sequence during motor learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 11038–11047. doi: 10.1073/pnas.1901712116
- Shuen, J. A., Chen, M., Gloss, B., and Calakos, N. (2008). Drd1a-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *J. Neurosci.* 28, 2681–2685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5492-07.2008
- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology* 158, 343–359. doi: 10.1007/s002130100917
- Sjulson, L., Peyrache, A., Cumpelik, A., Cassataro, D., and Buzsáki, G. (2018). Cocaine place conditioning strengthens location-specific hippocampal coupling to the nucleus accumbens. *Neuron* 98, 926–934.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.015
- Soares-Cunha, C., Coimbra, B., David-Pereira, A., Borges, S., Pinto, L., Costa, P., et al. (2016). Activation of D2 dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens increases motivation. *Nat. Commun.* 7:11829. doi: 10.1038/ncomms11829
- Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Domingues, A. V., Vasconcelos, N., Sousa, N., and Rodrigues, A. J. (2018). Nucleus accumbens microcircuit underlying D2-MSN-driven increase in motivation. *eNeuro* 5, ENEURO.0386–18.2018. doi: 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., et al. (2020). Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol. Psychiatry* 25, 3241–3255. doi: 10.1038/s41380-019-0484-3
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.-P., and Bouthenet, M.-L. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146–151.
- Solis, O., Garcia-Montes, J. R., Gonzalez-Granillo, A., Xu, M., and Moratalla, R. (2017). Dopamine D3 receptor modulates L-DOPA-induced dyskinesia by targeting D1 receptor-mediated signaling. *Cereb. Cortex* 27, 435–446. doi: 10.1093/cercor/bhv231
- Song, R., Zhang, H.-Y., Li, X., Bi, G.-H., Gardner, E. L., and Xi, Z.-X. (2012). Increased vulnerability to cocaine in mice lacking dopamine D3 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17675–17680. doi: 10.1073/pnas.1205297109
- Song, S. S., Kang, B. J., Wen, L., Lee, H. J., Sim, H., Kim, T. H., et al. (2014). Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization. *Front. Behav. Neurosci.* 8:336. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00336
- Suarez, L. M., Solis, O., Aguado, C., Lujan, R., and Moratalla, R. (2016). L-DOPA oppositely regulates synaptic strength and spine morphology in D1 and D2 striatal projection neurons in dyskinesia. *Cereb. Cortex* 26, 4253–4264. doi: 10.1093/cercor/bhw263
- Suárez, L. M., Solis, O., Carames, J. M., Taravini, I. R., Solis, J. M., Murer, M. G., et al. (2014). L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor D2-expressing projection neurons in dyskinetic mice. *Biol. Psychiatry* 75, 711–722. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.05.006
- Südhof, T. C. (2017). Molecular neuroscience in the 21st century: a personal perspective. *Neuron* 96, 536–541. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.005
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., and Costa, R. M. (2016). Complementary contributions of striatal projection pathways to action initiation and execution. *Cell* 166, 703–715. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.032
- Terrier, J., Lüscher, C., and 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. doi: 10.1038/npp.2015.345
- Tidey, J. W., and Miczek, K. A. (1996). Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 721, 140–149. doi: 10.1016/0006-8993(96)00159-X
- Trifilieff, P., Ducrocq, F., van der Veldt, S., and Martinez, D. (2017). Blunted dopamine transmission in addiction: potential mechanisms and implications for behavior. *Semin. Nucl. Med.* 47, 64–74. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.09.003
- Trifilieff, P., Lavaur, J., Pascoli, V., Kappès, V., Brami-Cherrier, K., Pagès, C., et al. (2009). Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 325–336. doi: 10.1016/j.mcn.2009.04.006
- Tsutsui-Kimura, I., Takiue, H., Yoshida, K., Xu, M., Yano, R., Ohta, H., et al. (2017). Dysfunction of ventrolateral striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons impairs instrumental motivation. *Nat. Commun.* 8:14304. doi: 10.1038/ncomms14304
- Vaessen, T., Hernaus, D., Myin-Germeys, I., and van Amelsvoort, T. (2015). The dopaminergic response to acute stress in health and psychopathology: a systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 56, 241–251. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.07.008
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., and Girault, J.-A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547. doi: 10.1016/j.tins.2009.06.005
- Valjent, E., Corbille, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Herve, D., and Girault, J.-A. (2006a). Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2932–2937. doi: 10.1073/pnas.0511030103
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Trzaskos, J. M., Girault, A., and Hervé, D. (2006b). Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 11:20. doi: 10.1186/1471-2202-7-20
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Pagès, C., Besson, M.-J., Maldonado, R., and Caboche, J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 20, 8701–8709. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-23-08701.2000
- Valjent, E., Pages, C., Herve, D., Girault, J.-A., and Caboche, J. (2004). Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1826–1836. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03278.x
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J. C., et al. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 491–496.
- van Huijstee, A. N., and Mansvelder, H. D. (2015). Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Front. Cell. Neurosci.* 8:466. doi: 10.3389/fncel.2014.00466
- van Zessen, R., Li, Y., Marion-Poll, L., Hulo, N., Flakowski, J., and Lüscher, C. (2021). Dynamic dichotomy of accumbal population activity underlies cocaine sensitization. *Elife* 10:e66048. doi: 10.7554/eLife.66048
- Vialou, V., Robison, A. J., LaPlant, Q. C., Covington, H. E., Dietz, D. M., Ohnishi, Y. N., et al. (2010). ΔFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci.* 13, 745–752. doi: 10.1038/nn.2551
- Vicente, A. M., Galvão-Ferreira, P., Tecuapetla, F., and Costa, R. M. (2016). Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Curr. Biol.* 26, R267–R269. doi: 10.1016/j.cub.2016.02.036
- Volkow, N. D., and Morales, M. (2015). The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell* 162, 712–725. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.046
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Gifford, A., et al. (1999). Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *Am. J. Psychiatry* 156, 1440–1443. doi: 10.1176/ajp.156.9.1440
- Wang, J., Li, K.-L., Shukla, A., Beroun, A., Ishikawa, M., Huang, X., et al. (2021). Cocaine triggers astrocyte-mediated synaptogenesis. *Biol. Psychiatry* 89, 386–397. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.08.012
- Wang, M., Wong, A. H., and Liu, F. (2012). Interactions between NMDA and dopamine receptors: a potential therapeutic target. *Brain Res.* 1476, 154–163. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.029
- Wemm, S. E., and Sinha, R. (2019). Drug-induced stress responses and addiction risk and relapse. *Neurobiol. Stress* 10, 100148. doi: 10.1016/j.yjnstr.2019.100148

- Wickens, J. R., Horvitz, J. C., Costa, R. M., and Killcross, S. (2007). Dopaminergic mechanisms in actions and habits. *J. Neurosci.* 27, 8181–8183. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1671-07.2007
- Wiggins, A. T., Pacchioni, A. M., and Kalivas, P. W. (2009). Integrin expression is altered after acute and chronic cocaine. *Neurosci. Lett.* 450, 321–323. doi: 10.1016/j.neulet.2008.12.006
- Wittmann, M., Marino, M. J., Henze, D. A., Seabrook, G. R., and 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. Ther.* 313, 594–603. doi: 10.1124/jpet.104.080200
- Wright, W. J., Graziane, N. M., Neumann, P. A., Hamilton, P. J., Cates, H. M., Fuerst, L., et al. (2020). Silent synapses dictate cocaine memory destabilization and reconsolidation. *Nat. Neurosci.* 23, 32–46. doi: 10.1038/s41593-019-0537-6
- Xi, Z.-X., Gilbert, J. G., Pak, A. C., Ashby, C. R. Jr., Heidbreder, C. A., and Gardner, E. L. (2005). Selective dopamine D3 receptor antagonism by SB-277011A attenuates cocaine reinforcement as assessed by progressive-ratio and variable-cost-variable-payoff fixed-ratio cocaine self-administration in rats. *Eur. J. Neurosci.* 21, 3427–3438. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04159.x
- Xia, S., Yu, J., Huang, X., Sesack, S. R., Huang, Y. H., Schlüter, O. M., et al. (2020). Cortical and thalamic interaction with amygdala-to-accumbens synapses. *J. Neurosci.* 40, 7119–7132. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1121-20.2020
- Xu, M., Koeltzow, T. E., Santiago, G. T., Moratalla, R., Cooper, D. C., Hu, X.-T., et al. (1997). Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* 19, 837–848. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80965-4
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Donckels, E. A., and Ferguson, S. M. (2019). Chemogenetic inhibition of direct pathway striatal neurons normalizes pathological, cue-induced reinstatement of drug-seeking in rats. *Addict. Biol.* 24, 251–264. doi: 10.1111/adb.12594
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C. R., Urakubo, H., Ishii, S., and Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620. doi: 10.1126/science.1255514
- Zheng, T., and Wilson, C. J. (2002). Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *J. Neurophysiol.* 87, 1007–1017. doi: 10.1152/jn.00519.2001

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Allichon, Ortiz, Pousinha, Andrianarivelo, Petitbon, Heck, Trifilieff, Barik and Vanhoutte. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

